



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106619515 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201610416895.6

A61K 47/69(2017.01)

(22)申请日 2010.08.26

C12N 15/88(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 9/51(2006.01)

61/237306 2009.08.27 US

(62)分案原申请数据

201080048954.X 2010.08.26

(71)申请人 工业研究与发展基金会有限公司

地址 以色列海法

(72)发明人 玛塞勒·马克鲁夫

托梅尔·布龙施泰因

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 杜艳玲 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

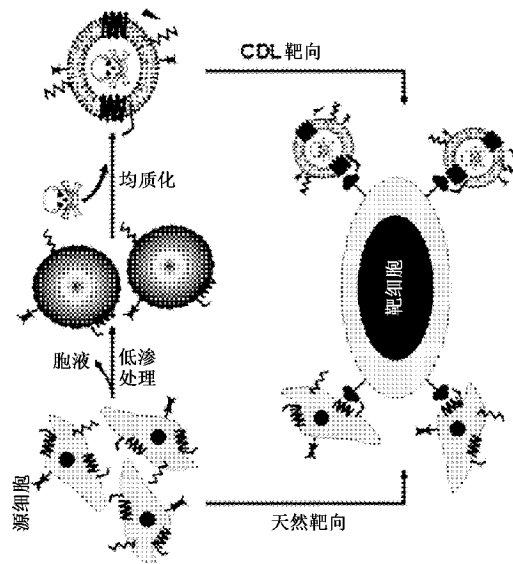
权利要求书1页 说明书49页 附图8页

(54)发明名称

脂质体组合物及其用途

(57)摘要

提供了包含由全细胞膜组分组成的脂质体的组合物。该脂质体可以附连到药剂上或包封药剂。还提供了制取和使用这些脂质体的方法。



1. 一种包含附连到药剂上或包封药剂的脂质体的物质组合物,所述脂质体由间充质干细胞的全细胞膜组分组成并且具有自然膜对称性。
2. 根据权利要求1所述的物质组合物,其中,所述间充质细胞是人细胞。
3. 一种包含由人间充质干细胞的全细胞膜组分组成的脂质体的物质组合物,其中所述脂质体具有自然膜对称性。
4. 根据权利要求1-3所述的物质组合物,其中,所述细胞膜经受基因修饰从而表达外源蛋白。
5. 根据权利要求3-4所述的物质组合物,其中,所述脂质体包封药剂,或者附连到药剂上。
6. 根据权利要求3-4所述的物质组合物,其在人对象中是非免疫原性的。
7. 根据权利要求1-6所述的物质组合物,其中,所述全细胞膜组分的细胞来源包含宿主对象的自体细胞。
8. 根据权利要求1-6所述的物质组合物,其中,所述全细胞膜组分的细胞来源包含宿主对象的非自体细胞。
9. 根据权利要求1所述的物质组合物,其中,所述药剂是诊断剂。
10. 根据权利要求1-9所述的物质组合物,其中,所述脂质体在其外表面上附连到合成的聚合物上。
11. 根据权利要求1-10所述的物质组合物,其中,所述脂质体的尺寸在30-1000 nm的范围内。
12. 根据权利要求1-11所述的物质组合物,其中,所述脂质体进一步由合成的脂质组成。
13. 一种生产具有自然膜对称性的脂质体的方法,所述方法包括:
 - (a) 使人间充质干细胞经受低渗条件,以便获得破裂的细胞膜和/或空胞;和
 - (b) 使所述破裂的细胞膜和/或空胞均质化从而产生具有自然膜对称性的脂质体,其中,所述均质化通过以下实现:
 - (c) 超声处理所述破裂的细胞膜和/或空胞,和/或
 - (d) 通过具有预定孔隙的基质挤出所述破裂的细胞膜和/或空胞。
14. 根据权利要求13所述的方法,进一步包括在步骤(c)之后使合成的聚合物结合到所述脂质体上。
15. 一种将药剂包封在脂质体中的方法,所述方法包括根据权利要求13所述的方法制造脂质体,和在所述均质化步骤之前加入所述药剂。
16. 一种包含作为活性成分的权利要求1所述的物质组合物、和药物可接受载体的药物组合物。

脂质体组合物及其用途

本申请是国际申请日为2010年8月26日、国际申请号为PCT/IL2010/000703、进入国家阶段的申请号为201080048954.X、发明名称为“脂质体组合物及其用途”的PCT申请的分案申请。

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35USC 119(e)要求美国临时专利申请No.61/237,306的优先权权益,该临时专利申请提交于2009年8月27日,其完整内容通过引用合并在此。

技术领域

[0003] 本发明在其一些实施方式中涉及脂质体组合物及其用途。

背景技术

[0004] 基于脂质体的DNA和药物递送系统在过去四十年有着广泛的研究,并用作治疗各种病况的装置(mean)。脂质体系统允许在良好界定的生物相容性和非免疫原性脂质囊泡中高效地包埋亲水性和水性化合物,该脂质囊泡的直径为几纳米至几微米。脂质体也可以利用特异性配体如蛋白质结合物或结合特异细胞受体的抗体靶向。在癌症治疗中,脂质体系统是最受欢迎且全面研究的药物载体之一。这主要由于增强渗透性和滞留(EPR)效应,所述增强渗透性和滞留效应是指肿瘤血管的血管渗透性由于肿瘤血管新生而增大。EPR效应导致脂质体累积在肿瘤细胞外液中,这作为被动靶向机制而被利用。用于癌症治疗的脂质体药物递送的现有技术状态主要包括批准用于临床使用的药物(例如,DaunoXome™、Myocet™、Doxil™、Caelyx™)。当前调查了使脂质体系统靶向癌症的数种途径,包括使靶向部分(targeting moiety)与脂质体表面(例如,抗体)结合。合成的阳离子脂质体是最常用的DNA递送载体,但不论是体外还是体内优选的DNA转移途径,它们的细胞毒性仍然是个问题。另一方面,更加类似于细胞来源的脂质体(就它们的电荷而言)的阴离子脂质体也被证明可以介导基因转移,但包封率较差,这由未凝集DNA(uncondensed DNA)的大尺寸和负电荷引起。通过使DNA与阳离子或聚阳离子(poly-cations)络合(complexation)可以提高包封率和保护DNA不受降解,这种络合随后也显著提高转染效率。

[0005] 近十年来,数个研究已揭示当向荷瘤动物给予某些原代细胞,如成人间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)、成人造血干细胞(HSC)和内皮细胞时,它们累积在肿瘤微环境中。最新数据表明分离的肿瘤细胞膜组分似乎包含强有力的MSC引诱剂(attractant),多于从相同细胞分离的细胞质组分中所包含的。这个数据暗示,MSC靶向肿瘤细胞的机制主要由在肿瘤和MSC上发现的表面分子结合产生的细胞与细胞之间的相互作用控制。然而,细胞对新生血管和肿瘤细胞分泌的不同可溶性因子(例如,趋化因子)的反应被认为也被暗示在某种程度上参与MSC归巢(homing)机制。该归巢机制激发人们研究这些细胞作为癌症治疗的靶向递送媒介物(vehicle)的应用。在这些研究中,原代细胞被分离并用感兴趣的基因,抗癌基因或报告基因转导。将该细胞移植到荷瘤动物中,并利用表达的报告蛋白确定它们对肿瘤微环境的归巢。肿瘤抑制利用表达的抗癌蛋白质实现。

[0006] 源自哺乳动物细胞的细胞质膜的脂质体通常用作研究膜和细胞机制的工具。也对细胞来源的脂质体 (CDL或复数的CDL) 作为癌症免疫治疗的工具进行了研究。在这些研究中,脂质体由肿瘤细胞膜制备,并用作激发针对位于脂质体膜上的肿瘤抗原的免疫系统的佐剂。然而,细胞来源的脂质体从未从干细胞生产出,也从未用作递送媒介物。此外,也从未开发出用作靶向平台的CDL系统。

[0007] 相关技术:

[0008] Boone, C.W., Ford, L.E., Bond, H.E., Stuart, D.C. & Lorenz, D. Isolation of plasma membrane fragments from HeLa cells. *J Cell Biol* 41, 378-392 (1969).

[0009] Westerman and Jensen *Methods Enzymol.* 2003; 373: 118-27.

发明内容

[0010] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了包含附连(连接, attach)到药剂上或包封(encapsulate)药剂(pharmaceutical agent)的脂质体的物质组合物(组合物, composition-of-matter),该脂质体由全细胞膜组分(whole cell membrane fraction)组成。

[0011] 根据本发明一些实施方式,该细胞是人细胞。

[0012] 根据本发明一些实施方式,全细胞膜的细胞来源选自干细胞、原代细胞(primary cell)、细胞系(cell-line)、非致瘤细胞(non-tumorigenic cell)、癌细胞和免疫细胞组成的组。

[0013] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了包含由干细胞的全细胞膜组分组成的脂质体的物质组合物。

[0014] 根据本发明一些实施方式,该干细胞包含人间充质干细胞。

[0015] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了包含由原代人细胞的全细胞膜组分组成的脂质体的物质组合物。

[0016] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了包含由非致瘤人细胞的全细胞膜组分组成的脂质体的物质组合物。

[0017] 根据本发明一些实施方式,该细胞膜经受基因修饰从而表达外源蛋白(exogenous protein)。

[0018] 根据本发明一些实施方式,该外源蛋白选自细胞标记(细胞标记物, cell marker)、靶向部分(targeting moiety)和药剂组成的组。

[0019] 根据本发明一些实施方式,该脂质体包封药剂,或者附连到药剂上。

[0020] 根据本发明一些实施方式,该药剂是治疗剂(治疗剂, therapeutic agent)。

[0021] 根据本发明一些实施方式,物质组合物在人对象(主体、受验者, subject)中是非免疫原性的。

[0022] 根据本发明一些实施方式,该全细胞膜组分的细胞来源包含宿主对象的自体(autologous)细胞。

[0023] 根据本发明一些实施方式,该全细胞膜组分的细胞来源包含宿主对象的非自体(non-autologous)细胞。

[0024] 根据本发明一些实施方式,所述脂质体在其外表面上附连到合成的聚合物上。

- [0025] 根据本发明一些实施方式,该药剂是诊断剂。
- [0026] 根据本发明一些实施方式,该脂质体是单层脂质体(单层的、单室的, unilamellar)。
- [0027] 根据本发明一些实施方式,该脂质体在其外表面上附连到合成的聚合物上。
- [0028] 根据本发明一些实施方式,合成的聚合物是聚乙二醇(PEG)。
- [0029] 根据本发明一些实施方式,该脂质体的尺寸在30-1000nm的范围内。
- [0030] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了生产脂质体的方法,包含:
- [0031] (a) 使细胞经受低渗条件(hypotonic conditions),以便获得破裂的细胞膜和/或空胞(ghost);和
- [0032] (b) 使破裂的细胞膜和/或空胞均质化(homogenize)从而产生脂质体。
- [0033] 根据本发明一些实施方式,该均质化通过以下而实现:
- [0034] (c) 超声处理破裂的细胞膜和/或空胞,和可选地
- [0035] (d) 通过具有预定孔隙(孔隙度, porosity)的基质(matrix)挤出破裂的细胞膜和/或空胞。
- [0036] 根据本发明一些实施方式,该方法进一步包含在步骤(c)之后使合成的聚合物结合到脂质体上。
- [0037] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了将药剂包封在脂质体中的方法,该方法包含根据上面的方法制造脂质体和和在均质化步骤之前加入药剂。
- [0038] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了包含作为活性成分的物质组合物,和药物可接受载体的药物组合物。
- [0039] 根据本发明一些实施方式的方面,提供了递送药剂的方法,该方法包含向需要其的对象给予物质组合物,从而递送药剂。
- [0040] 根据本发明一些实施方式,该全细胞膜组分的细胞来源对于对象是自体的。
- [0041] 根据本发明一些实施方式,该全细胞膜组分的细胞来源对于所述对象是非自体的。
- [0042] 除非另有限定,否则本文使用的所有技术和/或科学术语的含义都与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同。虽然下面描述了示例方法和/或材料,但本发明实施方式的实施或试验中可使用与本文所描述的那些相似或者等效的方法和材料。如有冲突,以专利说明书为准,包括定义。另外,材料、方法和实施例仅为了说明,而未必是限制。

附图说明

[0043] 本文仅参考随附的图像和图片[图像1-10, 图片11]举例说明本发明的一些实施方式。关于下面详细讨论的图像/图片,要强调的是,所示细节仅为了举例,用于示意性地讨论本发明的实施方式。在这方面,参考图像/图片所作的描述将使本领域普通技术人员明了本发明的实施方式如何实施。

[0044] 在图中:

[0045] 图1A-1C描绘了人MSC。通过吉姆萨(Giemsa)染色显现细胞形态(图1A、1B)并通过流式细胞术分析典型的MSC(阳性和阴性)表面标记(图1C)。

[0046] 图2是示出hMSC朝癌细胞迁移的照片。逐滴接种DiI(红色)标记的hMSC和DiO(绿

色) 标记的BHK、PC3、Cf2Th和COS-7细胞。温育72小时后的Maestro显像证明hMSC朝PC3前列腺细胞特异性迁移,同时“避开”其它细胞系。

[0047] 图3是示出MCF 7来源的调整培养基(条件培养基,condition media) 刺激hMSC靶向MCF7乳腺癌细胞系的图片。

[0048] 图4A-4B是细胞来源的脂质体的低温(Cryo) TEM图像。细胞来源的脂质体由hMSC细胞质膜制备,并通过与单甲氧基-PEG结合而PEG化(聚乙二醇化,PEGylated)。然后通过低温TEM使形成的PEG化(图4A) 和未PEG化CDL(图4B) 显像。

[0049] 图5A-5C是示出CDL的DLS和Z(Zeta)-电位(Z电势) 分析的图片。通过数量重量(数均重量,Number-weight) DLS(图5A)、体积重量(体积均重量,Volume-Weight) DLS(图5B) 和Z-电位(图5C) 分析未PEG化和PEG化的hMSC来源的CDL的尺寸、尺寸分布和电荷。

[0050] 图6示出hMSC来源的脂质体的表面标记特征。由hMSC制备CDL,使其与甲苯磺酰基活化的Dynabeads™结合,并针对hMSC特异性膜标记(即,CD44、CD29、CD90和CD105) 进行FACS分析。

[0051] 图7A-7B示出由hMSC制备的CDL与前列腺癌细胞系(PC3) 的结合。将PC3细胞用DiO(绿色) 标记,并与之前用DiI(红色) 标记的CDL一起温育。温育12小时后使培养物显像。示出代表性3D-投影图像(图7A) 和单层(单片,single slice) 图像(图7B)。

[0052] 图8A-8B是示出由hMSC制备的CDL与前列腺癌细胞系(PC3) 的浓度依赖性结合的图片 and FACS直方图(histogram)。将PC3细胞与之前用红色荧光染料(DiI) 标记的各种浓度的CDL一起温育。温育24小时后,洗涤、收获细胞并通过FACS分析(图8A)。计算该细胞的平均荧光强度,对该平均荧光强度与CDL浓度的自然对数作图(图8B)。

[0053] 图9示出由调整hMSC(即,用癌细胞调整培养基培养的细胞) 制备的CDL与前列腺癌细胞系(PC3) 的特异性结合。由之前已与源自前列腺癌细胞系(PC3) 和非人细胞系(BHK) 的调整培养基一起温育24小时的hMSC制备DiI-标记的CDL。将由此形成的“调整”CDL,以及由未调整hMSC(对照,无CM) 制备的CDL,与PC3和BHK细胞一起温育15min、1小时和3小时。温育后,洗涤、收获细胞并通过FACS分析。标记中的百分比是指标记中DiI标记的细胞比率。仅在左上角直方图中指出的括号内的百分比是指标记中未标记细胞的比率。标记和标记中未标记细胞百分比对于所有直方图都是相同的。

[0054] 图10A-10B是包埋可溶性肿瘤坏死因子相关性细胞凋亡诱导配体(sTRAIL) 的,hMSC来源的脂质体的低温TEM图像。所制备的含sTRAIL的CDL(图10A) 和空CDL(图10B) 的终浓度相同,并在相同条件下通过低温TEM显像。为了突出CDL含量,将初始灰度的低温TEM图像(左侧) 重新着色成黑色和白色(右侧)。

[0055] 图11示意性示出基于细胞来源的脂质体(CDL) 的靶向载体的整体设计。选择天然特异性地与靶细胞相互作用的源细胞(原始细胞,origin cell) 作为细胞来源的脂质体来源。例如,因此选择通过膜与癌细胞相互作用的MSC作为癌症靶向载体来源。对来源细胞(source cell) 进行低渗处理从而得到空胞细胞(ghost cell),然后使空胞细胞均质化从而制得CDL。由此产生的CDL然后可以与它的来源细胞类似的方式特异性地结合其靶细胞。

具体实施方式

[0056] 本发明在其一些实施方式中涉及脂质体组合物及其用途。

[0057] 在详细解释本发明的至少一个实施方式之前,应理解本发明的应用不必局限于下面说明中陈述的或通过实施例举例说明的细节。本发明能够有其它实施方式,或能够以多种方式实施或实现。

[0058] 癌症治疗面临的主要挑战是对癌细胞产生细胞毒作用,同时不伤害健康细胞。开发用于癌症治疗的新型靶向治疗递送策略的重要性早已被世界公以。

[0059] 本发明人已设计出用于将治疗和诊断剂靶向递送到细胞和组织中的新型递送媒介物。该递送媒介物基于脂质体,由包含天然脂质和蛋白质的全细胞膜组分组成。通过采用自然(天然,native)细胞膜,可以将本发明递送媒介物调配成具有低潜在免疫原性,容易归巢到靶组织中,且可以进行基因修饰从而表达治疗剂或靶向部分。

[0060] 如下面和后面实施例部分说明的,本发明人已制得由

间充质干细胞的全细胞膜组成的脂质体,间充质干细胞因它们的归巢能力以及它们的免疫抑制能力(即,它们减轻炎症和抑制免疫细胞的能力)和低免疫原性特征(即,似隐形特征(stealth-like feature),这种特征使得在进行异源移植时它们作为外来物质免疫原性较小且不太容易被识别)而闻名。该脂质体表现出间充质干细胞的蛋白质签章(protein signature),因此预期可以介导与完整间充质干细胞类似的免疫抑制和迁移特性。使这些细胞来源的脂质体进一步PEG化从而增大它们的生物利用率和分散性,并降低它们的凝聚性。还对该细胞来源的脂质体进行处理从而使其包封治疗剂。总之,从这些研究结果可以看出,本发明递送系统可以作为诊断和治疗人疾病如癌症的重要工具。

[0061] 因此,根据本发明的方面,提供了包含附连到药剂上或包封药剂的脂质体的物质组合物,所述脂质体由全细胞膜组分组成。

[0062] 如本文使用的术语“脂质体”是指全封闭的载体分子(fully closed carrier molecules),其包含本身为液晶相或液体凝胶相的球形脂质膜,其中包含所包埋液体的体积。该两种液相是不混溶的。因而,本发明脂质体(在本文也称为细胞来源的脂质体(CDL),类似于细胞的膜,是完全凝胶/液体状态和/或液晶状态而不是固体状态。

[0063] 本发明一些实施方式的脂质体具有预期的蛋白质脂质比,约为0.8w/w。

[0064] 应注意,hMSCc CDL的蛋白质含量约为0.8mg/10⁸个细胞(如通过Bradford分析测得的)。该脂质含量容易利用Stewart磷脂分析测定。预期它为约1mg/10⁸个细胞。

[0065] 可以利用下面的计算确定理论磷脂含量。因为单个哺乳动物细胞的干质量(干重)为10⁻⁷mg¹数量级,且因为磷脂大约构成该干细胞质量²的10%,因此该细胞来源的脂质体生产过程(假定100%效率)的理论产量应为10⁻⁸mg磷脂/单个细胞或1mg/10⁸个细胞的数量级。

[0066] 脂质体包括泡囊(niosome)、转铁体(transfersome)、乳剂、泡沫、胶束(micelle)、液晶、分散体、层状层(片状层,lamellar layer)等。

[0067] 该脂质体可以是单层脂质体或多层脂质体(多层的,multilamellar)。

[0068] 根据本发明具体实施方式,该脂质体是单层脂质体,如通过低温TEM测定的。

[0069] 根据本发明具体实施方式,该脂质体具有自然膜对称性和自然标记的表达。

[0070] 本发明脂质体由全细胞膜组分组成。

[0071] 如本文使用的短语“细胞膜”或“细胞的膜”(它们可以互换使用)是指生物膜,该生物膜包围细胞或者是其细胞器(例如,叶绿体、ER、高尔基体、线粒体、液泡、细胞核和溶酶体)不可缺少的部分。

[0072] 根据本发明具体实施方式,细胞膜是指质膜。使用质膜具有特别的优势,因为它呈递和细胞与细胞之间的相互作用关联的蛋白质,以及其它识别分子,如结合可溶性配体的受体。

[0073] 如本文使用的“全细胞膜组分”是指不仅包括脂质而且包括膜蛋白质的组分。

[0074] 膜蛋白质实例包括,但不局限于,整合蛋白(integral protein)、跨膜蛋白、脂质锚定蛋白(lipid anchored protein)和糖蛋白。

[0075] 根据本发明实施方式,全细胞膜组分也包括碳水化合物。

[0076] 根据具体实施方式,该细胞是真核细胞[例如,哺乳动物(如人)、植物、昆虫细胞]。

[0077] 根据另外的具体实施方式,该真核细胞是哺乳动物细胞。

[0078] 根据又一个另外的实施方式,该细胞可以是原代细胞(即,非永生化(non-immortalized)且有时未被培养)或细胞系。

[0079] 根据又一个另外的实施方式,该细胞可以是胚细胞。

[0080] 对于在自体或非自体(同系异体(同种异体,syngeneic allogeneic)或异种(xenogeneic))环境中使用未培养细胞的临床应用,使用原代细胞是有利的。

[0081] 根据具体实施方式,该真核细胞是干细胞。

[0082] 如本文使用的短语“干细胞”是指,在培养时能够长时间保持未分化状态(例如,多能性(全能,pluripotent)干细胞或多能(multipotent)干细胞),直到被诱导分化成具有特定专一化功能的其它细胞类型(例如,完全分化的细胞)的细胞。优选地,短语“干细胞”包括胚胎干细胞(ESC)、诱导的多能干细胞(iPS)、成人干细胞、间充质干细胞和造血干细胞。

[0083] 根据具体实施方式,该干细胞是间充质干细胞。

[0084] 间充质干细胞是形成多能母细胞(formative pluripotent blast cells)。间充质干细胞(MSC)可以产生一种或多种间充质组织(例如,脂肪、骨、软骨、弹性和纤维结缔组织、成肌细胞、心肌样细胞)以及除起源于胚胎中胚层(例如,神经细胞)的组织之外的组织,这取决于来自生物活性因子如细胞因子的各种影响。MSC可以从胚胎卵黄囊(embryonic yolk sac)、胎盘(placenta)、脐带、胎儿和青少年皮肤、血液、骨髓、脂肪和其它组织中分离出,但它们在骨髓中的丰富度远远超过它们在其它组织中的丰富度。MSC已被证明在包括自身免疫性疾病和移植在内的多种环境下具有免疫抑制功能,使得从其产生的脂质体成为炎症和自身免疫性环境中的终极工具。

[0085] 分离、纯化和扩增间充质干细胞(MSC)的方法在本领域中是已知的,包括例如Caplan和Haynesworth的美国专利No.5,486,359,以及Jones E.A.等人,2002,Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells,Arthritis Rheum.46(12):3349-60中公开的那些。

[0086] 优选地,间充质干细胞培养物如下制得:用等体积的汉克(Hank's)平衡盐溶液(HBSS;GIBCO Laboratories,Grand Island,NY,USA)稀释BM抽吸物(aspirate)(通常20ml),并使所稀释细胞在约10ml Ficoll柱(Ficoll-Paque;Pharmacia,Piscataway,NJ,USA)上分层。以2,500xg,离心30分钟后,从分界面中移出单核细胞层,将其悬浮在HBSS中。然后以1,500xg离心细胞15分钟,将其重悬在完全培养基(MEM,无脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的 α 培养基;GIBCO)中;批量选择用于使MSC快速生长的20%胎牛血清(FCS)(Atlanta Biologicals,Norcross,GA);100单位/ml青霉素(GIBCO);100 μ g/ml链霉素(GIBCO);和2mM

L-谷氨酰胺(GIBCO)。将重悬细胞接种(涂平板,plate)于10cm培养皿(CorningGlass Works,Corning,NY)中的约25ml培养基中,并在37℃和5%加湿CO₂下温育。培养24小时后,弃去非粘附性细胞,用磷酸缓冲盐水(PBS)充分洗涤粘附细胞两次。每隔3天或4天用新鲜完全培养基更换培养基,持续约14天。然后在37℃下利用0.25%胰蛋白酶和1mM EDTA(胰蛋白酶/EDTA,GIBCO)收获粘附细胞5min,将其重新接种(replate)于6-cm板中,再培养14天。然后使细胞胰蛋白酶化(trypsinize),并利用细胞计数装置如血球计(Hausser Scientific, Horsham,PA)进行计数。培养的细胞通过离心回收,并用5%DMSO和30%FCS以1~2X10⁶个细胞/ml的浓度重悬。缓慢冷冻每个约1ml等分试样,存放在液氮下。

[0087] 为了扩增间充质干细胞组分,在37℃下使冷冻细胞解冻(thaw),用完全培养基稀释并通过离心回收从而除去DMSO。将细胞重悬在完全培养基中,并按约5,000个细胞/cm²的浓度接种。培养24h后,除去非粘附性细胞,利用胰蛋白酶/EDTA收获并通过窄型巴士德移液管(Pasteur pipette)分离(dissociate)粘附细胞,优选以约1.5~约3.0个细胞/cm²的密度重新接种。在这些条件下,MSC培养物可以生长约倍增50次(50 population doublings),并扩增约2000倍[Colter DC,等人,Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.Proc Natl Acad Sci USA.97:3213-3218,2000]。

[0088] 本发明利用的MSC培养物优选包括通过形态特征限定的三组细胞:小的无颗粒细胞(agranular cells)(本文下面称为RS-1)、小的粒细胞(颗粒细胞,granular cells)(本文下面称为RS-2),以及大的中度粒细胞(moderately granular cells)(本文下面称为成熟MSC)。培养物中此种细胞的存在和浓度可以通过利用例如免疫荧光、原位杂交和活性分析鉴定是否存在各种细胞表面标记来测定。

[0089] 当在本发明培养条件下培养MSC时,它们对造血干细胞标记CD34、CD11B、CD43和CD45呈阴性染色。少部分细胞(少于10%)对CD31和/或CD38标记呈弱阳性。另外,成熟MSC对造血干细胞标记CD117(c-Kit)呈弱阳性;对成骨MSC标记Stro-1呈中度阳性[Simmons, P.J.&Torok-Storb,B.(1991).Blood 78,5562],且对胸腺细胞和外周T淋巴细胞标记CD90(Thy-1)呈阳性。另一方面,RS-1细胞对CD117和Stro1标记呈阴性,而对CD90标记呈弱阳性,RS-2细胞对所有这些标记都呈阴性。

[0090] 可用作全细胞膜组分有效来源的其它细胞包括,但不局限于,内皮细胞、肝细胞、胰腺细胞、骨细胞、软骨细胞(chondrocyte)、神经细胞等。

[0091] 该细胞可以以自然形式使用(used native)(即,未通过基因修饰操纵)或对该细胞进行基因修饰从而操纵该细胞的膜组分。

[0092] 基因修饰的优点在于其效率提高。基因修饰细胞产生的基本所有(>95%)CDL都表达感兴趣的基因。该感兴趣的基因可以组成型表达于细胞来源(通过整合到细胞基因组中)或短暂表达(游离型表达(episomal expression))以便避免稳定转染剂(例如,慢病毒和逆转录病毒载体)的有害影响。

[0093] 因而,该细胞可以经过基因修饰从而表达感兴趣的基因(即,不但表达未天然表达于天然膜中的基因,而且用以增强以较低水平天然表达于该细胞膜上的内源蛋白质的表达)。

[0094] 根据具体实施方式,感兴趣的基因编码膜蛋白质。感兴趣的基因可以是天然膜蛋

白质,或者经修饰从而具有膜锚定所需的膜定位信号和其它基序,如跨膜结构域。

[0095] 可以异源(外源)表达的膜蛋白质实例包括,但不局限于,靶向蛋白质(例如,抗体、受体、膜锚定配体、诱饵蛋白(诱骗体,decoy))、影响膜化学(性质)的蛋白质(例如,结构蛋白质、带电荷蛋白质)、诊断蛋白质(例如,在以下段落中描述的酶),和治疗性蛋白质(如在以下段落中描述的)。

[0096] 靶向部分包括与细胞表面或细胞外基质标记结合的靶向蛋白质,如抗体、受体配体和非蛋白质性分子如碳水化合物。例如,在前列腺癌细胞上过表达的前列腺特异膜抗原(PSMA)可以被它的结合到跨膜基序(例如,截断LIME)⁴上的配体NAAG³靶向。这可以通过遗传改造该细胞(CDL来源于其中)从而使其表达NAAG的嵌合或自然形式实现。例如,编码LIME的表达质粒通过PCR以及随后将相应片段插入到pcDNA3.1 (Invitrogen) 中来构建。该引物也具有BamHI (5'引物和3'引物)位点延伸从而使亚克隆容易进行。PCR产物利用BamHI消化并插入到pcDNA3.1 (+) (CLONTECH Laboratories, Inc.) 中的相应位点处。对于编码LIME-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAG)的表达载体,可以将开放阅读框插入到编码LIME的质粒中,以便NAAG通过其N-端结合并且它的C端保持游离从而与PSMA [即, LIME (C) - (N) NAAG-COOH] 反应。替换地,编码NAAG-LIME嵌合体的表达质粒可以按照前面针对CD8-LIME嵌合体⁵描述的方法构建。与NAAG和LIME跨膜区对应的片段通过PCR产生。对编码NAAG的3'序列和LIME片段的5'序列的引物进行设计从而使其重叠(overlap),以便使该两种产物退火产生混合模板(hybrid template)。从这个模板,利用包含XbaI位点的外侧引物(external primer)扩增该嵌合体。将NAAG-LIME嵌合体插入pcDNA3.1 (+) 中。

[0097] 如本文使用的短语“表面标记”是指被靶细胞/组织的细胞表面或细胞外基质以独特的高密度特异性展示,和/或以独特构型展示的任何化学结构。

[0098] 例如,靶向部分可能对靶向肿瘤细胞有用。例如,人们通常认为肿瘤细胞的细胞内环境的碱性大于它们邻近的细胞外环境,反过来它们邻近的细胞外环境的酸性大于在滋养肿瘤的新生血管(angio-genic blood vessel)中发现的微环境。另外,许多先前的研究已证明,肿瘤细胞的表面电荷比良性正常细胞的表面电荷的负性更强(more negative),更不必说侵袭性肿瘤细胞。因此,表达膜结合酶和/或蛋白质可能有用,这将使得仅带正电荷的脂质体位于酸性的肿瘤中间细胞外环境。例如,可以使用落在新生血管高碱性pH (pH>7.4) 和肿瘤邻近的细胞外环境低酸性pH (pH<7.2) 之间pI为约7.2-7.4的任何膜蛋白。此种蛋白质可以通过交叉参考人血浆膜蛋白的RCSB Protein Data Bank (PDB) 特异性鉴定。这些蛋白质预期理想的pI (7.2-7.4) 可以利用标准迭代算法^{10,11}计算,标准迭代算法将为粗蛋白质序列^{12,13}给出相对精确的PI计算结果。在ExPASy服务器中的Compute pI/Mw工具中运用该算法。预期此种脂质体在新生肿瘤血管碱性微环境中具有负电荷或中性电荷,而在较酸性的肿瘤邻近的细胞外环境中具有正电荷。因此,这种电荷改变对于显著增大中性颗粒负性的脂质体外渗(liposomal extravasation)有利,而且对于更容易利用带正电荷颗粒完成的肿瘤内递送有利^{8,14,15}。

[0099] 关于在疾病如癌症中特异性过表达的表面标记以及对此种表面标记有特异性的抗体的详尽指导记载在现有技术的文献(例如,参考:AM Scott, C Renner. "Tumour Antigens Recognised by Antibodies.", Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, Macmillan, London, UK, www.els.net, 2001) 中。

[0100] 与特异性展示生长因子受体/TAA表面标记的靶细胞/组织关联的,可通过本发明方法治疗的疾病包括,例如,特异性展示生长因子受体/TAA的许多疾病中的一些,所述的生长因子受体/TAA为,例如EGF受体、血小板来源的生长因子(PDGF)受体、胰岛素样生长因子受体、血管内皮生长因子(VEGF)受体、成纤维细胞生长因子(FGF)受体、转铁蛋白受体,和叶酸受体。此种疾病和这些疾病特异性展示的生长因子受体/TAA的具体实例在下表1中列出。

[0101] 表1

[0102]

参考文献	恶性肿瘤类型	受体*
Kim, E. S. 等人, 2001. Curr Opin Oncol 13, 506-13; Kuan 等人, 2000. Brain Tumor Pathol. 2000;17:71-8	恶性胶质瘤、胶质母细胞瘤、头颈部癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、卵巢癌、脑癌、胰腺癌、膀胱癌	EGF 受体
George, D., 2001. Semin Oncol 28, 27-33	脑癌、前列腺癌	PDGF 受体
Wang, Y., and Sun, Y., 2002. Curr Cancer Drug Targets 2, 191-207	乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌	IGF 受体

[0103]

Rosen, L. S., 2001. Cancer J 7 Suppl 3, S120-8; Giles, F. J., 2001. Oncologist 6, 32-9	实体瘤、急性和慢性白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金病	VEGF 受体
Lappi, D. A., 1995. Semin Cancer Biol 6, 279-88	黑色素瘤、Caposi 肉瘤、胰腺癌	FGF 受体
Singh, M., 1999. Curr Pharm Des 5, 443-51	白血病、脑癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌	转铁蛋白受体

[0104] *缩写:EGF-表皮生长因子,PDGF-血小板来源的生长因子,IGF-胰岛素样生长因子,VEGF-血管内皮生长因子,FGF-成纤维细胞生长因子。

[0105] 在优选实施方式中,该配体是靶向对靶细胞上的受体有特异性的抗原的抗体或抗体片段。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或抗体片段,它们是靶特异性的。在实施方式中,附连到脂质体上的抗体是特异性结合到B-细胞表位上的抗-CD19、抗-CD20,或抗-CD22。这些抗体或抗体片段通常源自对受累(affected)B-细胞表现出阳性反应性的杂交瘤。考虑到,可以类似地使用靶向身体中任何其它细胞的其它抗体或抗体片段。例如,利用抗-CD19抗体使含有包埋剂(entrapped agent)的脂质体靶向恶性B细胞。该抗体识别B细胞上的独特(unique)表位,CD19表面抗原。

[0106] 在真核细胞中表达异源蛋白质的方法是本领域熟知的。

[0107] 因而,可以在后来从中抽提膜的细胞中表达设计和构建用于表达感兴趣的基因至少一个功能部分的外源多核苷酸序列。相应地,该外源多核苷酸序列可以是感兴趣的基因

的DNA或RNA序列。

[0108] 如本文使用的术语“功能部分”是指表现出酶功能特性如与底物结合的特性的编码蛋白质(即,多肽)的部分。例如,抗体功能部分可以是赋予特异性的可变区和另外的恒定区/或者替换地为恒定区,即,Fc,其可以活化补体(complement)和诱导细胞杀伤。例如,细胞可以利用编码GPCR家族一个或多个成员(例如,CCR5、CXCR4等)的基因转染,该基因将使脂质体靶向包括自身免疫性疾病和病毒疾病(例如HIV/AIDS)在内的大量细胞病状。

[0109] 为了在真核(例如,哺乳动物)细胞中表达外源感兴趣的基因,优选将编码感兴趣的基因的多核苷酸序列连接到适合于真核细胞表达的核酸构建体中。此种核酸构建体包括用于指导该多核苷酸序列在细胞中以组成型或诱导型方式转录的启动子序列。

[0110] 适合于本发明使用的用于哺乳动物表达的组成型启动子是在大多数环境条件下和在大多数类型的细胞如巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)中有活性的启动子序列。适合于本发明使用的诱导型启动子包括例如,四环素可诱导的启动子的诱导型启动子(Zabala M等人,Cancer Res.2004,64(8):2799-804)。

[0111] 本发明核酸构建体(在本文也称为“表达载体”)包括使这种载体适合于在原核生物、真核生物或优选二者(例如,穿梭载体)中复制和整合的另外序列。另外,典型的克隆载体还可以包含转录和翻译起始序列、转录和翻译终止子以及多腺苷酸化信号。举例来说,此种构建体通常包括5'LTR、tRNA结合位点、包装信号、第二链DNA合成起点,以及3'LTR或其部分。

[0112] 本发明核酸构建体通常包括指导翻译的多肽到达膜的信号序列,另外包括膜锚定结构域如跨膜结构域或基于脂质的锚(anchor)(例如GPI)。

[0113] 真核启动子通常包含两种类型的识别序列,TATA框和上游启动子元件。TATA框,位于转录起始位点上游的25-30位碱基对处,被认为参与指导RNA聚合酶开始RNA的合成。其它上游启动子元件决定转录起始速率。

[0114] 优选地,本发明核酸构建体利用的启动子在转化的特异细胞群体中有活性。细胞类型特异性和/或组织特异性启动子的实例包括这样的启动子如肝特异性白蛋白[Pinkert等人,(1987)Genes Dev.1:268-277]、淋巴特异性启动子[Calame等人,(1988)Adv.Immunol.43:235-275];特别是T细胞受体启动子[Winoto等人,(1989)EMBO J.8:729-733]和免疫球蛋白[Banerji等人(1983)Cell 33729-740];神经元特异性启动子如神经微丝(neurofilament)启动子[Byrne等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477]、胰腺特异性启动子[Edlunch等人(1985)Science 230:912-916]或乳腺特异性启动子如乳清(milk whey)启动子(美国专利No.4,873,316和欧洲申请公开No.264,166)。

[0115] 与同源或异源启动子连接时,增强子元件可刺激转录提升至1,000倍。增强子在处于转录起始位点的上游或者下游的时候具有活性。源自病毒的许多增强子元件具有宽广的宿主范围,并在多种组织中有活性。例如,SV40早期基因增强子适合于许多细胞类型。适合于本发明的其它增强子/启动子组合包括源自多瘤病毒、人或鼠巨细胞病毒(CMV)的那些,以及来源于各种逆转录病毒如鼠白血病病毒、鼠或Rous肉瘤病毒和HIV的长末端重复序列。参见Enhancers and Eukaryotic Expression,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.1983,该文献通过引用合并在此。

[0116] 在构建表达载体时,优选将启动子与异源转录起始位点的距离设置成与该启动子

在自然环境下与转录起始位点的距离近似相同。然而,如本领域熟知的,在不损害启动子功能的情况下可以对这个距离作出各种改变。

[0117] 也可将多腺苷酸化序列加入到表达载体中以便增加mRNA翻译的效率。准确高效的多腺苷酸化需要2个不同的序列元件:位于多腺苷酸化位点下游的GU或U富含序列,和位于上游核苷酸11-30之间的六个核苷酸高度保守序列AAUAAA。适合于本发明的终止和多腺苷酸化信号包括源自SV40的那些。

[0118] 除已描述的元件以外,本发明表达载体通常还可以包含其它旨在增大所克隆核酸的表达水平或使携带重组DNA的细胞易于鉴定的特定元件(specialized element,专用元件)。例如,许多动物病毒包含促进病毒基因组在容许细胞类型中进行染色体外复制的DNA序列。携带这些病毒复制子的质粒可以游离型复制(replicated episomally),只要质粒上携带的基因或宿主细胞基因组的基因能够提供合适的因子即可。

[0119] 该载体可以包括或不包括真核复制子。如果存在真核复制子,则该载体可利用合适的可选择标记在真核细胞中扩增。如果该载体不包含真核复制子,则无法进行游离型扩增。相反,重组DNA整合到工程细胞的基因组中,其中启动子指导期望核酸的表达。

[0120] 本发明表达载体可以进一步包括如允许从单一mRNA如内核糖体进入位点(IRES)翻译几种蛋白质的另外多核苷酸序列和使启动子嵌合多肽基因组整合的序列。

[0121] 哺乳动物的表达载体的实例包括,但不限于,可从Invitrogen获得的pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81,可从Promega获得的pCI,可从Stratagene获得的pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV,可从Clontech获得的pTRES,以及它们的衍生物。

[0122] 也可以使用包含真核病毒如慢病毒和反转录病毒的调节元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7和pMT2。源自牛乳头瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,且源自艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein Bar virus)的载体包括pHEB0和p205。其它示例载体包括pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE,和允许蛋白质表达在SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、Rous肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子(polyhedrin promoter)或表现为对真核细胞中的表达有效的其它启动子指导下进行的任何其它载体。

[0123] 替换地,可以对细胞、膜、空胞或CDL(其中的任何一个可以是天然形式的或基因修饰的)进行化学处理以便呈递蛋白质、糖、合成聚合物、肽或它们的任何组合。本文下面和后面实施例部分描述了用合成聚合物修饰膜的方法。此种化学连接可以在从活的培养或悬浮细胞到产生的CDL的任何阶段下进行。

[0124] 例如,也可以使CDL与可进一步增强它们靶向和附连到肿瘤细胞的能力的叶酸盐(酯)(folate)化学结合,已知肿瘤细胞相比良性细胞表达较高水平的叶酸盐(酯)受体。

[0125] 根据另一个实例,也可以永久性地调节CDL从而使其具有正性更强的表面电荷,通过用阳离子、盐或聚阳离子(例如Polybrene®、聚乙烯亚胺和聚-L-赖氨酸)处理它们,使得它们具有正性更强的电荷从而更好地靶向肿瘤新生血管。

[0126] 也可以在CDL表面引入非自然材料,通过与可由良好界定的脂质、蛋白质和添加剂组成的其它脂质体(例如,细胞来源或合成的脂质体)融合(例如,PEG或清洁剂(去污剂)诱

导的)实现。此种融合可以产生混合CDL,可用来使任何部分(例如,靶向、治疗、诊断、致使隐形(stealth-rendering)的部分,等)结合到CDL上和改变它们的表面特性。脂质体融合的进一步指导参见实施例5。

[0127] 合成聚合物通常用来阻止或减少凝聚(coagulation),增大分散性,降低与血液组分的相互作用,避开单核吞噬系统的非特异性摄取和在很大程度上延长颗粒循环时间,从而使该脂质体具有通常称为隐形特性的特性和特征或为长循环脂质体。因此,颗粒表面处纳米环境的pH也可能取决于这些分子的长度。

[0128] 有许多聚合物可以附连到脂质上。通常用作脂质修饰剂的聚合物包括,不局限于,聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸、聚乳酸(也称为多乳酸化合物(poly lactide)、聚乙醇酸(也称为聚乙交酯(聚乙醇酸交酯))、聚乳酸-聚乙醇酸的聚乙烯醇(apoly lactie-polyglycolic acid/polyvinyl alcohol)、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基乙基噁唑啉(polyhydroxyethylloxazolilile)、聚羟基丙基噁唑啉(solyhydroxypryloxazoline)、聚天冬酰胺(polyaspartarllide)、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺、聚乙烯基甲基醚、聚羟乙基丙烯酸酯、衍生化纤维素如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0129] 所采用的聚合物可以为均聚物或者为嵌段或无规共聚物。

[0130] 衍生为脂质聚合物的最常用市售脂质是基于磷脂酰乙醇胺(PE)的那些,通常为二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0131] 可被本发明采用的脂质聚合物的特异性家族包括其中PEG聚合物经由氨基甲酸酯键连接到脂质上的PEG-DSPE(具有不同长度的PEG链),和聚乙二醇二硬脂酰甘油。该PEG部分头基的分子量优选为约750Da~约20,000Da。更优选地,该分子量为约750Da~约12,000Da,最优选为约1,000Da~约5,000Da。两种示例性DSPE-PEG为其中PEG分子量为2000Da和5000a的那些,它们在本文称为DSPE-PEG(2000)(DSPE-PEG2k)和DSPE-PEG(5000)(DSPE-PEG5k)。

[0132] 也可以被本发明采用的脂质聚合物的特异性家族包括C8和C16mPEG神经酰胺(具有不同长度的PEG链),其中PEG-神经酰胺在PEG和神经酰胺部分之间含有使该化合物容易代谢的酯键。该PEG部分头基的分子量优选为约750Da~约2,000Da。更优选地,该分子量为约2,000Da。

[0133] 常见脂质体的常规插入后PEG化需要加热或溶解在含有可能会损害表面蛋白质并导致包封泄漏的溶液的清洁剂中。因此,CDL也可以通过下面描述的两种方法或其组合进行PEG化。首先,通过清洁剂透析将PEG化脂质掺入空胞细胞膜(在制备CDL之前)制备PEG化CDL。接着,可以利用琥珀酰亚胺基琥珀酸酯活化的单甲氧基-PEG执行CDL的直接PEG化,这种PEG化已被证明可增大转染效率和降低血清介导的用作基因转导载体的PEG化慢病毒颗粒失活¹⁶。

[0134] 可以采用非蛋白质组分(例如,合成聚合物、碳水化合物等)与脂质体表面的化学结合。因而,可以利用本领域已知的任何连接或结合方法和/或任何合适的化学连接子,使非蛋白质部分共价或非共价连接到、嵌入或吸附到脂质体上。此种交联剂及交联方法的确切类型和化学性质优选适合于所用亲和基团的类型和脂质体的性质。结合或吸附或连接酶和/或靶向部分的方法在本领域中也是熟知的。

[0135] 例如,酶和/或靶向部分可以在界面附连到基团上,通过,但不局限于,极性基团如氨基、SH、羟基、醛、甲酰基、羧基、His-标签或其它多肽。另外,酶和/或靶向部分可以通过,但不局限于活性基团如琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、氰尿酸氯、甲苯磺酰基活化的基团、咪唑基、CNBr、NHS、活化的CH、ECH、EAH、环氧基、硫丙基、活化的硫醇等附连。而且,酶和/或靶向部分可以通过,但不局限于可以包括或不包括交联剂(例如,二价阴离子、聚阴离子、聚阳离子等)的疏水键(范德华力)或静电相互作用附连。

[0136] 一旦细胞来源可用,就制备脂质体。因而,提供了生产脂质体的方法,包含:

[0137] (a) 将细胞置于低渗条件下,以便获得破裂的细胞膜和/或空胞细胞(也称为空胞(ghost));和

[0138] (b) 使破裂的细胞膜和/或空胞均质化从而产生脂质体。

[0139] 该方法可以利用本领域中其它广为接受的方案实施,如下面文献中描述的并加以修改或未加以修改的那些:Boone,C.W.,Ford,L.E.,Bond,H.E.,Stuart,D.C.&Lorenz,D. Isolation of plasma membrane fragments from HeLa cells. *J Cell Biol* 41,378-392 (1969);和Westerman and Jensen *Methods Enzymol.* 2003;373:118-27 (其中的每篇文献都通过引用合并在此)。

[0140] 如本文使用的术语“空胞”是指,所有细胞质内容和/或细胞核都通过细胞裂解和/或膜破裂除去以便仅残留其外面的细胞质/细胞膜的细胞;和

[0141] 不受特定方案束缚,在特定实施方式中建议本发明脂质体以分步方式制备。首先,主要利用低渗处理从细胞(10^9 个细胞)中分离质膜,使得细胞破裂和空胞细胞形成。替换地,空胞细胞可以利用温和超声波法、冻融法、弗氏压碎器(French-press)、针通过(needle-passaging)或含清洁剂溶液溶解法形成。根据具体实施方式,低渗处理在Tris-镁缓冲液(例如,在4°C下pH 7.4或pH 8.6,用HCl调节pH)中进行。通过位相显微术(相差显微检查,phase-contrast microscopy)监视细胞溶胀(cell swelling)。一旦细胞溶胀并有空胞形成,就将悬浮液放入均质机。通常,约95%细胞破碎已足够。然后将膜/空胞放入蔗糖(0.25M或更高)中保存。为了避免粘附,将空胞放入塑料管中并进行离心。产生层叠球粒(laminated pellet),其中最上面较浅的灰色层仅由空胞组成。但为了增大产量对全部球粒加以处理。离心(例如,4°C下以3,000rpm离心15min)和洗涤(例如,20体积的Tris镁/TM-蔗糖pH 7.4)可以重复进行。

[0142] 在下一个步骤中,通过在不连续的蔗糖密度梯度中浮选(floatation)分离空胞组分。将少量过量的上清液置于洗涤的球粒上,该球粒此时包含空胞、细胞核和不完全破裂的全细胞。在悬浮液中另外加入pH为8.6的含60% w/w蔗糖的TM从而在折射计(refractometer)上给出45%蔗糖的读数。这个步骤之后,所有溶液都含有pH 8.6的TM。将15ml悬浮液放入SW-25.2硝酸纤维素管,并通过加入分别由40%和35% w/w蔗糖组成的15ml层,然后加入5ml TM-蔗糖(0.25M)在该悬浮液上形成不连续梯度。此时在4°C下以20,000rpm离心该材料10min。细胞核沉积物形成球粒,不完全破裂的全细胞聚集在40%-45%界面处,空胞聚集在35%-40%界面处。收集空胞并汇集在一起。

[0143] 在下一个步骤,通过超声处理使空胞均质化,超声处理后可以接着进行挤出。

[0144] 具体的超声处理方案涉及利用振幅设置(amplitude)为8,带有微探针的MSE超声处理器(Instrumentation Associates,N.Y.)超声处理5秒。这个短暂的超声处理时间足以

使空胞质膜分解为细胞来源的脂质体 (CDL)。在这些特定条件下,细胞器膜未被破坏并通过离心 (3,000rpm,15min 4℃) 除去。然后通过连续蔗糖密度梯度中沉积纯化质膜囊泡 (CDL)。

[0145] 包含本发明一种或多种药剂的脂质体的尺寸范围优选为20-1000nm例如,30-1000nm、0.02-1.0 μ m,更优选0.05-1.0 μ m,更优选0.07-0.5 μ m且更优选0.1-0.3 μ m。较小或约0.2 μ m的脂质体的优点在于,它们容易渗透通过肿瘤血管系统 (由于EPR效应),它们不容易被巨噬细胞摄取且它们可以经受过滤灭菌。

[0146] 通过市售聚碳酸酯膜 (例如,购自华盛顿Sterlitech) 或购自法国Pall Execia的不对称陶瓷膜 (例如,Membralox) 挤出脂质体是将脂质体尺寸减小到相对明确限定的尺寸分布的有效方法。通常,使该悬浮液通过该膜循环一次或多次直至获得期望的脂质体尺寸分布。可以通过连续变小孔隙的膜 (例如,孔隙尺寸为400nm、100nm和/或50nm) 挤出脂质体从而使脂质体尺寸逐渐减小并获得均匀分布。

[0147] 在均质化、超声处理和/或挤出之前的任何步骤,即,通常在空胞制备之后,将药剂加入反应混合物中以便所形成的脂质体包封该药剂。

[0148] 如本文使用的短语“药剂”是指可用来治疗或诊断医学病况的治疗剂或诊断剂。

[0149] 根据具体实施方式,当细胞来源是间充质干细胞时,包含药剂和脂质体的组合物是低免疫原性或非免疫原性的。

[0150] 因而,本发明脂质体可以具有吸附到其表面上或者包封在其中,包封在脂质体内极性相内或包封在层状非极性脂质相内的药剂。

[0151] 使分子 (例如,靶向部分、药剂、合成聚合物等) 结合到脂质体上的方法在本领域中是熟知的。例如,可以基于疏水相互作用 (范德华力结合) 或静电相互作用,利用或不利用交联剂 (例如,阴离子或聚阴离子),使药剂 (或任何其它分子) 附连、结合或吸附到脂质体、空胞或脂质体来源于其中的细胞表面上。可以利用或不利用清洁剂和/或通过清洁剂透析 (detergent dialysis),使疏水和/或两性药剂 (或任何其它疏水和/或两性分子) 溶解、部分溶解或分配 (partition) 到细胞、空胞或脂质体脂质膜中。药剂 (或任何其它分子) 可以基于与活性基团形成的共价键附连、结合或吸附到脂质体、空胞或者脂质体来源于其中的细胞的表面上。药剂可以附连、结合或吸附到该脂质体、空胞或者细胞的表面上,作为被在脂质体、空胞或细胞上发现的天然部分特异性识别的抗体或其部分的结合物。例如,药剂可以通过但不局限于下面这些基团吸附到脂质体表面 (内部或外部): 极性基团如氨基、SH、羟基、醛、甲酰基、羧基、His-标签或其它多肽。另外,药剂可以通过,但不局限于活性基团如琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、氰尿酸氯、甲苯磺酰基活化的基团、咪唑基、CNBr、NHS、活化的CH₂、ECH、EAH、环氧基、硫丙基、活化的硫醇等附连。

[0152] 包埋在脂质体内,吸附、表达、结合、附连和/或溶解在脂质体表面或膜上的治疗剂是通过,但不局限于下列机制中的一种或多种机制递送到靶细胞和/或组织中:

[0153] 药剂通过脂质体和细胞之间膜融合的直接细胞内递送,和/或脂质体通过内吞作用、吞噬作用或任何一种跨膜运送机制被摄取。

[0154] 药剂从脂质体扩散和/或泄漏,并随后结合到靶细胞/组织的表面,和/或通过扩散、内吞作用、吞噬作用或通过任何一种跨膜运送机制被靶细胞/组织摄取。

[0155] 永久性、连续性或短暂性表达、附连、吸附、结合和/或溶解在脂质体表面或膜上的

药剂结合到靶细胞和/或组织的表面。

[0156] 多种治疗剂可以包埋在脂质囊泡中,包括可以稳定地包封在脂质体水性隔室中的水溶性药剂、稳定分配在该囊泡的液相中的亲脂性化合物,或可以例如通过静电、共价或疏水相互作用稳定或短暂附连、结合、吸附或表达在脂质体外表面或内表面上的药剂。

[0157] 示例水溶性化合物包括小分子(即,低于1000道尔顿)或大分子(例如,超过1000道尔顿)、生物分子(例如,蛋白质性分子,包括但不局限于肽、多肽、翻译后修饰的蛋白质、抗体等)或核酸分子(例如,双链DNA、单链DNA、ds/ss RNA(例如,siRNA、反义、核酶),或三螺旋核酸分子或化学物。治疗剂可以是源自任何已知生物(包括但不局限于动物、植物、细菌、真菌、原生生物或病毒)或源自合成分子文库的天然产物。治疗剂可以是单体化合物和多聚体化合物。

[0158] 如上所述,该治疗剂可以是蛋白质,如补偿内源性酶,如不足会导致Tay-Sachs病的酶己糖胺酶A的活性降低或表达低下的酶。

[0159] 可以穿过血屏障递送到脑、眼、睾丸或乳腺的治疗剂实例包括,但不局限于,抗生素药剂、抗肿瘤药剂、消炎药剂、抗寄生虫药剂、抗真菌药剂、抗分支杆菌药剂、抗病毒药剂、抗凝血剂、放射治疗剂、化疗药剂、细胞毒性药剂、细胞生长抑制剂、血管扩张剂、抗氧化剂、兴奋剂、抗惊厥剂、抗组胺剂、神经营养药剂、心理治疗剂、抗焦虑镇静剂、刺激剂、镇静剂、镇痛剂、麻醉剂、节育剂、神经递质药剂、神经递质模拟剂(neurotransmitter analog agent)、净化剂(scavenging agent)和生育增强剂。

[0160] 脂质体包埋的化合物也可以是诊断剂如显像剂或造影剂(contrast agent)如钆和钨,酶如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶,含有钆的MRI造影介质,含有碘的X射线造影介质,超声造影介质(ultrasonography contrast media)如CO₂,钨衍生物,荧光物质如羧基荧光素和照明剂(发光体,illuminant)如N-甲基吡啶盐(N-methylacrydium)衍生物。

[0161] 一旦形成脂质体(即,带有或不带有药剂),就可以对它们的尺寸分布、组成、浓度、Z电位、表面电位(electrical surface potential)、表面(局部)pH、蛋白质与脂质的比率,以及体外和体内的治疗功效进行表征。

[0162] 本发明实验测试的脂质体具有下表2中描述的下列尺寸值:

[0163] 表2

[0164]

未PEG化:	PEG化:
平均数目 (Avg. by number): 30nm	平均数目: 100nm
平均体积 (Avg. by volume): 200nm	平均体积: 215nm
聚集因子: $200/30 = 7$	聚集因子: $215/100 = 2$

[0165] 空脂质体或者包含本发明一种或多种药剂的脂质体的尺寸范围优选为30-3000-nm,更优选50-500nm,更优选30-300nm,更优选50-200nm,且更优选70-150nm。较小或约100-nm的脂质体的优点在于它们能够渗透通过非常狭窄的血管,这对于诊断和治疗非常重要。

[0166] 可以利用本领域中已知的任何方法测定脂质体的尺寸。例如,可以使用利用激光光散射的Nicomp Submicron Particle Sizer(370型号,Nicomp,Santa Barbara, Calif.)。测量脂质体尺寸的其它方法包括光子相关光谱法、激光衍射法、小角激光光散射法(LALLS)、中角激光光散射法(MALLS)、光阻法(light obscuration)(例如Coulter法)、流变学,或显微术(光或电子)。优选的有效平均颗粒尺寸取决于这些因素,如该化合物的预期给予途径、剂型(formulation)、溶解性、毒性和生物利用率。

[0167] 下面提供了实验测试的脂质体的Z电位值。未PEG化的CDL:-17.9~-15.5mV。

[0168] PEG化(空胞-间接):-13.2mV。PEG化(CDL-直接):-10.2mV。

[0169] 因而,本发明脂质体的特征为:其在未PEG化时的z电位为-20~-15mV,其在PEG化时的Z电位为-15~-10mV。

[0170] 如所述的,本发明脂质体有利地用于临床中。

[0171] 因而,根据本发明的方面提供了递送药剂的方法,该方法包含给需要其的对象给予上述脂质体,其中该药剂包封在其中或者吸附在其上,从而递送该药剂。

[0172] 根据实施方式,该细胞是靶细胞,且该脂质体包含靶向部分,该靶向部分是如上所述化学结合的、异源添加的,或自然存在于脂质体由其构成的膜中(例如,如在向肿瘤细胞迁移的MSC中)。

[0173] 该脂质体的细胞来源可以是对象自体或非自体的(例如,异体、异种)。

[0174] 本文提到的“靶细胞”是将利用脂质体向其中递送物质的细胞或细胞簇(同源或异源群体的细胞簇)和/或组织。其实例包括癌细胞、血管新生癌组织的血管内皮细胞、癌症干细胞、癌症组织的间质细胞、受累于遗传异常的细胞、受病原体感染的细胞等。“靶分子”可以是呈递在靶细胞或与靶细胞相邻的细胞表面上的任何分子。靶分子的另一种形式包括由细胞释放的分子。其实例包括细胞外基质组分、癌细胞或癌组织间质细胞的分泌物或架构(architecture),且其具体实例包括肿瘤标记、细胞之间的结构等。

[0175] 递送可以出于诊断原因(例如,该脂质体包括诊断剂)或出于治疗目的(即,作为递送治疗剂的药物递送工具)。

[0176] 该脂质体可以单独(自身)地或者作为药物组合物的一部分给予给对象。

[0177] 如本文使用的“药物组合物”是指含有本文描述的一种或多种活性成分和其它化学组分如生理上适合的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的在于使活性成分容易给予对象。

[0178] 本文的术语“活性成分”是指可引起生物效应的治疗剂(带有或不带有脂质体)。应理解,该脂质体本身可以具有免疫调节功能,如当由MSC膜或其它免疫调节细胞(例如,免疫B和T淋巴细胞等)制备时。还应理解,由于与靶细胞膜融合以及随后对细胞膜、细胞骨架和功能造成破坏,该脂质体本身可以对靶细胞有细胞毒效应。在此种情况下,采用加入靶向部分的措施以便使该细胞毒效应变得有特异性。

[0179] 下文中,短语“生理可接受载体”和“药物可接受载体”可以互换使用,是指不会给对象造成显著的刺激性而且不会消除所给予活性成分的生物活性和特性的载体或稀释剂。佐剂包含在这些术语中。

[0180] 本文中,术语“赋形剂”是指加入到药物组合物中从而进一步使本发明活性成分容易给予或者增大保存期稳定性的惰性物质。赋形剂的实例包括,但不局限于碳酸钙、磷酸

钙、各种糖类和盐类及各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、EDTA、EGTA、聚-L-赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚凝胺 (polybrene) (溴化己二甲胺)、聚乙二醇和其它聚或单一阴离子。该药物组合物可以有利地采用泡沫、气溶胶或凝胶形式。

[0181] 药物的调配和给予技术可以在“Remington’s Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing公司,Easton,PA,最新版中找到,该文献通过引用合并在此。

[0182] 合适的给予途径包含各种合适的全身和/或局部给予途径中的任一种。

[0183] 合适的给予途径可以,例如包括吸入、口服、颊部、直肠、经粘膜、外用、经真皮、真皮内、经鼻、肠和/或肠胃外途径;肌内、皮下和/或髓内注射途径;鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内和/或眼内注射途径、利用或不利用血管造影球囊 (angio balloon) 的导管插入术 (Catheterization), 和/或直接注射到对象组织区域中的途径。

[0184] 该药物组合物可以通过本领域熟知的工艺制造,如通过常规的混合、溶解、造粒、包糖衣、研粉 (levigating)、乳化、制成胶囊、包埋或冷冻干燥 (冻干) 工艺。

[0185] 根据本发明使用的药物组合物可采用常规方法利用一种或多种使活性成分容易加工成可以药用的制品、包含赋形剂 (excipient) 和辅助物 (辅剂, auxiliary) 在内的生理可接受载体调配。合适的剂型取决于所选的给予途径。

[0186] 对于注射,该药物组合物的活性成分可以调配在水溶液中,优选在生理相容性缓冲液如汉克溶液、林格氏溶液,或生理盐缓冲液中。

[0187] 对于经粘膜给予,在配方中使用适合于待渗透屏障的穿透剂 (penetrant)。此种穿透剂一般在本领域中是已知的。

[0188] 对于口服给予,该药物组合物可以容易地通过将活性成分与本领域熟知的药物可接受载体结合而调配。此种载体使该药物组合物能够调配成供病人口服摄取的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、混悬剂等。口服使用的药物制品可利用固体赋形剂制造,可选地研磨所得混合物,需要时可加入合适的辅助物并在此后对颗粒混合物进行处理,从而获得片剂或糖衣核。合适的赋形剂为,特别是,填充剂如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇,纤维素制品如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、羧甲基纤维素钠,和/或生理上可接受的聚合物如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。如果需要,可加入崩解剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂,或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

[0189] 糖衣核 (dragee core) 具有合适的包衣。为此目的,可使用浓缩的糖溶液,其可以可选地包含阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或色素加入到片剂或糖衣丸包衣中,以便鉴定或表征不同的活性化合物剂量组合。

[0190] 可口服使用的药物组合物,包括明胶制成的推入配合胶囊 (push-fit capsule), 以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。推入配合胶囊可包含与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉、润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁,和可选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性成分可以溶解于或悬浮于合适的液体中,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可加入稳定剂。所有口服给予的制剂的剂量应适合于所选的给予途径。

[0191] 对于颊部给予,该组合物可采用按常规方法调配的片剂或含片的形式。

[0192] 对于通过吸入途径给予,根据本发明使用的活性成分可以气溶胶/喷雾形式递送,

该气溶胶/喷雾是从加压包或喷洒器,借助于合适的抛射剂(推进剂,propellant),例如氟氯烃如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷,二氧化碳,或挥发性烃如丁烷、丙烷、异丁烷或其混合物呈递的。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可通过提供用于递送计量的量的阀门确定。可将用在分配器中的例如明胶制成的胶囊和药筒(cartridge),调配成包含该活性成分与合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0193] 该药物组合物可以调配用于肠胃外给予,例如通过推注或连续输注给予。注射用制剂可以单位剂量的形式呈递,如,在安瓿或在多剂量容器中,其中可选地加入防腐剂。该组合物可以是油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液,或乳液,并可包含调配剂如悬浮剂、稳定剂,和/或分散剂。

[0194] 用于肠胃外给予的药物组合物可以包括水溶性形式的活性成分水溶液。另外,可将该活性成分的悬浮液配制成适当的油性或基于水的注射悬浮液。合适的亲脂溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射悬浮液可包含增大悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇,或葡聚糖。可选地,该悬浮液还可包含合适的稳定剂或增大活性成分的溶解度从而允许制备高度浓缩的溶液的试剂。

[0195] 替换地,该活性成分可以是粉末形式,在使用前用合适的媒介物如无菌的基于无热源水的溶液进行配制。

[0196] 该药物组合物还可利用如常规栓剂基质如可可豆油或其它甘油酯,调配成直肠组合物如栓剂或保留灌肠剂(retention enemas)。

[0197] 该药物组合物应包含对治疗疾病有效的量的活性成分。

[0198] 治疗有效量的确定完全在技术人员的能力范围内,尤其是在阅读本文提供的详细公开内容之后。

[0199] 对于本发明方法中使用的任何制剂,治疗有效量或剂量可以根据体外和细胞培养物和体内分析加以评价。例如,可以在动物模型中调配剂量从而获得期望的浓度或滴度(滴定度,titer)。此种信息可以用于更准确地确定对人有用的剂量。

[0200] 本文描述的活性成分的毒性和治疗效能可通过体外、细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定。可利用从这些体外和细胞培养物分析及动物研究中获得的数据,调配用于人的剂量范围。该剂量可随着采用的剂型和利用的给予途径而改变。确切的制剂、给予途径和剂量可由个人医生根据患者的病况加以选择(参见如Fingl等人,1975,"The Pharmacological Basis of Therapeutics",Ch.1p.1)。

[0201] 剂量和时间间隔可单独地调整从而为血浆或脑提供足以获得期望治疗效果的水平活性成分(最低有效浓度,MEC)。对于每种制剂,MEC有所不同,但可根据体外数据评价。达到MEC所需的剂量取决于个体特征和给予途径。可利用检测试验测定血浆浓度。

[0202] 根据受治疗病况的严重性和反应(responsiveness),可进行单剂量或多剂量给予,持续几天至几周的治疗疗程,或直到实现治愈或病情减轻。

[0203] 该组合物的给予量将取决于受治疗对象、疼痛严重性、给予方式,处方医生的判断等。

[0204] 本发明组合物如果需要可放置在包装或分配装置,如FDA批准的试剂盒中,其可包含含有活性成分的一种或多种单位剂量形式。该包装可包含,例如,金属或塑料箔,如泡罩包装(blister pack)。该包装或分配器装置还可附有给予说明。该包装或分配器还可提供

与该容器相关的由管理药物制造、使用或销售的政府部门所规定的形式的通知,该通知证明了该组合物的形式或人用或兽用已被政府部门批准。此通知,例如,可以是美国食品和药品管理局对于处方药批准的标签或者是已批准的产品插页。

[0205] 如本文使用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0206] 术语“包含”、“包含的”、“包括”、“包括的”、“具有”,和它们的词形变化形式意思是指“包括但不限于”。

[0207] 术语“由……组成”是指“包括并限于”。

[0208] 术语“基本上由……组成”意思是指组合物、方法或结构可包括另外的成分、步骤和/或部分,但仅该另外的成分、步骤和/或部分不能实质性地改变要求保护的组合物、方法或结构的基本特征和新特征。

[0209] 如本文使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0210] 在整篇专利申请中,本发明的各种实施方式可以范围形式呈现。应当理解范围形式的描述仅是为了方便和简洁,而不应该理解为对本发明范围的硬性限制。因此,范围的描述应视为已具体地公开了所有可能的子范围以及在此范围内的各个数值。例如,如从1至6的范围描述应视为已具体地公开了诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等的子范围,以及在此范围中的各个数值,例如,1、2、3、4、5,和6。不论范围宽度如何,这都能适用。

[0211] 当本文中指出了数值范围时,其意在包括在所指范围内的任何提及数字(分数或整数)。本文中的表达在第一个指定数和第二个指定数之间的“范围”与从第一个指定数“至”第二个指定数的“范围”可互换使用,意在包括第一和第二个指定数及其间的所有分数和整数。

[0212] 如本文使用的术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、方法、技术和程序,包括但不限于,化学、药学、生物学、生物化学和医学领域技术人员已知,或易于从已知方式、方法、技术和程序开发出那些方式、方法、技术和程序。

[0213] 如本文使用的术语“治疗”包括消除、基本上抑制、减慢或逆转病况的进展,基本上改善病况的临床或美学(aesthetical)症状或者基本上阻止病况的临床或美学病况的出现。

[0214] 应理解,为清楚起见而在单独实施方式的上下文中描述的本发明某些特征,也可结合提供在单个实施方式中。相反,为简洁起见而在单个实施方式的上下文中描述的本发明的多种特征,也可单独地或以任何合适的子组合形式,或作为适合于本发明的任何其他被描述的实施方式提供。在各个实施方式的上下文中描述的某些特征不应被认为是这些实施方式的必需特征,除非这些实施方式没有这些元素(元件)时是无效的。

[0215] 如上文所描绘的和如下面权利要求部分所要求保护的本发明的各种实施方式和方面将在下面的实施例中找到实验支持。

[0216] 实施例

[0217] 现在参考下面的实施例,结合上面的描述以非限制方式阐述本发明的一些实施方式。

[0218] 一般地,本文使用的术语和本发明利用的实验操作程序包括分子、生物化学、微生物学,和重组DNA技术。此类技术在文献中有详尽的解释。参见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook等人,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”卷I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide toMolecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson等人,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等人(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,卷1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);如美国专利No.4,666,828;4,683,202;4,801,531;5,192,659和5,272,057中列出的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,卷I-III Cellis,J.E.,ed.(1994);“Current Protocols in Immunology”卷I-III Coligan J.E.,ed.(1994);Stites等人(eds),“Basic and Clinical Immunology”(第8版),Appleton& Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman and Co.,New York(1980);可用的免疫分析法详述在专利和科学文献中,参见,例如,美国专利No.3,791,932;3,839,153;3,850,752;3,850,578;3,853,987;3,867,517;3,879,262;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;4,098,876;4,879,219;5,011,771和5,281,521;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.,ed.(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,eds.(1985);“Transcription and Translation”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,Eds.(1984);“Animal Cell Culture”Freshney,R.I.,ed.(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)and“Methods in Enzymology”卷1-317,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等人,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);其中的所有文献都通过引用合并在此如同全部列出在此。其它一般性参考文献遍及本文。其中的程序被认为是本领域熟知的,仅为了便于读者阅读而提供。包含在其中的所有信息都通过引用合并在此。

[0219] 实施例1

[0220] MSC迁移和靶向能力的表征(characterization)

[0221] 人MSC购自Lonza®(瑞士),并利用吉姆萨染色和人间充质干细胞(hMSC)典型的细胞表面标记的FACS分析进行表征。如图1A-1C所示,该细胞似乎对CD90、CD105、CD44和CD29呈阳性,而对CD133、CD31、CD34和CD144呈阴性,如对hMSC预期的一样。

[0222] 还测试了hMSC朝向癌细胞迁移的能力。在这些实验中,用红色荧光染料(DiI)标记hMSC,同时用绿色荧光染料(DiO)标记数种其它细胞系(包括前列腺癌细胞系-PC3)。将标记的细胞逐滴接种于组织培养板中,温育72小时并利用Maestro体内显像仪(in vivo Imager)显像(图2)。如所看到的,表明hMSC朝向PC3癌细胞特异性迁移,同时“避开”与其它细胞系(BHK、Cf2Th和COS-7)相互作用。

[0223] 另外进行了验证调整hMSC对乳腺癌细胞系MCF7的靶向能力的实验。对此,人hMSC用或不用MCF7来源的调整培养基培养,用DiI(红色)标记,并与用DiO(绿色)标记的MCF7细

胞一起共培养。温育2小时后,洗涤培养物,利用荧光显微镜图像分析测定每种细胞类型和细胞重叠(细胞覆层, cell overlay) (黄色)的覆盖范围。假设DiI与DiO的重叠是由于这两种细胞类型的物理相互作用引起的,那么重叠百分比可以代表这两种细胞类型的膜相互作用量。如图3所示,调整hMSC与MCF7细胞一起温育将导致总细胞覆盖范围中有7%重叠(覆层, overlay),相比之下,在利用未调整hMSC时无重叠发生($p < 0.001$)。这种明显的靶向性显然不同于图2中描述的迁移,因为它主要由hMSC与癌细胞之间的膜相互作用控制,而不依据很大程度上受可溶性因子介导的hMSC的迁移能力。

[0224] 实施例2

[0225] 从hMSC制备的细胞来源的脂质体表征

[0226] 细胞来源的脂质体制备-收获约 10^7 个细胞,用PBS洗涤。然后通过将细胞在4℃下重悬于冰冷的pH 7.4Tris-镁(TM缓冲液,0.01M Tris,0.001M $MgCl_2$)中15min,对该细胞进行低渗处理。低渗处理后,用定转子机械均质机(rotor-stator mechanical homogenizer) (IKA®, Taquara, RJ, Brazil)以22,000rpm均质化细胞1min,使该细胞变成空胞(通过位相显微术证实95%的细胞膜破裂)。为了使空胞悬浮液稳定,立即在该悬浮液中加入60% (w/w) 蔗糖溶液从而使终浓度为0.25M或按体积计为10%。然后4℃下以3000rpm离心空胞15min。弃去上清液,用含0.25M蔗糖的pH 7.4TM缓冲液洗涤空胞球粒两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。为了获得超声处理的空胞,将重悬的球粒用VibraCell VCX750 (Sonics&Materials Inc., Newtown, CT)以27%的振幅超声处理5秒,并在4℃下以3000rpm离心15min。超声处理的空胞球粒然后再次用含有0.25M蔗糖的pH 8.6TM缓冲液洗涤两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。为了形成单层脂质体,手动使超声处理的空胞重悬球粒连续21次通过孔隙尺寸为0.4 μ m和0.1 μ m的聚碳酸酯膜(Osmonics Inc., Minnesota USA)挤出。所挤出的脂质体然后在4℃下以150,000g离心45min。弃去上清液,用pH 8.6的TM缓冲液重悬所得脂质体球粒。

[0227] 细胞来源的脂质体表面蛋白质PEG化(根据Croyle, M.A.等人,2004描述的方法)-收获约 10^7 个细胞,用PBS洗涤。然后通过将细胞在4℃下重悬于冰冷的pH 7.4Tris-镁(TM缓冲液,0.01M Tris,0.001M $MgCl_2$)中15min,对该细胞进行低渗处理。低渗处理后,用定转子机械均质机(IKA®, Taquara, RJ, Brazil)以22,000rpm均质化细胞1min,使该细胞变成空胞(通过位相显微术证实95%的细胞膜破裂)。为了使空胞悬浮液稳定,立即在该悬浮液中加入60% (w/w) 蔗糖溶液从而使终浓度为0.25M或按体积计为10%。然后4℃下以3000rpm离心空胞15min。弃去上清液,用含0.25M蔗糖的pH 7.4TM缓冲液洗涤空胞球粒两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。为了获得超声处理的空胞,将重悬的球粒用VibraCell VCX750 (Sonics&Materials Inc., Newtown, CT)以27%的振幅超声处理5秒,并在4℃下以3000rpm离心15min。超声处理的空胞球粒然后再次用含有0.25M蔗糖的pH 8.6TM缓冲液洗涤两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。为了形成单层脂质体,手动使超声处理的空胞重悬球粒连续21次通过孔隙尺寸为0.4 μ m和0.1 μ m的聚碳酸酯膜(Osmonics Inc., Minnesota USA)挤出。所挤出的脂质体然后在4℃下以150,000g离心45min。弃去上清液,用pH 8.6的TM缓冲液重悬所得脂质体球粒。

[0228] 利用Bradford蛋白质分析法测定该脂质体表面上的蛋白质含量,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准。琥珀酰亚胺基琥珀酸酯活化的单甲氧基-PEG得自Sigma Chemicals

(St.Louis,Mo.),将它以与前面利用Bradford分析法测得的脂质体蛋白质含量10:1的比例加入到该重悬的脂质体中。例如,每1 μ g蛋白质加入10 μ g单甲氧基-PEG。在25 $^{\circ}$ C通过轻轻地搅动进行单甲氧基-PEG与脂质体之间的结合反应。通过加入相对于所加入单甲氧基-PEG量的10X的L-赖氨酸(Sigma Chemicals)终止反应。在用pH 8.6的TM缓冲液平衡的Micro-Bio Spin P-30色谱柱(Bio-Rad)上,通过更换缓冲液除去未反应的游离PEG、过量的赖氨酸和反应副产物。

[0229] CDL FACS分析.材料-耦合缓冲液-用于预先洗涤和使Dynabeads M-280结合到脂质体上。该缓冲液由0.1M pH 7.4的钠磷酸盐缓冲液,溶解在蒸馏水中并调节至1升的2.62g NaH₂PO₄·H₂O(MW 137.99)和14.42g Na₂HPO₄·2H₂O(MW 177.99)组成。洗涤、封闭和储存缓冲液-含有0.1% (w/v) BSA的pH 7.4的PBS:在80ml 0.01M pH 7.4的钠磷酸盐中加入0.88g NaCl(MW 58.4)和0.1% (w/v) BSA。充分混合并用0.01M pH 7.4的钠磷酸盐(Na-phosphate)调节体积至100ml。

[0230] 方法:按前面描述的方法从2 \times 10⁷个hMSC制得脂质体。使用甲苯磺酰基活化的顺磁Dynabeads[®]M-280(invitrogen),因为它们可以与任何蛋白质和/或与蛋白质结合的脂质体非特异性地共价结合,而且稍后可以通过流式细胞术进行分析。利用磁力分离设备(MACS,Dynal[™] Magnetic Particle Separator-Invitrogen),用耦合缓冲液(coupling buffer)洗涤该珠粒。为了增大它们与蛋白质结合的能力,然后进一步用添加到耦合缓冲液中的3M硫酸铵洗涤该珠粒。然后,准备4个含有10⁷个珠粒的样品,分别为:仅珠粒、珠粒与脂质体、珠粒与第二抗体标记的脂质体(同种型对照),以及与用第一抗体和第二抗体标记的脂质体结合的珠粒(测试样品)。在每个样品中添加约5 \times 10⁶个细胞等效脂质体。然后在4 $^{\circ}$ C下温育脂质体和珠粒至少12小时。附连后,将样品重悬在洗涤\封闭缓冲液中。将每个样品悬浮在200 μ l总体积中。首先,将小鼠MAB抗人CD29、CD44、CD90或CD105以1:100的比率加入到合适的样品中。RT下温育样品30min。接着,利用磁力设备洗涤样品两次。然后加入第二AB(FITC-结合的山羊抗小鼠抗体)并在RT下避光温育样品30min。所有抗体,第一抗体和第二抗体都购自BD-Becton,Dickinson and Company。如前所述洗涤样品后,对样品进行电泳(run)并利用FACSCalibur和CellQuest Pro(BD)进行分析。

[0231] 结果

[0232] 预期PEG化细胞来源的脂质体(PEG-CDL)将受到保护而免遭调理(opsonization)和降解,因而具有隐形特性(stealth property)和较长的体内循环时间。而且,PEG化可以降低脂质体与非靶细胞一样以非特异性方式结合和融合的风险¹⁷⁻¹⁹。

[0233] CDL的低温TEM显像表明,PEG化对CDL的理想小单层形态没有明显影响(图4A-4B)。然而,与在相同浓度和在相同条件下显像的未PEG化脂质体(图4B)相比,PEG化脂质体(图4A)的分散性似乎更大,而凝聚性似乎更小。明显地,PEG化不但不会损坏脂质体的形态,而且它还可以提高它们的分散性和稳定性。利用数量重量和体积重量DLS分析(Dynamic Light Scattering,Malvern Nanosize)进一步分析CDL的尺寸和尺寸分布。虽然数量重量DLS分析(图5A)表明PEG化之后脂质体的尺寸增大(从~30nm增大至~100nm),但体积重量DLS分析(图5B)表明PEG的加入对该系统有均质化作用,因而脂质体尺寸分布有着显著的降低。显然,PEG基团的加入稳定了该系统并阻止聚集,尽管Z电位从-17.9mV下降到-10.2mV(图5C)。

[0234] 最后,通过FACS分析(图6)证实了MSC特异性表面标记在hMSC来源的脂质体上的表达。如所示的,该CDL保留了它们的细胞质膜对称性和正确定向(correctly oriented)的典型hMSC表面标记(即,CD44、CD29、CD90和CD105)的表达。

[0235] 实施例3

[0236] CDL结合并特异性靶向癌细胞系

[0237] 利用共聚焦显微镜成像和流式细胞术分析确定从hMSC制备的,荧光标记的CDL与前列腺癌细胞(PC3)的结合。如图7A所示,大多数囊泡有利于细胞结合。另外,该囊泡在细胞膜内被检测到,并与该细胞膜融合(图7A)。

[0238] 流式细胞术分析表明,大多数细胞以浓度依赖方式(图8A)结合囊泡,因而使得脂质体结合程度可以根据细胞的平均荧光强度确定。

[0239] 为了测试对癌细胞系的特异靶向性,从之前已与源自前列腺癌细胞系(PC3),和源自非人细胞系(BHK)的调整培养基温育24小时的hMSC制备DiI标记的CDL。将所得的“调整”CDL,以及从未调整hMSC制备的CDL(对照)与PC3和BHK细胞温育15min、1小时和3小时。温育后,洗涤、收获并通过流式细胞术分析细胞(图9)。

[0240] 给定特定调整培养基(无CM、BHK-来源和PC3-来源)和温育时间(15min、1小时和3小时),根据下面公式计算每个实验的特异性指数:

$$[0241] \quad (\text{特异性指数}) = \frac{\frac{\text{与 CDL 温育后标记中的 PC3 细胞}\%}{\text{在无 CDL 存在时标记中的 PC3 细胞}\%}}{\frac{\text{与 CDL 温育后标记中的 BHK 细胞}\%}{\text{在无 CDL 存在时标记中的 BHK 细胞}\%}}$$

[0242] 特异性指数结果概括在下表3中,该结果不但表明该系统对癌细胞表现出特异性,而且这种特异性,与预期的一样,随着温育时间降低。另外,特异性指数值表明,该系统对癌细胞的特异亲和性很大程度上受到在CDL制备之前将细胞暴露于各种调整培养基中这一处理的影响。

[0243] 表3-CDL与前列腺癌PC3细胞系结合的特异性指数

[0244]

hMSC调整培养基	CDL 与 PC3 和 BHK 细胞的温育时间		
	15 min	1 小时	3 小时
无 CM	1.91	1.50	1.25
BHK 来源的	3.45	3.43	1.10
PC3 来源的	2.92	2.31	1.50

[0245] 实施例4

[0246] 在CDL内的蛋白质包埋

[0247] sTRAIL生产

[0248] 培养基和缓冲液-从16gr Bacto™胰化蛋白胨(Tryptone)(BD货号:211705)、10gr Bacto™酵母抽提物(DIFCO货号:212750)和5gr NaCl(化学纯)制备IL 2YT培养基。用于在Petri培养皿中进行培养的培养基含有位于上面组分之上的16gr Agar Granulated(DIFCO货号:214530)。对该培养基进行高压灭菌。用2gr KCl、2.4gr KH₂PO₄、14.4gr Na₂HPO₄ · 7H₂O

和80gr NaCl制备PBSX10。用DDW将体积调节至1L,并通过0.2 μ m过滤器(滤膜,filter)对缓冲液过滤灭菌。

[0249] 质粒、DNA、细菌和抗生素-pGEX-2TK质粒中的GST-sTRAIL编码DNA由Bethesda, MD的Stanley Lipkowitz博士友情提供,利用100 μ g/ml氨必西林(Ampicillin)作为选择剂将该质粒导入到大肠杆菌BL21中。从溶解在超纯DDW(UP-水)中至终浓度为100mg/ml的氨必西林钠盐(Sigma货号:A9518)制备氨必西林储液,并通过0.2 μ m过滤器过滤。

[0250] 另外的材料:乙醇99%脱水(FRUTAROM货号:2355516400);D(+)葡萄糖(Sigma货号:G5146);IPTG(Ornat Biochemicals货号:INA-1758-1400);Complete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂鸡尾酒片(EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablet)(Roche Applied Science货号:04693159001);DTT-DL-二硫苏糖醇溶液(Sigma货号:43816);GSH珠(GE Healthcare);谷胱甘肽-琼脂糖凝胶4B(10ml,Danyel Biotech货号:17-0756-01);和L-还原型谷胱甘肽(Sigma货号:G4251)。

[0251] 设备:Amicon Ultra-15离心过滤器(Millipore货号:UFC901024)和French Press细胞破碎系统。所有溶液都通过0.2 μ m过滤器过滤灭菌;第2天(步骤4,IPTG 0/N诱导之后的细菌球粒)之前的所有操作程序都在Sterile Hood中进行。

[0252] Swith 1/100GST-TRAIL甘油储液(例如,在40ml培养基中的400 μ lGST-追踪(trail)甘油储液)。该溶液在37 $^{\circ}$ C,250RPM下的振荡温育器(shaking incubator)中温育0/N。

[0253] 第2天

[0254] 步骤2:使“起子(starter)”培养物在1000g下减速旋转(spin down)15min从而除去该抗生素。弃去上清液,并重悬在40ml新鲜2YT中。在Sterile Hood中,将重悬的40ml步数(步骤号,step number)1中的0/N制品(preparation)添加到4L烧瓶中的2L2YT中(替换地在两支均含1L 2YT的2L烧瓶中加入20ml步数1中的0/N制品重悬球粒)。将该溶液在37 $^{\circ}$ C,250RPM下的振荡温育器中温育2-3小时。应采取措施确保温育时间不超过3小时,直至O.D.值到达2.5-3.0(建议在2小时后测量O.D.₅₉₅)。

[0255] 步骤3:就在IPTG诱导之前,添加PBS至终浓度为0.1X从而维持培养物的pH。添加EtOH(99%脱水)至终浓度为2%(在2L培养物中添加的EtOH为40ml),从而增加蛋白质的溶解度。按10ml/L添加作为碳源的0.5M葡萄糖至终浓度为5mM。

[0256] 步骤4:在该补加的培养物中加入500 μ M IPTG。于20-25 $^{\circ}$ C在振荡温育器(250RPM)中温育培养物过夜。

[0257] 第3天

[0258] 步骤5:以6,000g使细菌形成球粒,持续10min,弃去上清液。利用按1片/10ml PBS补加4个蛋白酶抑制剂片(Roche Applied Science)的40mlPBS,将所有细菌重悬在50ml Falcon管中。

[0259] 步骤6:让来自步数5的细菌两次通过French Press细胞破碎系统,如此使细胞裂解。替换地,取10ml等分试样于50ml管中,在冰上以30%的力(功率,power)超声破碎4次,每次10秒。细胞破碎后,在每40ml细胞裂解液中加入以下物质:0.1%Triton-X(40 μ l TritonX100)、1mMMgCl₂(40 μ l的1M MgCl₂储液)和1mM DTT(40 μ l的1M DTT储液)。充分混合该溶液并于RT在摇摆器或振荡器中温育15min。

[0260] 步骤7:使细菌裂解液在4℃,16,900g下减速旋转10min。吸出上清液,收集在50ml管中。

[0261] 步骤8:与GSH(谷胱甘肽-琼脂糖凝胶4B珠)的结合-取3ml GSH珠于15ml Falcon管中,用PBS洗涤三次。收集上清液,并再次离心,因为有大量珠散落。将洗涤的珠加入到来自步数7的细菌细胞裂解液中,并在4℃翻滚温育1小时。

[0262] 步骤9:使来自步数8的,含有琼脂糖凝胶珠的细菌细胞裂解液在2000RPM下的MULTI CENTRIFUGE CM 6M ELMI中减速旋转1min,从而使蛋白质结合的珠与细胞裂解液分离。收集上清液,再次离心从而使上清液中剩余的琼脂糖凝胶珠(这些琼脂糖凝胶珠在第一次离心中可能没有形成球粒)形成球粒(沉淀,pellet)。将两次离心获得的,含有sTRAIL-结合珠的球粒用5ml PBS洗涤5次,每20ml PBS中补加了0.1% Triton-X100、150mM NaCl和1个蛋白酶抑制剂片。

[0263] 步骤10:GST-sTRAIL的洗脱-如前所述的使该珠粒减速旋转,吸出上清液。加入3ml 50mM在10mM Tris-HCl和100mM NaCl中的谷胱甘肽(pH 8.5)。使每3ml涡旋2min,并将蛋白质洗脱到上清液中。如前所述的吸出上清液,保存上清液。重复执行洗脱操作程序3-4次。

[0264] 步骤11:利用Amicon Ultra-1510K NMWlnumber UFC9010浓缩蛋白质,所得蛋白质的产量为约5mg/L培养物。制得终浓度为0.2mg/ml的sTRAIL。

[0265] sTRAIL包埋-收获约 10^7 个细胞,用PBS洗涤。然后通过将细胞在4℃下重悬于冰冷的pH 7.4Tris-镁(TM缓冲液,0.01M Tris,0.001M $MgCl_2$)中15min,对该细胞进行低渗处理。低渗处理后,用定转子机械均质机(IKA®, Taquara, RJ, Brazil)以22,000rpm均质化细胞1min,使该细胞变成空胞(通过位相显微术证实95%的细胞膜破裂)。为了使空胞悬浮液稳定,立即在该悬浮液中加入60% (w/w) 蔗糖溶液从而使终浓度为0.25M或按体积计为10%。然后4℃下以3000rpm离心空胞15min。弃去上清液,然后用含0.25M蔗糖的pH 7.4TM缓冲液洗涤空胞球粒两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。为了获得超声处理的空胞,将重悬球粒用VibraCell VCX750 (Sonics&Materials Inc., Newtown, CT)以27%的振幅(amplitude)超声处理5秒,并在4℃下以3000rpm离心15min。超声处理的空胞球粒然后再次用含有0.25M蔗糖的pH 8.6TM缓冲液洗涤两次,该洗涤通过重复执行悬浮和4℃下以3000rpm离心15min的操作完成。此后,将sTRAIL加入到悬浮的超声处理空胞(在pH 8.6的缓冲液中)中至终浓度为 $1\mu g/1ml$ 空胞悬浮液。为了形成含sTRAIL的单层脂质体,手动使含sTRAIL的超声处理空胞重悬球粒连续21次通过孔隙尺寸为 $0.4\mu m$ 和 $0.1\mu m$ 的聚碳酸酯膜(Osmonics Inc., Minnesota USA)挤出。所挤出的含sTRAIL脂质体然后在4℃下以150,000g离心45min。弃去含有多余未包封的sTRAIL的上清液,用pH 8.6的TM缓冲液重悬所得脂质体球粒。

[0266] 结果

[0267] TRAIL-肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导剂是II型跨膜蛋白,其可以诱导不同起源的肿瘤细胞凋亡,同时不伤害大多数正常细胞²⁰⁻²⁴。已证明,递送全长和截断的分泌形式的TRAIL(sTRAIL)都可以诱导培养物中和体内的多种癌细胞凋亡^{25,26}。我们利用sTRAIL进行的初步实验包括,制造sTRAIL和使它以 $1\mu g/ml$ 的终浓度被动包封在hMSC CDL内。所得含sTRAIL的CDL的低温TEM显像(图10A,左侧)表明,与在相同条件下制备和显像的空CDL(图10B,左侧)相比,含sTRAIL的CDL内累积有14-20nm蛋白胶粒。在通过数字重新着色使该图像

从灰度变成黑白(图10A和10B,右侧)之后,sTRAIL胶粒甚至更清晰可见。

[0268] 实施例5

[0269] 通过与其它脂质体融合制备“混合(杂合,hybrid)CDL”

[0270] 通过使CDL与其它脂质体(合成或细胞来源的)融合,可以将各种分子(例如,蛋白质、脂质、添加剂和甚至包封物(encapsulates))导入、结合或附连到CDL表面上,从而产生“混合CDL”。例如,由合成的良好界定的脂质制成的脂质体制剂可以在它的表面上与蛋白质结合,或者可以包含期望的包封物。然后,依靠诱导的所述合成脂质体和CDL之间的膜融合,可以形成混合CDL。这些混合CDL包含它们来源于其中的细胞膜的脂质和蛋白质,以及起初在所融合的合成脂质体上调配的脂质和蛋白质。此类在混合CDL上导入“非自然”材料的方法可以用来附连或结合与一些特性相关的任何分子或部分,所述特性不限于脂质体靶向性、治疗效果、诊断效果、致使隐形的特性等。还可以利用此种融合,通过导入合成脂质、添加剂(例如,胆固醇、神经酰胺)等来改变CDL的生物化学或化学物理特性。还可以利用此种融合增大所述CDL的包封率。既然CDL的包封主要受限于被动包封,那么与主动加载高浓度包封物的合成脂质体融合就可以显著提高CDL的包封率。

[0271] 制备合成脂质体的方法在本领域中是熟知的,主要包括使脱水脂质水合(hydration)从而形成层状结构,随后均质化这些层状结构从而形成脂质体。具有所述应用的合成脂质体可以通过本领域中已知的任何方法制造,包括但不限于,溶剂蒸发法、溶剂更换法、清洁剂透析法、挤出法、超声处理法、冷冻干燥法、逆相蒸发法、乙醇/醚注入法、搅动和/或任何其它形式的机械均质法。脂质体可以由多种合成和天然来源的脂质制备,并可以包含或者不包含另外的添加剂(例如,胆固醇、神经酰胺等)。使物质主动包封在此种合成脂质体中的方法主要基于膜pH梯度或主动转运体,此类方法在本领域中也是熟知的,可以用来制取具有高包封率的合成脂质体。

[0272] 使CDL和其它脂质体融合形成“混合CDL”,这可以容易和轻松地通过在脂质体中加入短链游离PEG(-200-500Da)完成。PEG诱导的囊泡融合机制被认为与随后将导致囊泡凝聚和融合的水分活度(water activity)降低和脂质头基脱水有关。也可以在称为电融合的工艺中通过电穿孔人工诱导融合。据认为,这种现象由电穿孔期间形成的积极主动边(energetically active edges)引起,这种积极主动边可以用作使两个双层之间的茎生长成核的局部缺陷点。也可以通过在脂质体混合物(例如,Cymal-5TM、1-S-辛基 β -D-硫代吡喃葡萄糖苷等)中加入清洁剂(通常低于2%),在轻微搅动下温育并随后进行清洁剂透析,完成融合。

[0273] 实施例6

[0274] hMSC空胞和hMSC来源的CDL的蛋白质组学分析

[0275] 方法

[0276] 对含有源自hMSC的空胞细胞和CDL的4个样品进行蛋白质组学分析,所述hMSC受到或未受到源自前列腺癌细胞系(PC3)的培养基的调整。为了制取调整空胞和CDL,在收获之前将hMSC在由50%的源自PC3细胞的调整培养基组成的培养基中温育24小时。然后收获细胞,并通过前面描述的方法制备超声处理的空胞和CDL。将经超声处理的,来自调整和未调整hMSC(10^6 个细胞)的空胞重悬在1ml pH 7.4的TM缓冲液中用于分析。将源自 7×10^6 个调整和未调整hMSC的细胞来源的脂质体重悬在50 μ l pH 8.6的TM缓冲液中。

[0277] 将样品送往TECHNION蛋白质组学中心-以色列科技协会 (Israel Institute of Technology) 进行蛋白质组学分析。简言之,用胰蛋白酶消化样品,通过LC-MS/MS分析所得的肽。通过HPLC分离肽混合物,将其电喷射到离子阱质谱仪 (ion-trap mass spectrometer) (Orbitrap™) 上。进行质谱实验是为了分析肽质量电荷比光谱和测定蛋白质质量。为了进行另外的分析和鉴定,通过碰撞诱导分解 (CID) 将肽进一步片段化,并再次分析。利用Sequest 3.31软件,根据uniprot数据库的人部分,鉴定该肽。所有蛋白质结果都以Uniport登录号给出。为每种蛋白质/登录号测定下列值。

[0278] MW-分子量

[0279] P_{pro}-找到与偶然观察到的匹配一样或者优于它的匹配的概率。为该蛋白质展示的值是最佳肽匹配 (得分最低的肽) 的概率。

[0280] Pep计数-所鉴定肽的总数目。

[0281] 平均值-对每种蛋白质鉴定的前3种肽 (top 3 identified peptides) 峰面积的平均值。

[0282] 平均SE-平均标准误差。

[0283] Med-对每种蛋白质鉴定的所有肽峰面积的中位数 (median)。

[0284] MedErr-中位数绝对偏差 (median absolute deviation)。

[0285] 蛋白质名称。

[0286] 结果

[0287] 从这4个样品中的一个或多个中鉴定出数百种蛋白质,这些蛋白质可以分为以下4个不同的组:

[0288] 1. 普遍存在于所有这4个样品,即调整和未调整空胞及CDL中的蛋白质 (表7),

[0289] 2. 普遍存在于空胞或调整空胞中,但不存在于CDL中的蛋白质 (表5)。这些蛋白质很可能或大多数是没有完全从空胞中除去的细胞质物质残余物。

[0290] 3. 仅在调整空胞和CDL中普遍存在的蛋白质 (表6)。这些蛋白质很可能或大多数是仅在诱导或暴露于调整培养基中之后才被表达的膜蛋白质。

[0291] 4. 在除从未调整hMSC制得的CDL之外的所有样品中都普遍存在的蛋白质 (表7)。这些蛋白质很可能或大多数是在未调整hMSC上低水平表达而在来源于它们的CDL上完全耗尽的膜蛋白质。用调整培养基诱导hMSC很可能将这些蛋白质水平升高至使它们在调整CDL上变得更明显的程度。

[0292] 表4-普遍存于调整和未调整的空胞和CDL中的蛋白质

[0293]

Uniport登录号	MW	调整CDL相对于未调整CDL的表达倍数	蛋白质名称
P04179	24706.6	30	膜突蛋白
P62899	14453.9	26	肌球蛋白调节轻链12A
P09622	54143.1	26	钠/钾转运ATP酶亚基 α -1
P02545	74094.8	24	40S核糖体蛋白S28
P05023	112824.1	14	整联蛋白 β -1
P11142	70854.4	14	组织蛋白酶D
P62701	29579.1	12	硫化物: 醌氧化还原酶
P07602	58073.9	12	组蛋白H4
P21589	63327.6	11	主要穹窿蛋白
P27797	48111.9	10	角蛋白
O75396	24724.8	10	延伸因子2
P13674	61011.1	10	Erlin-2
P24752	45170.7	9	60S核糖体蛋白L4
P30044	22012.5	9	60S核糖体蛋白L18a
P51659	79636.4	9	40S核糖体蛋白S21
P61604	10924.9	8	肌动蛋白
P17301	129213.8	8	乙酰CoA乙酰基转移酶
P38117	27826.2	8	含有富含亮氨酸的PPR基序的蛋白
P10809	61016.5	8	Ras-相关蛋白Rab-7a
P14314	59387.9	7	长醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基2
P62736	41981.8	7	60S核糖体蛋白L14
Q96D15	37470	7	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白3

[0294]

P62241	24190.2	7	膜联蛋白(Annexin)A4
Q9Y2Q3	25480.3	7	长醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基1
P02786	84818*	7	丙酮酸激酶同工酶M1/M2
P38646	73634.8	7	40S核糖体蛋白S19
P62829	14856.1	7	膜联蛋白A2
Q9H4B7	50294.6	7	网钙结合蛋白-3
P40926	35480.7	7	过氧化物酶基因(Peroxiredoxin)-1
P08648	114464.9	7	苹果酸脱氢酶
P07237	57080.8	7	戊烯半胱氨酸氧化酶1(prenylcysteine oxidase1)
Q70UQ0	39285	7	40S核糖体蛋白S4
Q9NZM1	234558.8	7	激活剂前体多肽
Q07020	21621.1	7	热休克同源71kDa蛋白
P30040	28975.2	6	整联蛋白 α -V
Q09666	628705.2	6	膜联蛋白A11
Q32P28	83341.2	6	60S核糖体蛋白L7a
Q15155	134267.4	6	丝氨酸羟甲基转移酶
P04040	59718.9	6	微管蛋白 α -1B链
P30048	27675.2	6	60S核糖体蛋白L26-样1
P68104	50109.2	6	整联蛋白 α -2
Q00325	40068.8	6	Myoferlin
P30443	40820.2	6	三官能酶亚基 β
P06756	115964.5	6	硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶
Q15149	531465.9	6	ATP合酶亚基O
P16615	114682.7	6	延伸因子Tu
P14625	92411.2	6	60S核糖体蛋白L11
P19105	19781.5	6	60S酸性核糖体蛋白P0-样
P34897	55957.8	6	40S核糖体蛋白S3
P45880	31546.5	6	信号识别颗粒受体亚基 β
Q15118	142073.5	6	SerpinH1
P62805	11360.4	6	异柠檬酸脱氢酶[NADP]
Q99536	41893.5	6	内质蛋白(内质网素, endoplasmic)
P36957	48698.6	6	微管蛋白 β 链
P02751	262439.5	5	CD44抗原
P13639	95277.1	5	60S核糖体蛋白L30
P49411	49510.2	5	60S核糖体蛋白L12
Q00610	191491.7	5	网蛋白-1
P55072	89265.9	5	醛缩酶X
P21281	56465	5	ATP合酶亚基 α
Q16698	36044.8	5	胶原蛋白 α -1(I)链
P26038	67777.9	5	40S核糖体蛋白S8
P14854	10185.7	5	ATP合酶亚基d
P50454	46411.3	5	Erlin-1
P08670	53619.2	5	囊泡运输蛋白SEC22b
Q13423	113822.9	5	前胶原蛋白赖氨酸
P62847	15413.4	5	突触囊泡膜蛋白VAT-1同源物
P00505	47445.3	5	蛋白质二硫键异构酶(disulfide isomerase) A6
P05556	88357	5	尼曼匹克C1蛋白(Niemann-Pick C1 protein)

[0295]

P30837	57202.3	5	膜联蛋白A1
P13667	72887.1	5	细胞色素c氧化酶亚基6B1
P06733	47139.4	5	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白2
P68363	50119.6	5	10kDa热休克蛋白
Q15084	48091.3	5	血红素加氧酶1
P04844	69241.1	5	溶酶体膜蛋白2
P36578	47667.5	5	60S核糖体蛋白L22
P11021	72288.5	5	二肽基肽酶4
Q60568	84731.7	5	ATP合酶亚基β
P04406	36030.4	5	角蛋白
Q95816	23757.2	5	钙网织蛋白(Calreticulin)
Q04837	17249	5	60S酸性核糖体蛋白P2
P09601	32798	5	过渡时期内质网ATP酶
Q06830	22096.3	5	核纤层蛋白(Lamin)-A/C
Q9H9B4	35596.4	5	蛋白质二硫键异构酶A3
P09525	35860.1	5	40S核糖体蛋白S5
P16070	81503.4	5	微管蛋白β-1链
P04075	39395.3	5	膜联蛋白A5
P14649	22749.7	5	电子转移黄素蛋白亚基β
Q02809	83497.5	5	肽基脯氨酸反异构酶B
P10606	13686.9	5	胶原蛋白α-1(VI)链
P48735	50876.9	5	易位子关联蛋白亚基δ
P07339	44523.7	5	角蛋白
Q9Y6N5	49928.9	5	过氧化物酶体多功能酶2型
Q7KZF4	101933.6	5	抑制素(Prohibitin)-2
P50213	39566.1	5	含有富亮氨酸重复序列的蛋白59
Q9UNX3	17245.6	5	脯氨酸3-羟化酶1
P14618	57900.2	5	溶酶体相关膜糖蛋白2
Q96AG4	34908.9	5	40S核糖体蛋白S18
P07355	38579.8	4	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(T)亚基β-1
P61803	12488.6	4	二氢硫辛酰脱氢酶
Q13162	30520.8	4	60S核糖体蛋白L5
P63220	9105.6	4	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基β-2-样1
P62263	16262.5	4	60S核糖体蛋白L18
Q14108	54255.6	4	组蛋白H2B型1-B
P63244	35054.6	4	5'-核苷酸酶
P49748	70345.5	4	ADP/ATP转位酶2
P55084	51261.6	4	氨基肽酶N
P42704	157804.6	4	L-乳酸脱氢酶A链
P00338	36665.4	4	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1
Q02543	20748.9	4	葡糖苷酶2亚基β
Q13885	49875	4	膜联蛋白A6
P30101	56746.8	4	ATP合酶亚基δ
P35268	14777.8	4	过氧化物还原酶-5
Q9P2E9	152380	4	极长链特异酰基CoA脱氢酶
P62424	29977	4	低密度脂蛋白受体相关蛋白1
P36543	26128.8	4	核因子κ-B激酶相互作用蛋白抑制剂

[0296]

P62857	7836.2	4	40S核糖体蛋白S24
P62753	28663	4	延伸因子1-u1
Q9UHG3	56603.8	4	天门冬氨酸氨基转移酶
P50914	23417	4	60S核糖体蛋白L13
P60174	26652.7	4	脂肪细胞质膜相关蛋白
P27487	88222.5	4	纤连蛋白
P62269	17707.9	4	肌球蛋白轻链6B
P36542	32975.3	4	转凝蛋白(Transgelin)
P39656	50769	4	含有葡萄糖球菌核酸酶结构域的蛋白1
Q99623	33275.9	4	Sideroflexin-3
P26373	24246.5	4	60S核糖体蛋白L31
Q9HDC9	46450.9	4	磷酸载体蛋白
Q71U36	50103.7	4	ADP/ATP转位酶1
P08865	32833.4	4	溶酶体相关膜糖蛋白1
P00387	34212.7	4	己糖激酶-1
Q9Y5M8	29683.8	4	蛋白质二硫键异构酶A4
P25705	59713.7	4	过氧化氢酶(Catalase)
P23284	23727.5	4	细胞色素c氧化酶亚基5A
P05387	11657.9	4	40S核糖体蛋白SA
P43307	32215.4	4	异柠檬酸脱氢酶[NAD]亚基α
P49755	24960	4	2
P04083	38690	4	微管蛋白β-2C链
P04843	68526.9	4	V-型质子ATP酶亚基E1
P08133	75825.7	4	40S核糖体蛋白S6
P68371	49799	4	V-型质子ATP酶催化亚基A
O75477	38901.4	4	三功能酶亚基α
P21796	30753.6	4	核糖体结合蛋白1
P62873	37353	4	波形蛋白(Vimentin)
P12235	33043.2	4	蛋白S100-A11
P20674	16751.7	4	前胶原蛋白赖氨酸
Q9BWM7	35480.5	4	线粒体内膜蛋白
P23396	26671.4	4	60S核糖体蛋白L23
P05141	32874.2	4	60kDa热休克蛋白
P61247	29925.8	3	A-烯醇酶
Q16891	83626.5	3	含有跨膜emp24结构域的蛋白9
P51571	18986.6	3	胶原蛋白α-2(I)链
O75489	30222.7	3	肉碱网驻留蛋白29
P31930	52612.5	3	细胞色素b-c1复合体亚基1
P48047	23262.7	3	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白3
P62888	12775.7	3	神经母细胞分化相关蛋白AHNAK
P12111	343450.3	3	抑制素(Prohibitin)
Q8NIW5	34342.7	3	40S核糖体蛋白S14
P12109	108462	3	V-型质子ATP酶亚基B
P30050	17807.5	3	磷酸丙糖异构酶异构酶
P40939	82947	3	糖联蛋白α-5
O75947	18479.5	3	果糖-二磷酸醛缩酶A
P31040	72645.4	3	钙联结蛋白

P19367	102420.2	3	细胞色素b-c1复合体亚基2
P30049	17479.2	3	脯氨酸-4-羟化酶亚基 α -1
P46782	22862.1	3	含有跨膜emp24结构域的蛋白10
P39019	16050.5	3	过氧化物还原酶-4
Q07065	65982.9	3	似口形(Stomatin-like)蛋白2
P35232	29785.9	3	BAG家族分子伴侣蛋白调节因子2
P62913	20239.7	3	肌浆/内质网钙ATP酶2
P06576	56524.7	3	网格蛋白(Clatrin)重链1
P51149	23474.9	3	胶原蛋白 α -3(VI)链
P27824	67526	3	60S核糖体蛋白L9
P31949	11732.8	3	HLA类I组织相容性抗原
P35579	226390.6	3	NADH-泛醌氧化还原酶75kDa亚基
P02452	138826.8	3	多萜基二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶48kDa亚基
Q01995	22596.4	3	多萜基二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基DADI
Q14764	99266.1	3	转铁蛋白受体蛋白1
Q9UJZ1	38510.2	3	40S核糖体蛋白S3a
P08123	129209.8	3	NADEL-细胞色素b5还原酶3
P50995	54355.1	2	Sideroflexin-1
P11279	44853.9	2	肌动蛋白
Q9BVK6	27260.2	2	肌球蛋白-9
P38606	68260.6	2	NAD(P)转氢酶
P08758	35914.4	2	60S核糖体蛋白L7
P28331	79416.7	2	CD59糖蛋白
P15144	109470.8	2	细胞色素c氧化酶亚基5B
P22695	48412.9	2	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
P35908	65393.2	2	谷胱甘肽S-转移酶k1
P35527	62026.7	2	微管蛋白 α -1 A链
Q07954	504243.2	2	2-氧代戊二酸脱氢酶复合体的二氢硫辛酰基赖氨酸残基琥珀酰转移酶成分
P33778	13941.6	2	琥珀酸脱氢酶[泛醌]黄素蛋白亚基
P13645	58791.6	1	细胞骨架相关蛋白4
P60709	41709.7	1	角蛋白
P46777	34340.7	1	应激蛋白70
Q9Y277	30639.3	1	蛋白质二硫键异构酶
P32969	21849.8	1	ATP合酶亚基 γ
P18124	29207.2	1	易位子关联蛋白亚基 α
Q94905	37815.5	1	单链DNA-结合蛋白
P13987	14167.8	1	78kDa葡萄糖调节蛋白
P07437	49639	1	Nodal调节因子1
P13473	44932.3	1	超氧化物歧化酶[Mn]
P04264	65998.9	1	微管蛋白 β -2A链

[0297]

[0298]

表5-普遍存在于空胞或调整空胞中但不存在于CDL中的蛋白质

[0299]

Uniport登录号	MW	在空胞中普遍存在	在调整空胞中普遍存在	蛋白质名称
P78527	468786.9	+	+	肌动蛋白相关蛋白2/3复合体亚基1B
Q99715	332939.7	+	+	rRNA 2'-O-甲基转移酶纤维蛋白(fibrillarln)
Q14573	303910.4	+	+	NADH脱氢酶[泛醌] α 子复合体亚基8
P24821	240697.7	+	+	E3泛素蛋白连接酶MARCH5
P35580	228856.9	+	+	酰基载体蛋白
P07942	197935.7	+	+	原纤蛋白(Fibrillin)-1
P55268	195853.3	+	+	细胞外硫酸酯酶Sulf-1
Q8WW11	192589.5	+	+	蛋白激酶C α 型
P20908	183446.3	+	+	胞液氨基肽酶
P11047	177487.9	+	+	B-半乳糖苷酶
Q6YHK3	161586.8	+	+	组蛋白H3.11
Q7L576	145088.6	+	+	GDP-岩藻糖蛋白O-岩藻糖转移酶1
Q08211	140868.9	+	+	蛋白S100-A6
P23634	137832.9	+	+	蛋白酪氨酸磷酸酶-样蛋白PTPLAD1
Q12768	134200.9	+	+	39S核糖体蛋白L43
P00533	134190.2	+	+	根蛋白(Radixin)
O43795	131901.9	+	+	预测核糖体RNA甲基转移酶NOP2
Q9BSJ8	122780.1	+	+	滋养层糖蛋白
P26006	118680.2	+	+	半乳糖凝集素-3
P54707	115437.2	+	+	ATP合酶亚基f
Q8N766	111689.2	+	+	Caiponin-2
O60313	111560.7	+	+	肿瘤坏死因子受体超家族成员10B
Q9Y4L1	111266.2	+	+	可能的谷胱甘肽过氧化物酶8
Q6P179	110391.1	+	+	羟酰基辅酶A脱氢酶
P22413	104856.7	+	+	中链特异酰基CoA脱氢酶
Q6ZXV5	103941.9	+	+	结合SH3结构域的富含氨酸样蛋白3
A0FGR8	102294.1	+	+	V-型质子ATP酶116kDa亚基a亚型3
P11586	101495.6	+	+	U5小核糖核蛋白200kDa解旋酶
Q15063	93255.4	+	+	转导蛋白 β -样蛋白2
Q13488	92908.6	+	+	延伸突触结合蛋白(Extended synaptotagmin)-2
O95479	88836.6	+	+	线粒体输入内膜转位酶亚基Tim8 A
Q9UBV2	88698.6	+	+	组蛋白H1.2
Q9NR30	87290.5	+	+	囊泡整合膜蛋白VIP36
Q15436	86105.3	+	+	SRA茎环相互作用的RNA结合蛋白
Q99798	85372	+	+	核孔复合体蛋白Nup205
P08238	83212.2	+	+	DnaJ同源物亚家族B成员1
P13010	82652.4	+	+	含有HEAT重复序列的蛋白1
Q96TA1	82631.1	+	+	丙酮酸脱氢酶E1成分亚基 α
Q8IVL6	81785.8	+	+	前体mRNA-加工-剪接因子8
Q9UII99	80261.7	+	+	胶原蛋白 α -1(XIV)链
Q9BU23	79647.6	+	+	可能的酵母氨酸脱氢酶
Q96AC1	77810.7	+	+	核苷二磷酸激酶B
P21980	77279.8	+	+	蛋白DEK
Q6NUQ4	77101.6	+	+	新生多肽关联复合体亚基 α

[0300]

P17252	76714.3	+	+	LIM结构域特有蛋白7
P23246	76101.8	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白6
Q99805	75725.7	+	+	肽基-tRNA水解酶2
Q75746	74715	+	+	脱氧核糖核酸酶-2- α
P46063	73410	+	+	A-T-艾杜糖苷酶
Q8NBJ5	71590.6	+	+	细胞色素c氧化酶亚基6C
P17066	70984.4	+	+	信号肽酶复合体亚基2
Q43390	70899.2	+	+	60S核糖体蛋白L35
P43155	70812.5	+	+	腺苷-3'-磷酸-5'-磷酸硫酸转运体1
P34931	70331.5	+	+	增殖相关蛋白2G4
P54652	69978	+	+	剪接因子
P17844	69104.8	+	+	Ras-相关蛋白Ral-A
Q96CM8	68080.8	+	+	60S核糖体蛋白L10-样
Q03252	67647.6	+	+	ATP-结合盒亚家族E成员1
Q94826	67412.2	+	+	肌动蛋白相关蛋白2/3复合体亚基2
P20700	66367.7	+	+	组织蛋白酶Z
Q5JTV8	66208.4	+	+	酰基辅酶A硫酯酶1
Q00567	66008.8	+	+	信号肽酶复合体催化亚基SEC11A
P23368	65402	+	+	乙酰辅酶A转运体1
Q10471	64691.5	+	+	4F2细胞表面抗原重链
Q10472	64177.5	+	+	原肌球蛋白 β 链
P14866	64092.4	+	+	含有卷曲螺旋结构的蛋白47
Q14956	63882	+	+	Myb-结合蛋白1A
P07686	63071.3	+	+	ADP-核糖基化因子1
Q95302	63043.6	+	+	联会复合体蛋白SC65
Q969V3	62934.7	+	+	信号肽酶复合体亚基3
P30038	61680.7	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白2
Q96S52	61617.3	+	+	Ras-相关蛋白Rab-8A
Q9HCC0	61294.5	+	+	含有EH结构域的蛋白2
Q5SSJ5	61169.3	+	+	Rho GTP酶激活蛋白1
Q9P0J1	61015.7	+	+	预测40S核糖体蛋白S26-样1
Q9H857	60679.8	+	+	线粒体伴侣蛋白BCS1
P04062	59678.4	+	+	钙结合线粒体载体蛋白Aralar2
Q9Y2X3	59540.6	+	+	核糖体释放因子2
Q7Z4H8	58535.3	+	+	39S核糖体蛋白L46
Q13217	57544.3	+	+	细胞色素c1
P49257	57513.1	+	+	跨膜9超家族成员4
P26599	57185.8	+	+	60S核糖体蛋白L36a
P05091	56345.7	+	+	Metaxin-2
Q96A33	55838.4	+	+	异源核糖核蛋白L
Q9UMS4	55146.4	+	+	ESI蛋白同源物
Q60701	54989.3	+	+	复制蛋白A 14 kDa亚基
Q76021	54939	+	+	60S核糖体蛋白L37a
P10619	54431.2	+	+	神经元特异的钙结合蛋白hippocalein
Q96HE7	54358.1	+	+	易位蛋白SEC63同源物
Q15233	54197.4	+	+	蛋白转运蛋白Sec61亚基 β

[0301]

Q02818	53846.4	+	+	Torsin-1 A-相互作用蛋白2
P22570	53803.1	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白7
Q96N66	52730.3	+	+	脂肪酰脱氢酶
P20073	52705.8	+	+	全反式视黄醇13
P61619	52230.6	+	+	H/ACA核糖核蛋白复合体亚基4
Q9Y512	51943.4	+	+	多药耐药相关蛋白1
O43615	51323.6	+	+	Neuroplastin
Q07960	50404.3	+	+	异染色质蛋白1-结合蛋白3
Q13509	50400.3	+	+	含有跨膜emp24结构域的蛋白3
Q9P2R7	50285.3	+	+	磷酸甘油酸变位酶1
P80303	50164.4	+	+	预测异源核糖核蛋白A1-样3
P36551	50120.1	+	+	异戊酰基-CoA脱氢酶
P13489	49941.2	+	+	ATP合酶亚基b
Q9Y305	49869.6	+	+	Ras-相关蛋白Rab-5A
Q9BUF5	49825	+	+	多聚(rC)-结合蛋白2
P04350	49553.9	+	+	肌动蛋白相关蛋白2/3复合体亚基5
P31943	49198.4	+	+	60S核糖体蛋白L13a
P62495	49000.2	+	+	线粒体输入内膜转位酶亚基Tim3
P82675	47976.2	+	+	B-肌动蛋白-样蛋白2
P09543	47548.7	+	+	蛋白质二硫键异构酶TMX3
P45954	47455.3	+	+	酸性神经酰胺酶
Q8NBX0	47121.5	+	+	脂肪酶成熟因子2
O60664	47018	+	+	Ras-相关C3肉毒杆菌毒素底物1
P28300	46914.5	+	+	高尔基体蛋白亚家族B成员1
P11310	46558.6	+	+	外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员1
O75718	46532	+	+	Ras-相关蛋白Rab-18
O14979	46409	+	+	高迁移率族蛋白B1
P26440	46289.7	+	+	粪卟啉原III氧化酶(Coproporphyrinogen-III氧化酶)
P60842	46124.6	+	+	接触素相关蛋白1
Q58FF3	45829.9	+	+	蛋白S100-A16
Q96HDI	45408.9	+	+	异柠檬酸脱氢酶[NAD]亚基β
Q6YN16	45365.5	+	+	CDP-二酰甘油-肌醇3-磷脂酰转移酶
Q8NC51	44938.5	+	+	卵泡抑素相关蛋白1
Q96G23	44847.4	+	+	核糖磷酸焦磷酸酶1
Q9BTV4	44847.3	+	+	真核起始因子4A-III
P61160	44732.3	+	+	可能的阳离子转运ATP酶13A1
P09110	44263.9	+	+	高迁移率族蛋白HMGI-C
P07093	43974.3	+	+	中胚层特异的转录物同源蛋白
Q9H488	43927.2	+	+	细胞质FMRL-相互作用蛋白1
O75521	43557.4	+	+	基质蛋白(Matrin)-3
Q6NVY1	43454.4	+	+	多肽N-乙酰半乳糖胺基转移酶1
P17302	42980.9	+	+	39S核糖体蛋白L1
Q13336	42499.8	+	+	多蕊醇磷酸甘露糖转移酶
Q16795	42482.6	+	+	肽基脯氨酸顺反异构酶C
P35613	42174.1	+	+	Γ-谷氨酰水解酶
P29992	42096.6	+	+	V-型质子ATP酶16kDa蛋白脂质亚基

[0302]

Q9BYX7	41988.9	+	+	核糖体生物发生调节蛋白同源物
Q562R1	41976	+	+	28S核糖体蛋白S5
Q9BRK5	41780.5	+	+	羊毛甾醇合酶
P30533	41440.9	+	+	乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶
P82650	41254.4	+	+	转化生长因子- β -诱导的蛋白ig-h3
Q15050	41168.2	+		B-脂动蛋白-样蛋白3
Q12907	40203.1	+	+	核仁RNA解旋酶2
O75367	39592.5	+	+	CAAX戊烯基蛋白酶1同源物
Q9NYL9	39570.3	+	+	RNA-结合蛋白FUS
P09972	39431.3	+	+	ADP-核糖基化因子-样蛋白6-相互作用蛋白1
Q5EB52	38805.5	+	+	神经胶质源性连接蛋白
Q15366	38555.6	+	+	微管蛋白 β -6链
Q9H0U3	38011.4	+	+	镁转运蛋白1
O15121	37841.1	+	+	60S核糖体蛋白L6
Q9UDY4	37783.2	+	+	肽基脯氨酸顺反异构酶FKBP3
P62136	37487.8	+	+	骨骼肌生长期上调的蛋白5
Q14257	36853.7	+	+	硫氧还蛋白相关跨膜蛋白1
P05198	36089.4	+	+	28S核糖体蛋白S31
Q9NZ01	36010.8	+	+	高迁移率族蛋白HMG-I/HMG-Y
P27695	35532.2	+	+	抗原肽转运体1
P08574	35367	+	+	DnaJ同源物亚家族C成员3
P31937	35305.8	+	+	过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶1
Q08257	35184.6	+	+	细胞内氯离子通道蛋白1
Q15006	34811.4	+	+	N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶
P09486	34609.7	+	+	可能的转录因子PML
O15144	34311.5	+	+	线粒体输入受体亚基TOM70
Q16836	34255.9	+	+	内质网氨基肽酶2
Q9UHQ9	34073.2	+	+	LDLR伴侣蛋白MESD
P53007	33991	+	+	酰基辅酶A硫酯酶13
Q9UIR2	33846.2	+	+	核纤层蛋白-B1
Q8NBJ7	33835.8	+	+	116kDa U5小核糖核蛋白成分
P62995	33645.6	+	+	蛋白脂蛋白2
Q9BPW8	33288.9	+	+	含有胶原蛋白三螺旋重复序列的蛋白1
P07951	32830.6	+	+	异柠檬酸脱氢酶[NAD]亚基 γ
P42126	32795.2	+	+	RNA结合的Raly-样蛋白
Q02878	32707.6	+	+	鞘脂 δ (4)-去饱和酶DES1
Q86SE5	32310.6	+	+	3
Q9Y639	31271.9	+	+	线粒体输入内膜转位酶亚基TIM44
P15559	30848	+	+	哺乳动物室管膜素相关蛋白1
O75431	29744.1	+	+	醛脱氢酶
O60762	29615.8	+	+	尿素转运体1
P22090	29437	+	+	视黄醇脱氢酶11
P62258	29155.4	+	+	T-复合体蛋白1亚基 δ
P24539	28890.3	+	+	核糖核酸酶抑制剂
P18669	28785.9	+	+	剪接因子
P67936	28504.5	+	+	60S核糖体蛋白L28

[0303]

Q9UJN0	28448.5	+	+	钙蛋白酶小亚基1
Q9UHQ4	28302.2	+	+	组蛋白H1.1
P30042	28152.7	+	+	前体mRNA加工因子19
P57088	27959.8	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白5
Q9P0L0	27875.2	+	+	含有OCIA结构域的蛋白2
Q07955	27727.8	+	+	组蛋白H1.0
P63104	27727.7	+	+	甘氨酸肽N-十四酰转移酶1
Q9NR28	27113.7	+	+	预测60S核糖体蛋白L13a-样MGC87657
P33316	26689.7	+	+	含有主要协助转运蛋白(Major facilitator)超家族结构域的蛋白10
O75352	26620.5	+	+	含有跨膜emp24结构域的蛋白1
P54819	26460.8	+	+	半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Cystatin)-B
P17931	26136.1	+	+	整联蛋白 α -3
P60033	25792.1	+	+	信号肽酶复合体亚基1
Q9UM22	25420.6	+	+	NAD(P)H脱氢酶[苯醌]
Q13445	25189.7	+	+	甘露糖-P-长醇利用缺陷1蛋白
Q00688	25161.3	+	+	DnaJ同源物亚家族B成员4
Q15005	24986.7	+	+	热休克70kDa蛋白6
P09429	24878.2	+	+	异源核糖核蛋白D-样
P62906	24815.5	+	+	蛋白Mpv17
Q9Y3Q3	24761.3	+	+	微管蛋白 β -3链
P27635	24587.9	+	+	Anoctamin-10
Q96L21	24502.7	+	+	酰基CoA合成酶家族成员2
P62826	24407.6	+	+	热休克蛋白 β -1
B2RPK0	24222.8	+	+	肽基脯氨酸顺反异构酶FKBP7
O43402	23757.7	+	+	硫氧还蛋白还原酶2
P20339	23643.8	+	+	酰基辅酶A硫酯酶9
P40429	23562.4	+	+	异源核糖核蛋白H
P11233	23552	+	+	可能的ATP依赖性RNA解旋酶DDX5
O14735	23523.1	+	+	羟基类固醇脱氢酶-样蛋白2
Q8N983	23416.2	+	+	WASH复合体亚基strumpellin
P45877	22748.8	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]1 α 子复合体亚基9
P46781	22577.6	+	+	核小体组装蛋白1-样1
P84074	22413	+	+	溶酶体保护蛋白
Q96AB3	22322.8	+	+	B-己糖胺酶亚基 α
O43399	22224.3	+	+	血清白蛋白
Q02539	21828.9	+	+	B-细胞受体相关蛋白29
O75915	21600.4	+	+	线粒体输入内膜转位酶亚基TIM50
Q9H061	21513.5	+	+	NADH脱氢酶[泛醌]黄素蛋白2
P16403	21351.8	+	+	蛋白sel-1同源物1
P84077	20683.7	+	+	B-己糖胺酶亚基 β
P67812	20612.1	+	+	核仁蛋白56
P18085	20497.7	+	+	固醇-4- α -羧酸-3-脱氢酶
P24844	19814.5	+	+	WASH复合体亚基7
O60831	19245.5	+	+	甘氨酸分裂系统(Glycine cleavage system)H蛋白
P46778	18553.1	+	+	预测己糖激酶HKDC1

[0304]

P62280	I8419	+	+	SWI/SNF复合体亚基SMARCC2
P62277	I7211.7	+	+	39S核糖体蛋白L38
Q9BX68	I7151.2	+	+	神经节苷脂GM2激活因子
P15531	I7137.7	+	+	寡糖基转移酶复合体亚基OSTC
P62841	I7029.2	+	+	小核核糖核蛋白相关蛋白B和B'
P63241	I6821.4	+	+	染色体凝集调节剂
Q9NRP0	I6817.8	+	+	核甘二磷酸激酶A
Q86SX6	I6617.5	+	+	60S核糖体蛋白L34
O15511	I6310.3	+		微管蛋白 β -4链
P46779	I5737.7	+	+	原肌球蛋白 α -4链
P26885	I5639.3	+	+	受体表达增强蛋白5
Q60361	I5519	+	+	预测前体mRNA剪接因子ATP依赖性RNA解旋酶DHX15
Q9NS69	I5511.8	+	+	4个半LIM结构域蛋白2
Q9Y3E0	I5415.4	+	+	ATP依赖性RNA解旋酶DHX29
P69905	I5247.9	+	+	亮氨酸-半胱氨酸氨基肽酶
P42766	I4542.6	+	+	异源核核糖核蛋白R
P55769	I4164.6	+	+	组氨酸-tRNA合成酶
P04908	I4127	+	+	小核核糖核蛋白Sm D3
P61769	I3705.9	+	+	前列环素合酶
Q5JNZ5	I2994	+	+	[丙酮酸脱氢酶[乙酰基转移]-磷酸酶]
Q9GZT3	I2341.4	+	+	蛋白转运蛋白Sec23A
P84090	I2251	+	+	含有自水解酶结构域的蛋白10
Q96FQ6	I1794	+	+	预测内质蛋白-样蛋白
P99999	I1741.1	+	+	60S酸性核糖体蛋白P1
P17096	I1669.2	+	+	Trans-2
O60220	I0991.3	+	+	GDH/6PGL内质双功能蛋白
P56134	I0910.7	+	+	钾转运ATP酶 α 链2
Q9Y5L4	I0493	+		真核肽链释放因子亚基1
Q9H299	I0431.3	+	+	含有跨膜和TPR重复序列的蛋白3
P61513	I0268.5	+	+	含有核糖体L1结构域的蛋白1
O5531	I0052	+	+	微管动力学蛋白1的调节剂
P60468	9968.1	+	+	腺苷酸激酶2
P62979	9411.9	+	+	A-2-巨球蛋白
P63173	8212.7	+	+	72kDa型IV胶原酶
P04732	6009.2	+	+	含有SUN结构域的蛋白1
P35555	312082	+	-	层粘连蛋白亚基 β -1
Q05707	I93393	+	-	含有SUN结构域的蛋白2
Q7Z478	I55138.3	+	-	囊泡转运蛋白GOT1B
Q9HD20	I32869.9	+	-	肌动蛋白相关蛋白2
Q9UIQ6	I17274.2	+	-	血红蛋白亚基 α
Q9UGP8	87941.5	+	-	ERO1-样蛋白 α
Q9UJS0	74128.8	+	-	葡萄糖神经酰胺酶
P27658	73317.2	+	-	Metaxin-1
P35475	72624.8	+	-	ATP依赖性DNA解旋酶Q1
P02768	69321.6	+	-	肿瘤蛋白D54

[0305]

P35241	68521.5	+	-	表皮生长因子受体
P08195	67951.9	+	-	多肽N-乙酰半乳糖胺基转移酶2
Q6NUM9	66776.8	+	-	膜联蛋白A7
Q9NNW7	66320.8	+	-	COX4邻近(neighbor)
Q86UE4	63798.8	+	-	肌动蛋白相关蛋白2/3复合体亚基3
P12081	57374.3	+	-	NHP2-样蛋白1
Q9UBM7	54453.8	+	-	唇裂和腭裂跨膜蛋白1
P49189	53767.1	+	-	ATP-结合盒亚家族D成员3
O15269	52710.6	+	-	芳基硫酸酯酶A
O75306	52511.8	+	-	Δ -1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶
P12694	50439.2	+	-	ADP依赖性葡萄糖激酶
Q92791	50349.3	+	-	肽基脯氨酸反异构酶FKBP9
Q15113	47942	+	-	前列腺素E合酶2
Q8TB61	47483.6	+	-	肉碱-O-乙酰转移酶
P55209	45346	+	-	40S核糖体蛋白S9
Q92665	45290.5	+	-	真核翻译起始因子2亚基1
Q96DV4	44568.4	+	-	40S核糖体蛋白S13
Q13561	44203.9	+	-	含有弯曲螺旋结构的蛋白109A
Q9UQ80	43759.2	+	-	热休克70kDa蛋白1-样
P29803	42905.6	+	-	Niban-样蛋白1
P51553	42767.1	+	-	3-羟基异丁酰基-CoA水解酶
P61163	42586.9	+	-	剪裁因子
P25685	38020.4	+	-	热休克蛋白HSP90- β
Q9H2U2	37896	+	-	CD166抗原
Q9H7B2	35560.2	+	-	瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员2
Q8TC12	35363.5	+	-	40S核糖体蛋白S4
Q12841	34962.9	+	-	纤溶酶原激活剂抑制剂IRNA-结合蛋白
P60891	34811.9	+	-	LAG1长寿保障同源物2
Q99439	33675.3	+	-	非典型蛋白KIAA0090
Q86WA6	32522	+	-	预测磷脂酶B-样2
Q14192	32170.6	+	-	线粒体输入受体亚基TOM22同源物
P16152	30355.9	+	-	28S核糖体蛋白S23
Q9Y680	29990.1	+	-	预测高迁移率族蛋白B1-样1
O60613	27629	+	-	ATP依赖性RNA解旋酶DDX18
Q96CG8	26207.1	+	-	蛋白NipSnap同源物1
Q14696	26060.3	+	-	NADH-细胞色素b5还原酶1
Q13765	23369.7	+	-	跨膜蛋白214
P09211	23341	+	-	40S核糖体蛋白S29
P04792	22768.5	+	-	GTP结合核蛋白Ran
Q9Y3D9	21757.3	+	-	羧基还原酶[NADPH]1
Q00765	21479.1	+	-	肽基脯氨酸反异构酶FKBP2
P63000	21436.3	+	-	Perilipin-3
P05976	21131.8	+	-	核孔复合体蛋白Nup155
P30086	21043.7	+	-	囊泡相关膜蛋白2
Q9ULC4	20541.8	+	-	琥珀酰CoA连接酶[ADP形成]亚基 β
P61009	20300.5	+	-	Nicalin

[0306]

P51970	20092.1	+	-	肌醇1
P84103	19317.9	+	-	恶性T细胞扩增序列1
Q9Y6H1	15502.7	+	-	U1小核核糖核蛋白C
Q9NPJ3	14950.9	+	-	三羧酸转运蛋白
P35244	13559.9	+	-	UDP-葡萄糖6-脱氢酶
Q43920	12509.4	+	-	跨膜蛋白33
Q6NW1	12126.9	+	-	Diablo同源物
P04080	11132.6	+	-	含有非POU结构域的八聚体结合蛋白
Q43678	10914.8	+	-	Ankycorbin
P09669	8775.7	+	-	前胶原半乳糖基转移酶1
Q15738	NA	-	+	ADP-核糖基化因子4
P17900	NA	-	+	组氨酸三联体核苷酸结合蛋白2
P46087	NA	-	+	肌球蛋白-Ib
Q00299	NA	-	+	苯醌氧化还原酶
P39210	NA	-	+	60S核糖体蛋白L10a
Q9P035	NA	-	+	质膜钙转运ATP酶4
Q9NUH1	NA	-	+	基本同源物增强子
Q43837	NA	-	+	富含半胱氨酸与EGF-样结构域蛋白1
Q9Y5S1	NA	-	+	核糖体生产要素(Ribosome production factor)2同源物
Q16647	NA	-	+	B-2-微球蛋白
Q96IT7	NA	-	+	Z'
P23434	NA	-	+	FRA1家族蛋白2
P0C7M2	NA	-	+	核结合蛋白-2
P15289	NA	-	+	丝氨酸棕榈酰转移酶1
Q75844	NA	-	+	核心组蛋白大(macro)-H2A.1
P09234	NA	-	+	含有卷曲螺旋-卷曲螺旋结构域的蛋白2
P08253	NA	-	+	60S核糖体蛋白L38
P04632	NA	-	+	蛋白NipSnap同源物3A
Q03518	NA	-	+	DNA-(无嘌呤或无嘧啶位点) 裂解酶
Q8NFQ8	NA	-	+	核结合蛋白-1
P07305	NA	-	+	剪接因子
Q15029	NA	-	+	硫酸酯酶修饰因子2
Q75643	NA	-	+	C-1-四氢叶酸合酶
Q9Y276	NA	-	+	含有5'-核苷酸酶结构域的蛋白2
Q9BYD6	NA	-	+	间隙连接 α -1蛋白
Q8IWU6	NA	-	+	层粘连蛋白亚基 β -2
Q9UBQ7	NA	-	+	A-2-巨球蛋白受体相关蛋白
P61221	NA	-	+	核纤层蛋白-B2
P63027	NA	-	+	Periostin
Q9Y4P3	NA	-	+	磷脂酰乙醇胺结合蛋白1
P30419	NA	-	+	14-3-3蛋白 ζ/δ
P50991	NA	-	+	14-3-3蛋白 α
Q94901	NA	-	+	金属硫蛋白-1E
Q9H7Z7	NA	-	+	前胶原C-内肽酶增强子1
P22087	NA	-	+	胶原蛋白 α -1(XII)链
P28288	NA	-	+	4-三甲氨基丁酰脱氢酶

[0307]

Q13505	NA	-	+	胶原蛋白 α -1(VIII)链
Q9Y3E5	NA	-	+	跨膜9超家族成员2
P27449	NA	-	+	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 α -11
Q13510	NA	-	+	短链/支链特异酰基CoA脱氢酶
P62318	NA	-	+	组蛋白H2A型1-B/E
O00115	NA	-	+	钙结合线粒体载体蛋白Aralar 1
P33527	NA	-	+	分拣和组装器成分50同源物
Q8NE86	NA	-	+	动力蛋白激活蛋白(dynactin)亚基2
O60832	NA	-	+	蛋白转运蛋白Sec61亚基 α 亚型1
Q15582	NA	-	+	28S核糖体蛋白S22
Q13740	NA	-	+	无机焦磷酸酶2
Q9NVP1	NA	-	+	15kDa磷蛋白
P22392	NA	-	+	Fermitin家族同源物2
P43243	NA	-	+	过氧化物酶体3
P38919	NA	-	+	跨膜蛋白43
Q04941	NA	-	+	转化因子(Transformer)-2蛋白同源物 β
P05386	NA	-	+	细胞色素c
Q8NEP8	NA	-	+	40S核糖体蛋白S11
Q8TAQ2	NA	-	+	伐昔洛韦(Valacyclovir)水解酶
O15145	NA	-	+	蛋白LYRIC
Q86TX2	NA	-	+	Torsin-1A-相互作用蛋白1
Q16629	NA	-	+	A-中心体肌动蛋白(centractin)
P35637	NA	-	+	原肌球蛋白调节蛋白(Tropomodulin)-3
Q9NX47	NA	-	+	软骨相关蛋白
Q9NP72	NA	-	+	固生蛋白(Tenascin)
Q9NZN4	NA	-	+	甲基丁烯酰基-CoA羧化酶 β 链
P51648	NA	-	+	溶血磷脂酰基转移酶7
O15143	NA	-	+	DNA依赖性蛋白激酶催化亚基
Q92820	NA	-	+	Basigin
Q9Y6A9	NA	-	+	CD81抗原
P29590	NA	-	+	SPARC
Q6P2Q9	NA	-	+	脯氨酸3-羟化酶3
Q13641	NA	-	+	60S核糖体蛋白L21
Q21B90	NA	-	+	延伸突触结合蛋白-1
Q14789	NA	-	+	蛋白质赖氨酸6-氧化酶
P15586	NA	-	+	四三脯肽(tetratricopeptide)重复蛋白35
O75694	NA	-	+	肌球蛋白轻链1/3
Q56VL3	NA	-	+	囊泡相关膜蛋白相关蛋白A
P61006	NA	-	+	GPI转氨酶成分PIG-S
P49207	NA	-	+	谷氧还蛋白相关蛋白5
P14678	NA	-	+	40S核糖体蛋白S15
Q96IX5	NA	-	+	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶PP1- α 催化亚基
O75380	NA	-	+	剪接因子
Q969S9	NA	-	+	核仁蛋白58
P52926	NA	-	+	3-酮酰基-CoA硫解酶
Q9H2W6	NA	-	+	含有KDEL基序的蛋白2

Q08170	NA	-	+	热休克相关70kDa蛋白2
O14763	NA	-	+	发动蛋白(Dynamin)-样120kDa蛋白
Q15067	NA	-	+	3-羟基异丁酸脱氢酶
Q2M389	NA	-	+	肌球蛋白调节轻链多肽9
Q3ZCQ8	NA	-	+	PRA1家族蛋白3
Q9BRR6	NA	-	+	2-氧代异戊酸脱氢酶亚基 α
P78357	NA	-	+	真核起始因子4A-1
P19404	NA	-	+	跨膜蛋白126A
P35659	NA	-	+	蛋白谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶2
P16278	NA	-	+	层粘连蛋白亚基 γ -1
Q9PCR7	NA	-	+	NADH脱氢酶[泛醌]1 α 子复合体亚基2
P18754	NA	-	+	真核翻译起始因子5A-1
P62273	NA	-	+	谷胱甘肽S-转移酶P
Q14728	NA	-	+	脱氧尿苷5'-三磷酸核苷酸水解酶
O75251	NA	-	+	网钙结合蛋白-2
Q9H3N1	NA	-	+	NADPH-皮质铁氧还蛋白氧化还原酶
P06703	NA	-	+	ATP依赖性RNA解旋酶A
Q96005	NA	-	+	7-脱氢胆固醇还原酶
P28838	NA	-	+	胶原蛋白 α -1(V)链
P83881	NA	-	+	多聚嘧啶串结合蛋白1
O43143	NA	-	+	预测核甘二磷酸激酶
O00400	NA	-	+	NAD依赖性苹果酸酶
Q8TED1	NA	-	+	缺氧上调蛋白1
Q9H583	NA	-	+	X射线修复交叉互补蛋白5
Q16695	NA	-	+	CD109抗原
Q96DB5	NA	-	+	屏障自整合因子
Q9NW15	NA	-	+	60S核糖体蛋白L10
P01023	NA	-	+	40S核糖体蛋白S27a
Q92544	NA	-	+	蛋白ERGIC-53
Q9BQC0	NA	-	+	跨膜糖蛋白NMB
P48449	NA	-	+	果糖-二磷酸酯缩酶C
P06865	NA	-	+	45kDa钙结合蛋白
O14561	NA	-	+	含有异分支酸酶结构域的蛋白2
Q15041	NA	-	+	乌头酸水合酶
Q92621	NA	-	+	肌球蛋白-10

[0308]

[0309] 表6-仅在调整空胞和CDL中普遍存在的蛋白质

Uniport登录号	MW	表达比率:调整CDL/ 调整空胞	蛋白质名称
Q15717	NA	100%	内质网凝集素1
P14136	NA	100%	信号识别颗粒受体亚基 α
Q32P51	NA	17%	长链脂肪酸-CoA连接酶3
Q9NVA2	NA	16%	非阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸受体
O75131	NA	11%	Granulins
Q96DZ1	NA	10%	异源核糖核糖蛋白K
P01889	NA	9%	DnaJ同源物亚家族C成员10

[0310]

[0311]

Q16270	NA	9%	Copine-3
P61978	NA	7%	Flotillin-1
P21912	NA	6%	金属蛋白酶抑制剂3
P28799	NA	6%	神经胶质纤维酸性蛋白
Q8IXB1	NA	6%	翻译激活剂GCN1
Q5KU26	NA	5%	异源核糖核蛋白A1-样2
O75955	NA	4%	蛋白FAM98A
P35625	NA	4%	隔膜蛋白(septin)-11
Q92616	NA	4%	琥珀酸脱氢酶[泛醌]铁硫亚基
O95573	NA	3%	胶原凝集素-12
Q8NCA5	NA	3%	胰岛素样生长因子结合蛋白7
P11717	NA	2%	HLA类I组织相容性抗原

[0312]

表7-存空胞、调整空胞和调整CDL中普遍存存,但不存存于未调整CDL中的蛋白质。

[0313]

Uniport登录号	MW	表达比		蛋白质名称
		调整空胞/空胞	调整CDL/调整空胞	
Q53EP0	132803.2	302%	2%	钙腔蛋白(Calumenin)
P52272	77464.3	262%	2%	核磷蛋白(Nucleophosmin)
P12956	69799.2	248%	1%	细胞色素c氧化酶亚基2
Q60716	108103.3	220%	4%	谷氨酰胺酶肾亚型
P05121	45031.1	218%	5%	整联蛋白β-5
P18621	21383.3	218%	13%	质膜钙转运ATP酶1
Q9H845	68716.8	209%	7%	核仁蛋白(Nucleolin)
Q14103	38410.3	198%	0%	60S酸性核糖体蛋白P0
P61916	16559.5	195%	2%	Atlastin-3
Q02978	34039.9	193%	3%	NADH脱氢酶[泛醌]铁硫蛋白8
Q969X5	32371.5	186%	8%	中性α-葡萄糖苷酶AB
P07858	37796.8	179%	2%	细胞色素c氧化酶亚基4亚型1
O95831	66859	176%	4%	补体成分1Q亚成分-结合蛋白
P51148	23467.8	161%	6%	3-羟酰基-CoA脱氢酶型-2
Q9H0U4	22157.2	161%	1%	AP-2复合体亚基α-1
Q75390	51679.6	157%	3%	腺苷酸环化酶相关蛋白1
Q8TCJ2	93613.8	155%	1%	胶原蛋白α-1(IH)链
P21964	30017.6	148%	0%	线粒体载体同源物2
Q43852	37083.6	143%	2%	含有纤连蛋白型III结构域的蛋白3B
Q95782	107477.9	142%	5%	Ras-相关蛋白Rab-1B
P50416	88310.8	142%	2%	A-辅肌动蛋白-1
Q9NYU2	177077.4	140%	1%	羟甲基戊二酰单酰-CoA裂解酶
P46977	80476.9	138%	3%	40S核糖体蛋白S12
P49821	50784.9	137%	5%	肌动蛋白相关蛋白3
Q12797	85809.5	135%	5%	40S核糖体蛋白S20
P46940	189132.9	133%	1%	Thy-1膜糖蛋白
Q9ULV4	53215.1	131%	3%	冠蛋白(Coronin)-1C
O00159	121648.1	129%	4%	NADH脱氢酶[泛醌]l α子复合体亚基10

[0314]

P07996	129299.2	129%	2%	线粒体加工肽酶亚基 β
Q14773	61209.7	129%	6%	中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子
P10620	17587.2	128%	3%	60S核糖体蛋白L8
Q9NSE4	113719.1	121%	4%	肽基脯氨酸顺反异构酶A
Q00469	84631.8	120%	2%	39S核糖体蛋白L49
P20340	23577.9	100%	100%	60S核糖体蛋白L3
P80723	22680	100%	33%	内质网驻留蛋白44
Q96AQ6	80594.2	100%	27%	40S核糖体蛋白S7
P08962	25619.1	100%	25%	脯氨酸-4-羟化酶亚基 α -2
P50281	65842	100%	25%	含有跨膜omp24结构域的蛋白4
P62988	8559.6	100%	23%	电子转移黄素蛋白亚基 α
P21291	20553.8	100%	21%	蛋白S100-A10
P62879	37307.1	100%	21%	40S核糖体蛋白S23
Q92499	82379.9	100%	15%	肌球蛋白-11
P05388	34251.8	100%	14%	异源核糖核蛋白DO
Q96000	20763.2	100%	12%	连锁蛋白(Catenin) β -1
P23528	18490.7	100%	12%	Seprase
P15313	56797	100%	12%	易位蛋白SEC62
Q9UBS4	40488.7	100%	12%	线粒体2-氧代戊二酸/苹果酸载体蛋白
P62917	28007.3	100%	12%	微粒体谷胱甘肽S-转移酶1
P00403	25548.2	100%	12%	X射线修复交叉互补蛋白6
P17813	70533.2	100%	11%	Talin-1
P61353	15787.8	100%	11%	甘露糖基寡糖葡萄糖苷酶
Q00341	141368	100%	11%	中性胆固醇酯水解酶1
P0C7P4	30796.1	100%	11%	可能的ATP依赖性RNA解旋酶DDX17
P49368	60495.4	100%	11%	细胞色素b-c1复合体亚基7
Q9NQC3	129851.2	100%	10%	40S核糖体蛋白S15a
Q9NX63	26136.2	100%	10%	白细胞介素增强子结合因子3
P84098	23451.3	100%	10%	蛋白ETHE1
Q12906	95279.2	100%	10%	含有卷曲螺旋-卷曲螺旋结构域的蛋白3
P11166	54048.7	100%	9%	雌二醇17- β -脱氢酶12
P06748	32554.9	100%	9%	异源核糖核蛋白M
Q99584	11464.1	100%	9%	线粒体输入受体亚基TOM40同源物
P14927	13522	100%	8%	T-复合体蛋白1亚基 γ
Q9UBI6	8001.2	100%	8%	丙酮酸脱氢酶E1成分亚基 α
P83731	17767.9	100%	8%	蛋白凝琼同源物2
Q02218	115861.5	100%	8%	血影蛋白(Spectrin) α 链
P61026	22526.6	100%	7%	细丝蛋白(Filamin)-A
Q95299	40725	100%	7%	肌球蛋白-Ic
P22626	37406.7	100%	7%	Ras-相关蛋白Rap-1A
Q9UBG0	166548.2	100%	7%	琥珀酰基-CoA连接酶[GDP形成]亚基 β
P07099	52915	100%	7%	RNA-结合蛋白Raly
Q95182	12543.6	100%	7%	胶原蛋白 α -2(VI)链
P04216	17923.4	100%	7%	Ras GTP酶激活-样蛋白IQGAP1
P62266	15797.7	100%	7%	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(D)/G(S)/G(T)亚基 β -2
P35221	100008.6	100%	7%	V-型质子ATP酶亚基B

[0315]

Q13405	19186	100%	7%	前胶原蛋白赖氨酸
P18859	12579.6	100%	7%	60S核糖体蛋白L32
P25398	14505.5	100%	7%	长醇二磷酸葡萄糖蛋白糖基转移酶亚基TT3A
O00571	73198.1	100%	7%	A-可溶性NSF附着蛋白
P00367	61359.3	100%	7%	含有ATP酶家族AAA结构域的蛋白3A
P62081	22113.3	100%	6%	前B细胞白血病转录因子相互作用蛋白1
Q15293	38866.2	100%	6%	Δ -L-吡咯啉-5-羧胺合酶
P21333	280561.4	100%	6%	Ras-相关蛋白Rab-10
P54920	33211.3	100%	6%	ATP依赖性RNA解旋酶DDX3X
P62249	16435	100%	6%	DnaJ同源物亚家族B成员11
P62834	20973.7	100%	6%	异源核糖核蛋白A2/B1
O00264	21657.8	100%	6%	含有硫氧还蛋白结构域的蛋白5
Q16718	13450.2	100%	6%	钙调蛋白(Calmodulin)
Q9Y3R3	25155.6	100%	6%	40S核糖体蛋白S27-样
Q01518	51822.8	100%	6%	柠檬酸合酶
P35222	85442.3	100%	6%	NADH脱氢酶[泛醌] β 子复合体亚基10
Q9UKM9	32443.6	100%	6%	环氧化物水解酶1
P51991	39570.5	100%	6%	60S核糖体蛋白L36
P04899	40425.1	100%	6%	UPF0027蛋白C22orf28
P62244	14830	100%	6%	网状蛋白(Reticulon)-4
P32322	33339.6	100%	5%	肌浆/内质网钙ATP酶1
P52815	21334.7	100%	5%	肽基脯氨酸反异构酶FKBP11
Q15019	41461.3	100%	5%	组蛋白H2A型1-A
Q13011	35793.4	100%	5%	凝溶胶蛋白(Gelsolin)
P00558	44586.2	100%	5%	ATP合酶亚基g
O75439	54331.6	100%	5%	血小板反应蛋白(Thrombospondin)-1
P43304	80801.7	100%	5%	组蛋白H1.5
P18084	87996.2	100%	5%	纤溶酶原激活剂抑制剂1
Q7Z7H5	25926.4	100%	5%	基质金属蛋白酶-14
Q14554	59556.2	100%	5%	肽基脯氨酸反异构酶FKBP10
O60506	69559.6	100%	5%	辅羧基-CoA水合酶
Q9Y3U8	12245.9	100%	5%	异源核糖核蛋白A3
P62820	22663.4	100%	5%	富马酸水合酶
Q13813	284362.5	100%	5%	2-氧代戊二酸脱氢酶
Q6P587	24826.7	100%	5%	白细胞介素增强子结合因子2
O75964	11421.2	100%	5%	磷酸甘油酸激酶1
Q9Y2B0	20639.2	100%	4%	60S核糖体蛋白L24
Q12931	80059.8	100%	4%	髓性关联分化标记
P51572	27974	100%	4%	A-辅肌动蛋白-4
Q5JRX3	117380.3	100%	4%	鸟氨酸氨基转移酶
P36776	106422.5	100%	4%	UPF0556蛋白C19orf10
O95571	27855.1	100%	4%	60S核糖体蛋白L19
P61158	47341	100%	4%	NADH脱氢酶[泛醌]黄素蛋白1
Q9BS26	46941.5	100%	4%	NADH脱氢酶[泛醌] β 子复合体亚基7
P10515	68953.3	100%	4%	40S核糖体蛋白S2
Q71UM5	9470.9	100%	4%	含有跨膜emp24结构域的蛋白7

[0316]

Q12905	43035.2	100%	4%	含有富马酰乙酰乙酸盐水解酶结构域的蛋白1
P54886	87247.7	100%	4%	网钙结合蛋白-1
P13073	19564.1	100%	4%	组织蛋白酶B
P15880	31304.6	100%	4%	丙酮酸脱氢酶复合体的二氢硫辛酰基赖氨酸残基乙酰转移酶成分
P60866	13364.3	100%	4%	天冬氨酸/天冬酰胺乙酰-羟化酶
Q96199	46481.5	100%	3%	儿茶酚O-甲基转移酶
Q96008	37869.2	100%	3%	蛋白S100-A13
P61313	24131.1	100%	3%	A-氨基己二酸半醛脱氢酶
Q6PIU2	45778.8	100%	3%	Vigilin
Q8NDS9	47598.7	100%	3%	膜相关孕激素受体成分1
Q14165	32213.6	100%	3%	半乳糖凝集素-1
P04181	48504.3	100%	3%	前序列蛋白酶
Q9NVI7	71324.8	100%	3%	谷氨酸脱氢酶1
Q92896	134463.3	100%	3%	丙酮酸脱氢酶E1成分亚基β
Q99653	22442.4	100%	3%	抑制蛋白(Profilin)-1
P54709	31492.1	100%	3%	丝氨酸β-内酰胺酶-样蛋白LACTB
Q92520	24664.6	100%	3%	40S核糖体蛋白S17
P53597	36226.9	100%	3%	3-酮酰基-CoA硫解酶
P15311	69369.8	100%	3%	肌球蛋白轻链多肽6
P13804	35057.6	100%	3%	泛素
Q00217	23689.6	100%	3%	40S核糖体蛋白S16
Q9ULJ7	25549.6	100%	3%	微粒体谷胱甘肽S-转移酶3
P62158	16826.8	100%	3%	NADH脱氢酶[泛醌]1 α子复合体亚基5
Q969H8	18783.3	100%	3%	Lon蛋白酶同源物
P83111	60655.1	100%	3%	钠/钾转运ATP酶亚基β-3
Q12884	87656.8	100%	3%	丝切蛋白(cofilin)-1
P07954	54602.2	100%	3%	Ras-相关蛋白Rab-1A
Q14697	106806.8	100%	3%	内质网高尔基体中间区室蛋白1
O14983	110181.8	100%	2%	吡咯喹-5-羧酸还原酶1
Q99714	26906.1	100%	2%	Ras-相关蛋白Rab-5C
P20020	138667.9	100%	2%	60S核糖体蛋白L17
P62910	15849.8	100%	2%	ATP合酶偶联因子6
P39023	46079.8	100%	2%	Ras-相关蛋白Rab-6A
Q9NYL4	22166.3	100%	2%	39S核糖体蛋白L12
O14880	16505.6	100%	2%	GTP:AMP磷酸转移酶线粒体
Q92841	72326	100%	2%	预测细胞色素b-c1复合体亚基Rieske-样蛋白1
Q96QV6	14224.9	100%	2%	膜蛋白-2
Q9Y224	28050.7	100%	2%	连环蛋白(Catenin) α-1
P55809	56122	100%	2%	含有跨膜emp24结构域的蛋白2
Q13724	91860.9	100%	1%	60S核糖体蛋白L27
Q6DD88	60503.5	100%	1%	附睾分泌蛋白E1
Q96AY3	64204.3	100%	1%	蛋白质二硫键异构酶A5
Q9Y6C9	33308.9	100%	1%	C-型甘露糖受体2
O15460	60863.7	100%	1%	CD63抗原
Q53GQ0	34302.2	100%	1%	溶质携带物家族2

[0317]

Q07021	31342.6	100%	1%	凋亡诱导因子1
P60660	16919.1	100%	0%	Ezrin
P35749	227197.9	100%	0%	ATP依赖性RNA解旋酶DIX1
P08559	43267.7	100%	0%	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(i):G(S)/G(O)亚基 γ -12
O15260	30373.8	100%	0%	原肌球蛋白 α -1链
P16401	22566.5	100%	0%	甘油-3-磷酸脱氢酶
P11177	39208.1	82%	4%	高尔基器(Golgi apparatus)蛋白1
P12110	108511.9	81%	3%	脑可溶性蛋白1
P42765	41897.7	79%	2%	琥珀酰基-CoA连接酶[GDP形成]亚基 α
O94925	73414	76%	3%	连环蛋白 δ -1
Q9Y310	55175	72%	8%	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(i)亚基 α -2
P55145	20243.6	71%	2%	二肽基肽酶1
O43707	104788.5	71%	4%	B-细胞受体相关蛋白31
P12814	102992.7	70%	4%	肉碱O-棕榈酰转移酶1
P49419	58450.2	66%	3%	60S核糖体蛋白L15
P09493	32688.7	66%	27%	饮食过度基因座蛋白4
P35914	34337.8	62%	8%	UDP-葡萄糖:糖蛋白葡萄糖基转移酶1
P37802	22377.2	61%	4%	60S核糖体蛋白L23a
P07737	15044.6	57%	7%	钙结合蛋白p22
P08708	15540.4	57%	5%	蛋白FAM3C
P30084	31367.1	57%	3%	异源核糖核蛋白Q
P62937	18000.9	54%	9%	异亮氨酰-tRNA合成酶
P19338	76568.5	50%	42%	酰基CoA脱氢酶家族成员9
P09382	14706.2	45%	28%	Malectin
P06396	85644.3	36%	2%	Δ 3
P02461	138479.2	35%	6%	长醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基STT3B
Q9Y490	269596.3	34%	5%	内皮糖蛋白(Endoglin)
P62750	17684.1	24%	31%	转凝蛋白(transgelin)-2

[0318] 虽然本发明已结合其具体实施方式进行描述,但显然,对于本领域技术人员而言,许多替换、修改和变更都是很明显的。因此,本发明旨在包括落在附属权利要求的精神和宽范围内的所有此类替换、修改和变更。

[0319] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用完整地合并在本说明书中,如同每篇单独的出版物、专利或专利申请单独地明确被指出通过引用合并在此。另外,本申请中任何参考文献的引用或列出不应该被解释为承认此类参考文献是本发明的现有技术。对于使用的章节标题,它们不应该被解释为限制性的。

[0320] 参考文献(其它参考文献在本申请各处列出)

[0321] 1.Petersson,B.The dry mass of the pancreatic B-cells in relation to their content of secretion granules.The Histochemical Journal 1,55-58(1968).

[0322] 2.Loewenstein,J.E.&Cohen,A.I.Dry Mass,Lipid Content and Protein Content of the Intact and Zona-Free Mouse Ovum.J Embryol Exp Morphol 12,113-121(1964).

[0323] 3.Lapidus,R.G.,Tiffany,C.W.,Isaacs,J.T.&Slusher,B.S.Prostate-specific membrane antigen(PSMA) enzyme activity is elevated in prostate cancer cells.Prostate 45,350-354(2000).

- [0324] 4.Hur,E.M.et al.LIME,a novel transmembrane adaptor protein,associates with p56lck and mediates T cell activation.J Exp Med 198,1463-1473(2003).
- [0325] 5.Lewis,L.A.et al.The Lck SH2 phosphotyrosine binding site is critical for efficient TCR-induced processive tyrosine phosphorylation of the zeta-chain and IL-2 production.J Immunol159,2292-2300(1997).
- [0326] 6.Crowther,M.,Brown,N.J.,Bishop,E.T.&Lewis,C.E.Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors.J Leukoc Biol 70,478-49(2001).
- [0327] 7.Martinez-Palomo,A.,G.H.Bourne,J.F.D.&Jeon,K.W.in International Review of Cytology,Vol.Volume 29 29-75(Academic Press,1970).
- [0328] 8.Marquez,M.et al.Charge-dependent targeting;results in six tumor cell lines.Anticancer Res24,1347-1351(2004).
- [0329] 9.Carter,H.B.&Coffey,D.S.Cell surface charge in predicting metastatic potential of aspirated cells from the Dunning rat prostatic adenocarcinoma model.J Urol 140,173-175(1988).
- [0330] 10.Bjellqvist,B.,Basse,B.,Olsen,E.&Celis,J.E.Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions.Electrophoresis 15,529-539(1994).
- [0331] 11.Bjellqvist,B.et al.The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences.Electrophoresis 14,1023-1031(1993).
- [0332] 12.Link,A.J.,Hays,L.G.,Carmack,E.B.&Yates,J.R.,3rd Identifying the major proteome components of Haemophilus influenzae type-stain NCTC 8143.Electrophoresis 18,1314-1334(1997).
- [0333] 13.Link,A.J.,Robison,K.&Church,G.M.Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K-12.Electrophoresis 18,1259-1313(1997).
- [0334] 14.Campbell,R.B.et al.Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors.Cancer Res 62,6831-6836(2002).
- [0335] 15.Krasninci,S.et al.Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels.Int J Cancer 105,561-567(2003).
- [0336] 16.Croyle,M.A.et al.PEGylation of a vesicular stomatitis virus G pseudotyped lentivirus vector prevents inactivation in serum.J Virol 78,912-921(2004).
- [0337] 17.Immordino,M.L.,Dosio,F,&Cattel,L.Stealth liposomes:review of the basic science,rationale,and clinieal applications,existing and potential.Int J Nanomedicine 1,297-315(2006).

- [0338] 18. Peeters, L., Sanders, N.N., Jones, A., Demeester, J. & De Smedt, S.C. Post-pegylated lipoplexes are promising vehicles for gene delivery in RPE cells. *J Control Release* 121, 208-217 (2007).
- [0339] 19. Rivest, V. et al. Novel liposomal formulation for targeted gene delivery. *Pharm Res* 24, 981-990 (2007).
- [0340] 20. Degli-Esposti, M.A. et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170 (1997).
- [0341] 21. Lee, H.O., Herndon, J.M., Barreiro, R., Griffith, T.S. & Ferguson, T.A. TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J Immunol* 169, 4739-4744 (2002).
- [0342] 22. LeBlanc, H.N. & Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75 (2003).
- [0343] 23. Walczak, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163 (1999).
- [0344] 24. Rieget, J., Naumann, U., Glaser, T., Ashkenazi, A. & Weller, M. Apo2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Lett* 427, 124-128 (1998).
- [0345] 25. Wu, X., He, Y., Falco, L.D., Jr., Hui, K.M. & Huang, L. Regression of human mammary adenocarcinoma by systemic administration of a recombinant gene encoding the hFlex-TRAIL fusion protein. *Mol Ther* 3, 368-374 (2001).
- [0346] 26. Griffith, T.S., Anderson, R.D., Davidson, B.L., Williams, R.D. & Ratliff, T.L. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis. *J Immunol* 165, 2886-2894 (2000).

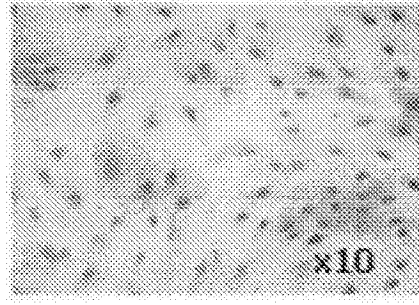
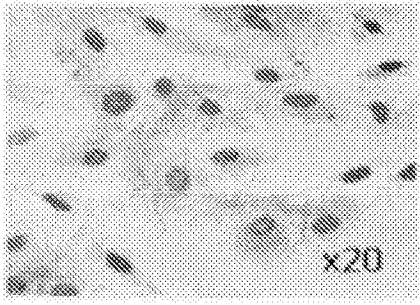


图1A

图1B

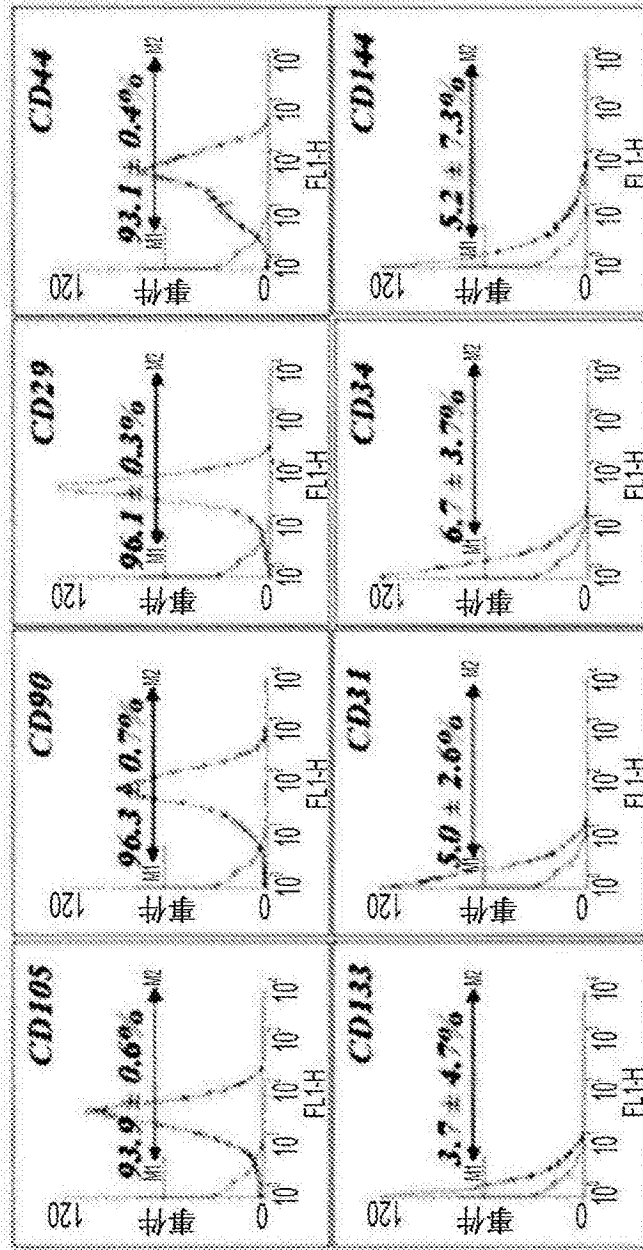


图1C

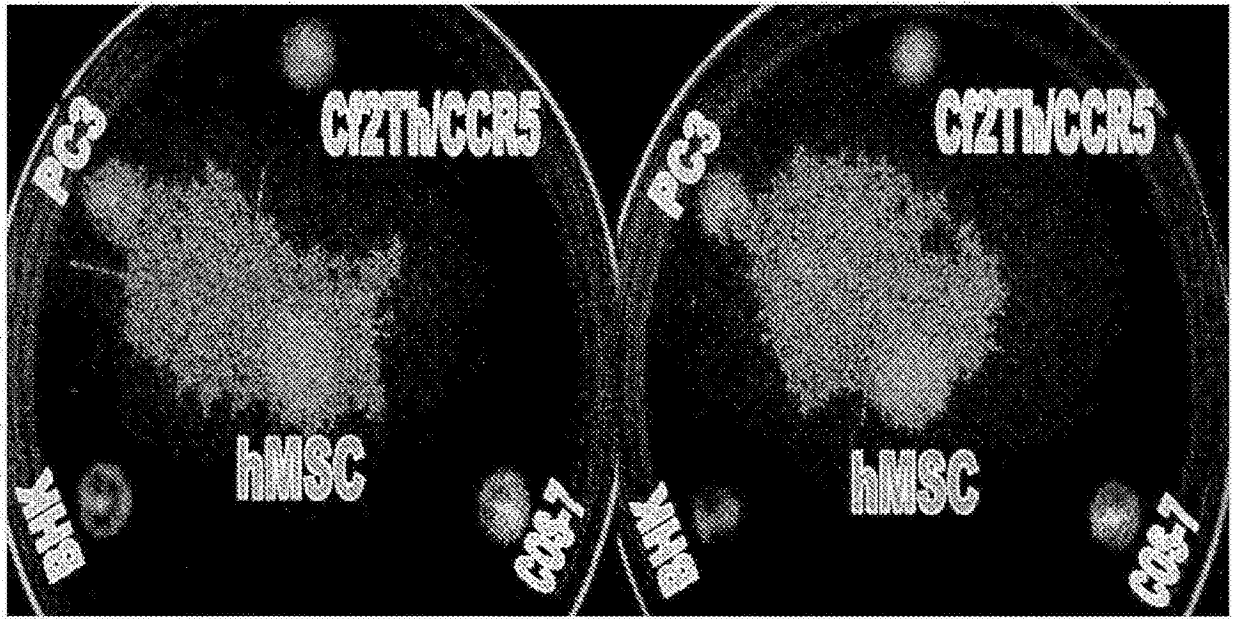


图2

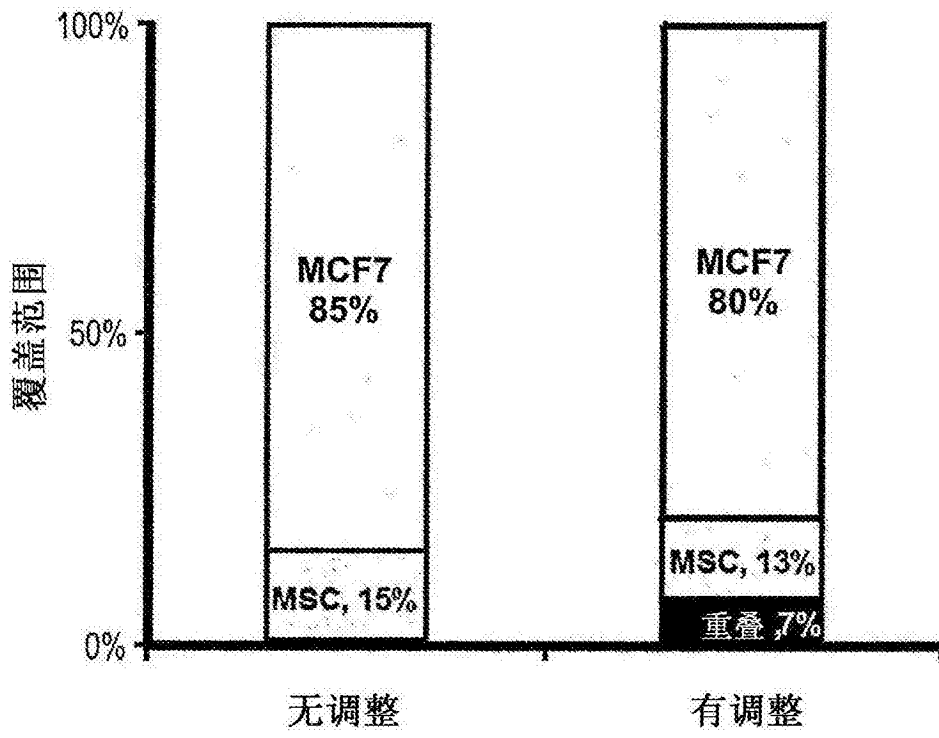


图3

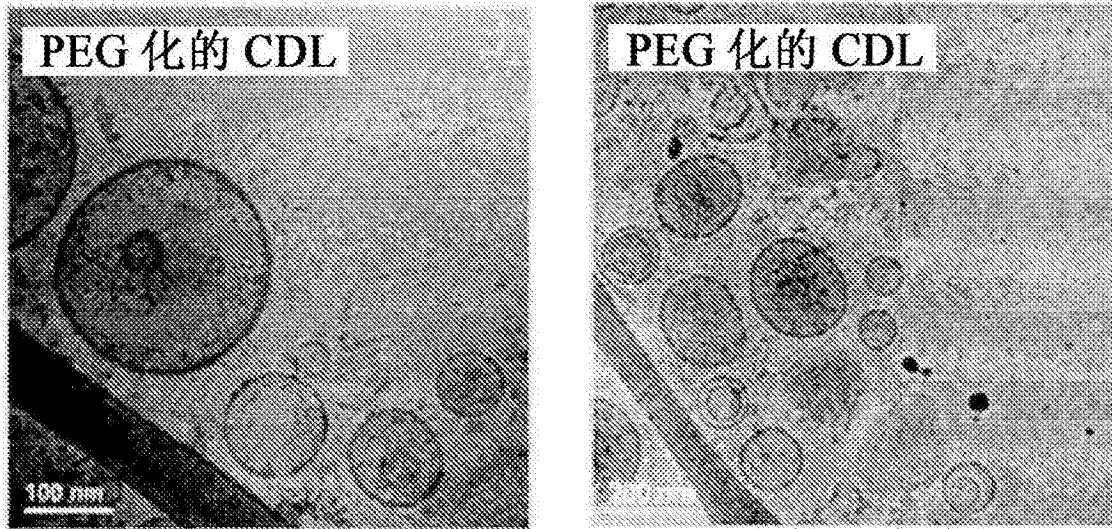


图4A

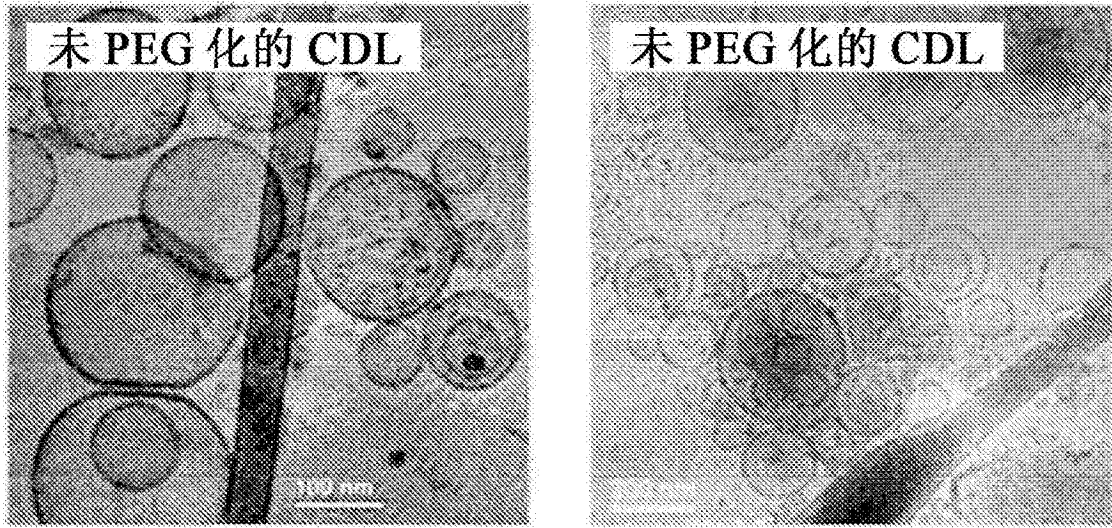


图4B

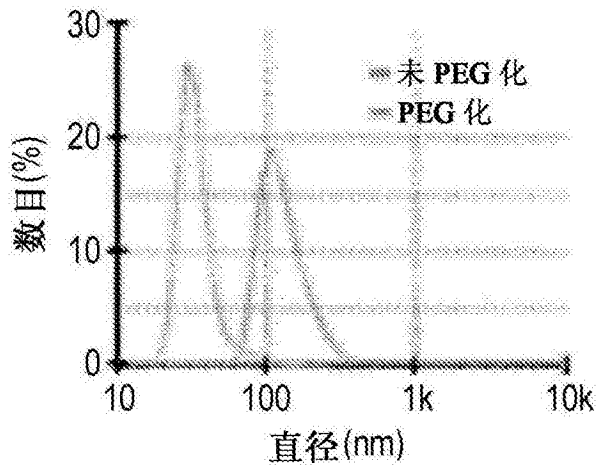


图5A

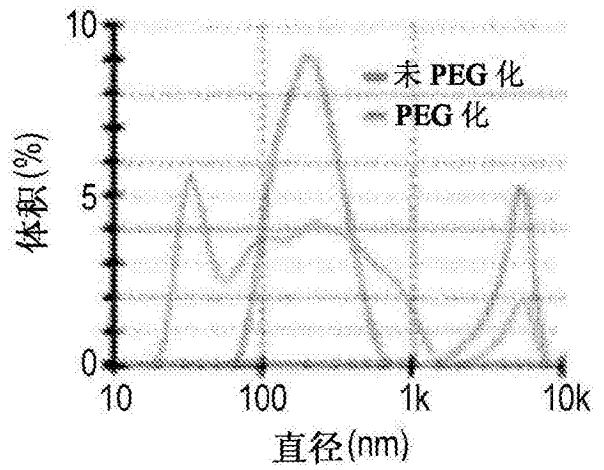


图5B

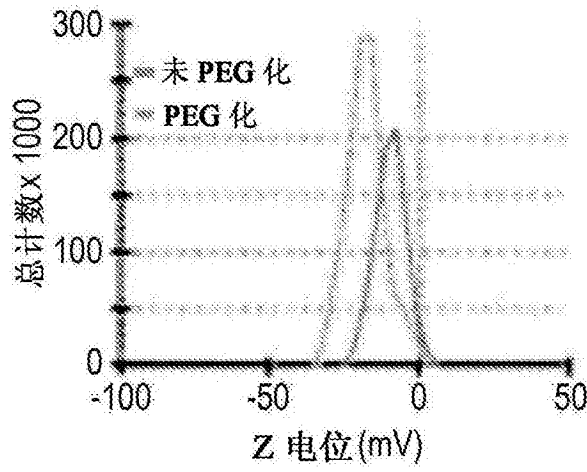


图5C

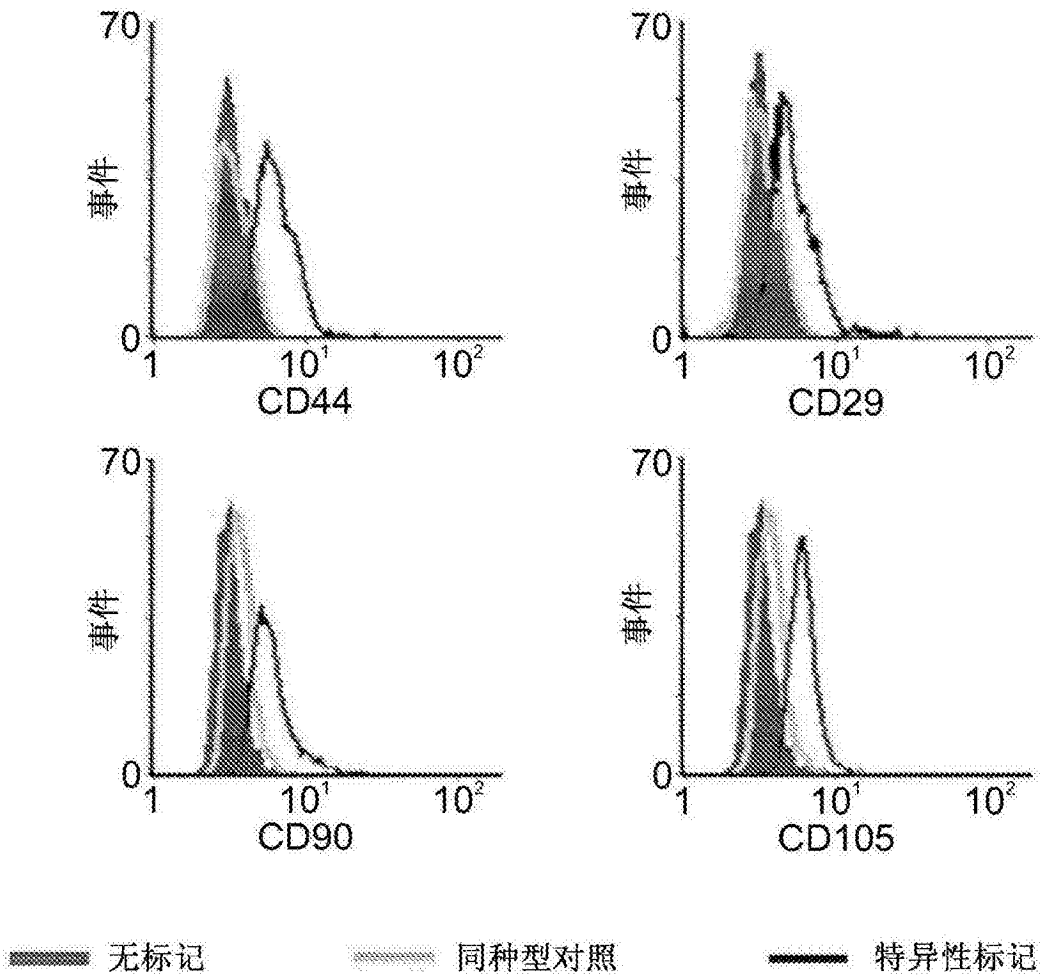


图6

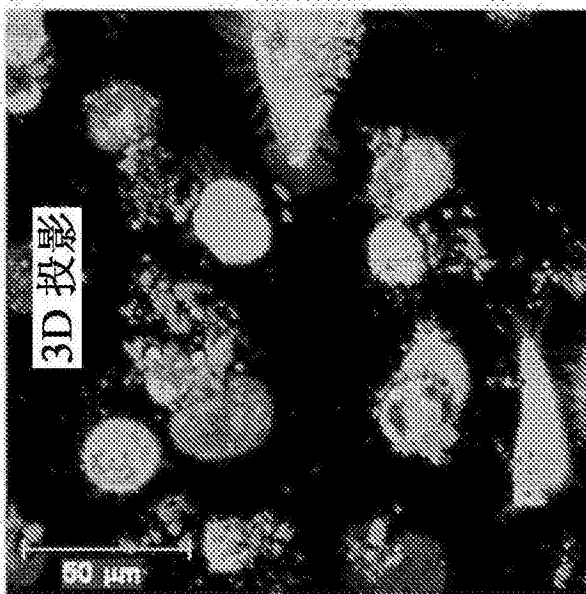


图7A

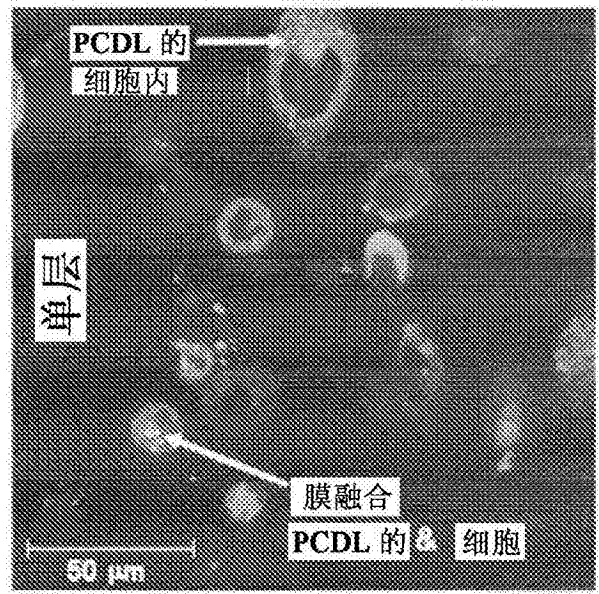


图7B

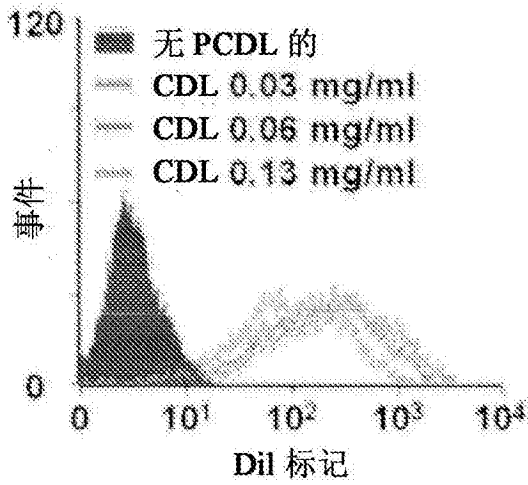


图8A

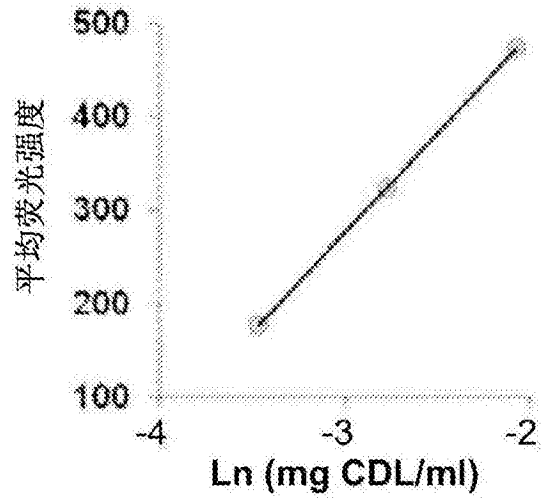


图8B

细胞与CDL的温育时间

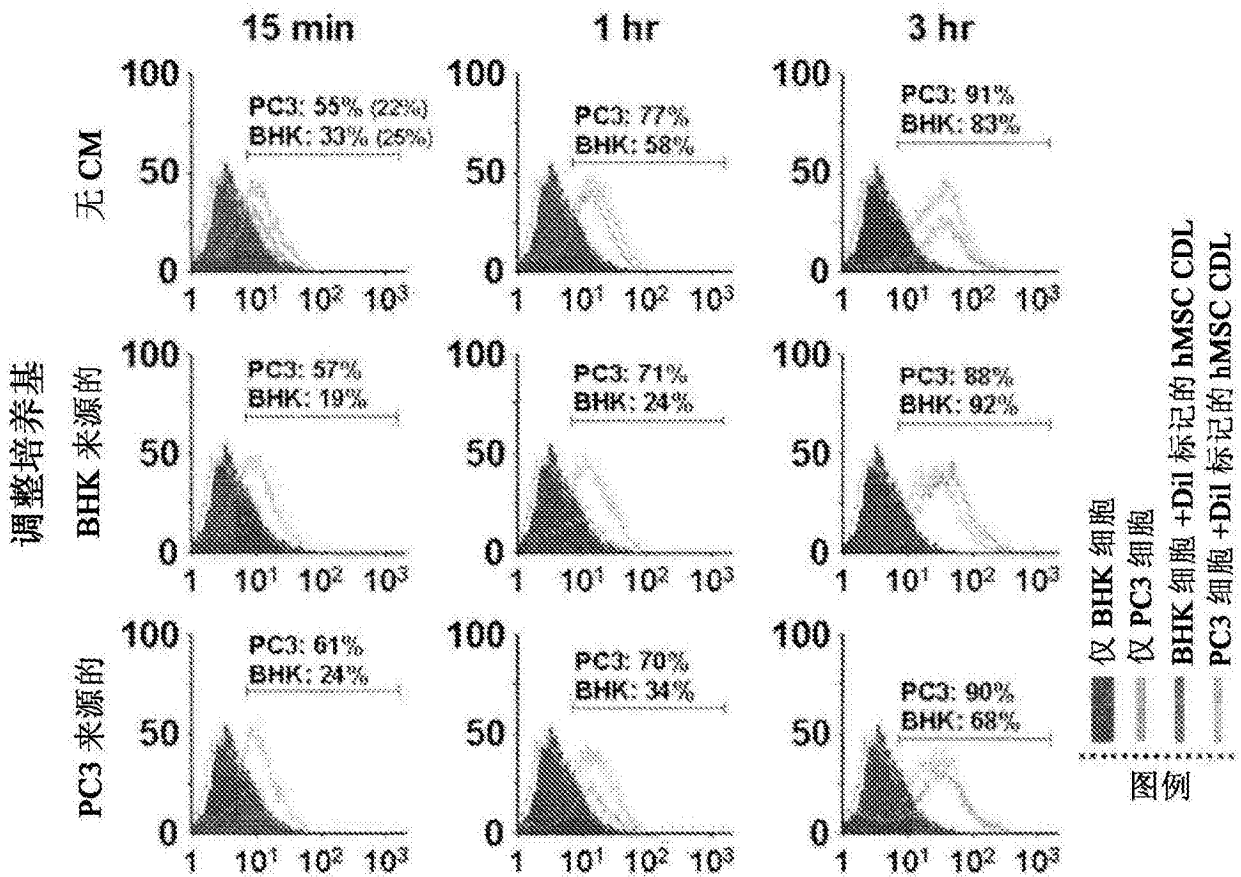


图9

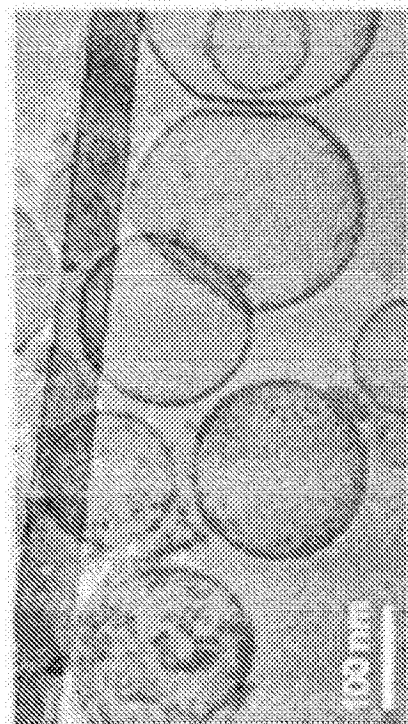
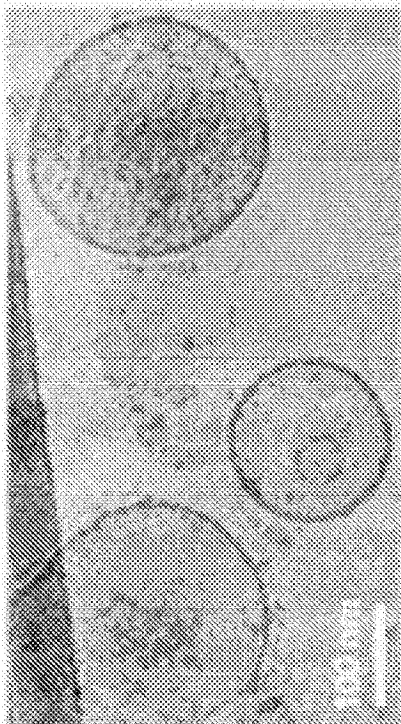
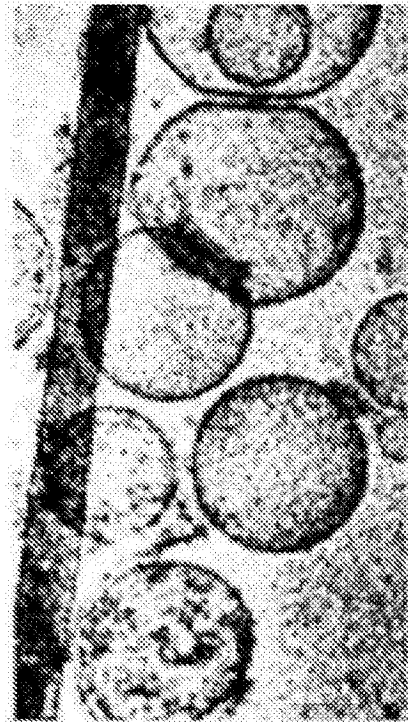


图10A

图10B

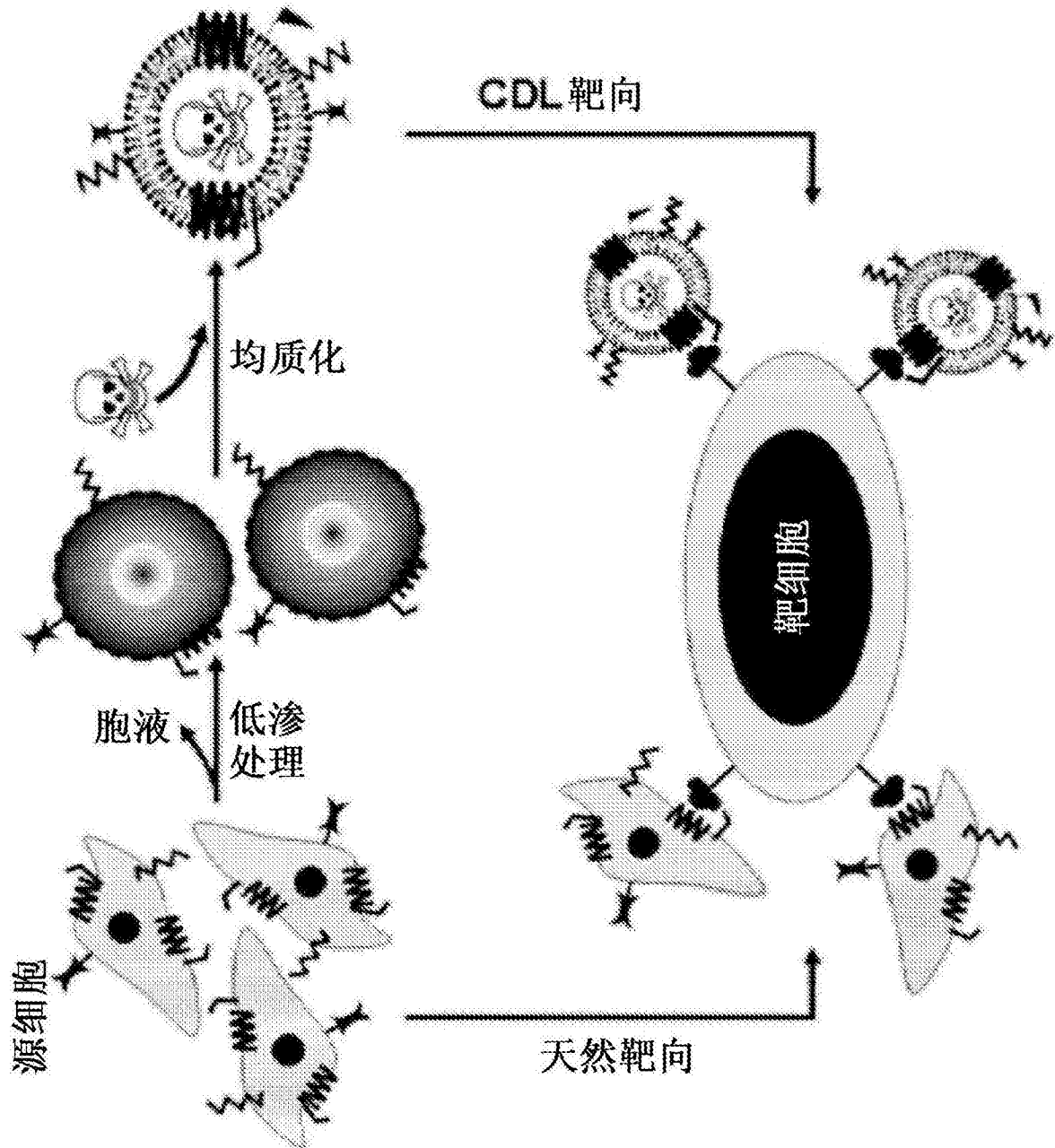


图11