(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114144191 A
(43)申请公布日 2022.03.04

(21)申请号 202080035613.2

(22)申请日 2020.05.13

(30)优先权数据
62/847,339 2019.05.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2020/050518 2020.05.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/230129 EN 2020.11.19

(71)申请人 哈达斯特医疗研究服务和开发有限公司
地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 S·赖夫 R·戈兰格斯尔

(74)专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理有限公司 11682
代理人 金洁 郇春艳

(51)Int.Cl.
A61K 35/20(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)

权利要求书3页 说明书18页
序列表2页 附图19页

(54)发明名称

用于治疗炎性肠病的源自于奶的细胞外囊泡

(57)摘要

本发明涉及包含从奶分离的外泌体的组合物及其用于治疗炎性肠病(IBD)的用途。具体来说,公开了源自于奶的外泌体和用其增补的肠内制剂,用于治疗IBD。

CN 114144191 A

1.一种用于治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的组合物,所述组合物包含从奶获得的外泌体,其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β,并且其中所述组合物被配制成用于肠内给药。

2.根据权利要求1所述使用的组合物,其中所述奶是牛奶、山羊奶或人奶。

3.根据权利要求1和2中的任一项所述使用的组合物,其中所述外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。

4.根据权利要求1至3中的任一项所述使用的组合物,其中所述一种或多种miRNA分子选自let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

5.根据权利要求1至4中的任一项所述使用的组合物,其中所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

6.根据权利要求1至5中的任一项所述使用的组合物,其中所述TGF-β是TGF-β1。

7.根据权利要求1至6中的任一项所述使用的组合物,其中所述外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

8.根据权利要求1至7中的任一项所述使用的组合物,其中所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20%(w/w)的酪蛋白。

9.根据权利要求1至8中的任一项所述使用的组合物,其中所述炎性肠病(IBD)选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。

10.根据权利要求9所述使用的组合物,其中所述溃疡性结肠炎是远端结肠炎。

11.根据权利要求10所述使用的组合物,其中远端结肠炎选自直肠炎、直肠乙状结肠炎和左侧结肠炎。

12.根据权利要求1所述使用的组合物,其中与IBD相关的所述病症是结肠袋炎。

13.根据权利要求1至12中的任一项所述使用的组合物,其中所述组合物被配制成用于口服给药或管饲。

14.根据权利要求1至12中的任一项所述使用的组合物,其中所述组合物被配制成用于直肠给药。

15.根据权利要求13所述使用的组合物,其中所述组合物被配制成营养药物或药物组合物、膳食制剂或膳食增补剂。

16.根据权利要求14所述使用的组合物,其中所述组合物被配制成灌肠剂、栓剂或泡沫。

17.根据权利要求1至16中的任一项所述使用的组合物,其中所述外泌体以约0.1mg至约250mg/Kg对象体重范围内的治疗有效量存在于所述组合物中。

18.根据权利要求17所述使用的组合物,其中所述外泌体的治疗有效量在约1mg至约50mg/Kg对象体重的范围内。

19.一种组合物,其包含从奶获得的外泌体,其中所述组合物被配制成用于直肠给药,并且其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β。

20.根据权利要求19所述的组合物,其中所述奶是牛、山羊或人的天然奶。

21.根据权利要求19和20中的任一项所述的组合物,其中所述外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。

22.根据权利要求19至21中的任一项所述的组合物,其中所述一种或多种miRNA分子选

自let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

23.根据权利要求19至22中的任一项所述的组合物，其中所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

24.根据权利要求19至23中的任一项所述的组合物，其中所述TGF-β是TGF-β1。

25.根据权利要求19至24中的任一项所述的组合物，其中所述外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

26.根据权利要求19至25中的任一项所述的组合物，其中所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20％(w/w)的酪蛋白。

27.根据权利要求19至26中的任一项所述的组合物，其被配制成灌肠剂、栓剂或泡沫。

28.根据权利要求27所述的组合物，其被配制成灌肠剂，所述灌肠剂包含载体和任选的增稠剂和/或润滑剂。

29.根据权利要求27所述的组合物，其被配制成栓剂，所述栓剂包含载体和增稠剂。

30.一种治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的方法，所述方法包括向需要治疗的对象给药包含治疗有效量的从奶获得的外泌体的组合物，其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β，并且其中所述组合物通过肠内给药途径给药，由此治疗IBD或与其相关的病症。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述奶是牛奶、山羊奶或人奶。

32.根据权利要求30和31中的任一项所述的方法，其中所述外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。

33.根据权利要求30至32中的任一项所述的方法，其中所述一种或多种miRNA分子选自let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

34.根据权利要求30至33中的任一项所述的方法，其中所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

35.根据权利要求30至34中的任一项所述的方法，其中所述TGF-β是TGF-β1。

36.根据权利要求30至35中的任一项所述的方法，其中所述外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

37.根据权利要求30至36中的任一项所述的方法，其中所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20％(w/w)的酪蛋白。

38.根据权利要求30至37中的任一项所述的方法，其中所述炎性肠病(IBD)选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。

39.根据权利要求38所述的方法，其中溃疡性结肠炎是远端结肠炎。

40.根据权利要求39所述的方法，其中远端结肠炎选自直肠炎、直肠乙状结肠炎和左侧结肠炎。

41.根据权利要求30所述的方法，其中与IBD相关的所述病症是结肠袋炎。

42.根据权利要求30至41中的任一项所述的方法，其中所述组合物通过口服给药或管饲来给药。

43.根据权利要求30至41中的任一项所述的方法，其中所述组合物通过直肠给药来给药。

44.根据权利要求42所述的方法，其中所述组合物被配制成营养药物或药物组合物、膳

食制剂或膳食增补剂。

45.根据权利要求43所述的方法，其中所述组合物被配制成灌肠剂、栓剂或泡沫。

46.根据权利要求30至45中的任一项所述的方法，其中所述外泌体的治疗有效量在约0.1mg至约250mg/Kg对象体重的范围内。

47.根据权利要求46所述的方法，其中所述外泌体的治疗有效量在约1mg至约50mg/Kg对象体重的范围内。

用于治疗炎性肠病的源自于奶的细胞外囊泡

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗炎性肠病(IBD)的源自于奶的外泌体。具体来说,本发明涉及用于治疗IBD或与其相关的病症的包含从奶分离的外泌体的组合物,其中所述组合物被配制成用于肠内给药。

背景技术

[0002] 外泌体是直径约30至150nm的纳米囊泡,其能够包装各种不同的组成成分,包括蛋白质、脂类、mRNA和miRNA。外泌体可以将它们的运载物转移到受体细胞,并因此充当可以介导细胞间通讯的细胞外信使。外泌体被认为是自身免疫性和炎性疾病例如类风湿性关节炎的新的潜在治疗方式。

[0003] 外泌体存在于生理流体例如血清、支气管肺泡灌洗液、尿液和母乳中。已发现,源自于哺乳动物奶的外泌体具有通过融合,在细胞内转移生物大分子例如miRNA的能力。已显示,哺乳动物奶含有高浓度的外泌体,其携带可以被肠上皮细胞摄取的有益miRNA例如miRNA-148(Golan-Gerstl R等,(2017),源自于奶的miRNA的表征和生物功能(Characterization and biological function of milk-derived miRNAs),Mol Nutr Food Res.2017;61(10))。还已显示,哺乳动物奶含有携带免疫抑制性细胞因子例如TGF-β的外泌体(Pieters BCH等,(2015),商品牛奶含有物理上稳定的表达免疫调节性TGF-β的细胞外囊泡(Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF-β),PLOS ONE,DOI:10.1371/journal.pone.0121123)。进一步的研究显示,从牛奶分离的囊泡的口服递送可以改善实验性关节炎(Arntz OJ等,(2015),牛奶来源的细胞外囊泡的口服给药在两种小鼠模型中减弱关节炎(Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models),Mol Nutr Food Res.,59:1701-12)。

[0004] 结肠炎是结肠内衬的炎性病症。结肠炎的病因多种多样,包括感染、炎性肠病(IBD)、结肠供血不足、或结肠壁被胶原或淋巴细胞侵入。存在各种不同类型的结肠炎,包括溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、显微镜下结肠炎。

[0005] 炎性肠病(IBD)是胃肠道的一种慢性复发性炎性疾病,传统上以两种主要表型为特征:克恩罗病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)。这两种表型通常均以严重的非经常性血性腹泻、腹痛、疲劳和体重减轻为特征。溃疡性结肠炎仅限于结肠,而克罗恩病可发生在口腔至肛门之间的任何部位。在克罗恩病中,肠道的健康部分被发炎区(死区)隔开。另一方面,溃疡性结肠炎是结肠的持续炎症,不涉及小肠。溃疡性结肠炎是一种影响结肠的黏膜层的表面炎症,而在克罗恩病中炎症是透壁性的,并且可以影响所有肠道层。

[0006] 目前用于治疗IBD的疗法主要聚焦于免疫抑制性药物上。然而,即使采用目前的药物治疗,IBD患者也常常经历复发。已确认,显著部分的患者对当前的治疗反应不充分。此外,已知IBD患者患结肠直肠癌(CRC)的风险提高。IBD患者可能会发生异常发育病变,其异

常发育前体通常是腺瘤性息肉。

[0007] Wang L等人(Front Pharmacol.2017,8:651)公开了源自于用日本血吸虫可溶性卵抗原处理的树突状细胞的外泌体,在腹膜内注射到小鼠时能够减轻葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎。

[0008] Mao F等人(Biomed Res Int.2017;2017:5356760)公开了源自于人脐带间充质干细胞的外泌体在静脉内注射时在小鼠中缓解DSS诱导的IBD。

[0009] 属于本发明人的WO 2017/090049公开了从奶分离的微囊泡、包含所述微囊泡的组合物及其用于制备奶制剂的用途。根据WO 2017/090049,所述包括外泌体和脂肪球的微囊泡包封了各种不同的miRNA分子。

[0010] 对用于治疗和预防IBD或与其相关的病症的改进的组合物和方法,仍存在未满足的需求。

发明内容

[0011] 本发明提供了用于治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的组合物,其包含从奶获得的外泌体,其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β,并且其中所述组合物被配制成用于肠内给药。本发明还提供了包含从奶获得的外泌体的组合物,其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β,并且其中所述组合物被配制成用于直肠给药。本发明还提供了治疗IBD或与其相关的病症的方法,所述方法包括向需要治疗的对象给药包含所述外泌体的肠内组合物。

[0012] 本发明部分源于下述令人吃惊的发现,即从奶获得或源自于奶的外泌体含有大量已知的抗炎性细胞因子TGF-β,特别是TGF-β1。

[0013] 首次公开了从人奶或牛奶的脱脂级分或从人奶或牛奶的脂肪级分分离的外泌体在口服给药到结肠炎的动物模型、即小鼠中的葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎时,高度有效地减轻或缓解了这些小鼠中的特征性疾病症状。现在已公开,源自于奶的外泌体在口服给药时不仅有效地阻止结肠炎小鼠的体重减轻,而且减轻了它们的结肠中的炎症并减弱了结肠炎的严重程度。

[0014] 本发明还公开了下述出人意料的发现,即口服给药到DSS诱导的结肠炎小鼠的、源自于奶的外泌体在这些小鼠的结肠中提高了TGF-β1蛋白和包括let7a、miR-320、miR-375和miR-148a在内的几种miRNA分子的表达,并降低了促炎性细胞因子例如TNF-α和IL-6的表达。

[0015] 现在还公开了,口服给药的源自于奶的外泌体不仅有效地在DSS处理的小鼠中治疗结肠炎,而且有效地减弱所述疾病的发展。此外,源自于奶的外泌体在小鼠中减轻结肠炎的严重程度的效果大于或甚至优于已知的营养粉状饲料即Modulen® IBD的效果。不受任何理论或作用机制限制,所述源自于奶的外泌体对结肠炎的改进的治疗效果,可能是由于包含或包封在所述外泌体内的TGF-β、特别是TGF-β1与其游离的、未包封的形式相比稳定性提高。这种改进的治疗效果也可能是由于存在TGF-β1而不是TGF-β2作为包含在所述源自于奶的外泌体中的TGF-β的主要形式。

[0016] 因此,本发明的包含源自于奶的外泌体的肠内组合物是安全的,提供了IBD病症的高度有效的预防和/或治疗药物,比目前可用于IBD患者的膳食制剂更加有效,并且患者顺

从性明显比肠胃外制剂更高。

[0017] 根据第一方面，本发明提供了一种用于治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的组合物，其包含从奶获得的外泌体，其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β，并且其中所述组合物被配制成用于肠内给药。

[0018] 根据某些实施方式，所述奶是牛奶、山羊奶或人奶。根据其他实施方式，所述外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。根据其他实施方式，所述奶在哺乳期之前、期间和/或之后获得。根据另外的其他实施方式，所述奶被巴氏消毒或未被巴氏消毒。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0019] 根据其他实施方式，所述一种或多种miRNA分子选自let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据另外的其他实施方式，所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

[0020] 根据其他实施方式，所述TGF-β是TGF-β1。

[0021] 根据其他实施方式，所述外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

[0022] 根据其他实施方式，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20％(w/w)的酪蛋白。

[0023] 根据某些实施方式，所述炎性肠病(IBD)选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0024] 根据其他实施方式，溃疡性结肠炎是远端结肠炎。

[0025] 根据其他实施方式，远端结肠炎选自直肠炎、直肠乙状结肠炎和左侧结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0026] 根据一个实施方式，与IBD相关的所述病症是结肠袋炎。

[0027] 根据某些实施方式，所述组合物被配制成用于口服给药或用于管饲。

[0028] 根据其他实施方式，所述组合物被配制成用于直肠给药。

[0029] 根据另外的其他实施方式，所述组合物被配制成营养药物(nutraceutical)或药物组合物、膳食制剂或膳食增补剂。

[0030] 根据另外的其他实施方式，所述被配制成用于直肠给药的组合物以灌肠剂、栓剂或泡沫的形式存在。

[0031] 根据某些实施方式，所述外泌体以约0.1mg至约250mg/Kg对象体重范围内的治疗有效量存在于所述组合物中。根据其他实施方式，所述外泌体的治疗有效量在约1mg至约50mg/Kg对象体重的范围内。

[0032] 根据另一方面，本发明提供了一种组合物，其包含从奶获得的外泌体，其中所述组合物被配制成用于直肠给药，并且其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β。

[0033] 根据某些实施方式，所述奶是牛、山羊或人奶。根据其他实施方式，所述外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。根据其他实施方式，所述奶在哺乳期之前、期间和/或之后获得。根据另外的其他实施方式，所述奶被巴氏消毒或者不被巴氏消毒。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0034] 根据其他实施方式，所述包含或包封在组合物的外泌体中的一种或多种miRNA分子选自let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根

据另外的其他实施方式,所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

[0035] 根据其他实施方式,所述组合物中的外泌体的TGF-β是TGF-β1。

[0036] 根据另外的其他实施方式,所述组合物的外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

[0037] 根据另外的其他实施方式,所述组合物的外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20%(w/w)的酪蛋白。

[0038] 根据某些实施方式,所述组合物被配制成灌肠剂、栓剂或泡沫。根据一个示例性实施方式,所述组合物被配制成灌肠剂,其包含载体和任选的增稠剂和/或润滑剂。根据另一个示例性实施方式,所述组合物被配制成栓剂,其包含载体和增稠剂。

[0039] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的方法,所述方法包括向需要治疗的对象给药包含治疗有效量的从奶获得的外泌体的组合物,其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β,并且其中所述组合物通过肠内给药途径给药,从而治疗IBD或所述与其相关的病症。

[0040] 根据某些实施方式,所述用于获得实践本发明的方法的外泌体的奶是牛奶、山羊奶或人奶。根据其他实施方式,所述用于实践本发明的方法的外泌体从所述奶的脱脂级分和/或所述奶的脂肪级分获得。根据其他实施方式,所述奶在哺乳期之前、期间和/或之后获得。根据另外的其他实施方式,所述奶被巴氏消毒或不被巴氏消毒。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0041] 根据其他实施方式,所述一种或多种miRNA分子选自let-7a、miR-320,miR-375和miR-148a。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据另外的其他实施方式,所述miRNA分子包含let-7a、miR-320、miR-375和miR-148a。

[0042] 根据某些实施方式,所述用于实践本发明的方法的外泌体的TGF-β是TGF-β1。

[0043] 根据其他实施方式,所述待使用的外泌体还包含选自蛋白质、肽、核酸分子和脂类的至少一种生物活性化合物。

[0044] 根据其他实施方式,所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20%(w/w)的酪蛋白。

[0045] 根据另外的其他实施方式,所述待治疗的炎性肠病(IBD)选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0046] 根据另外的其他实施方式,溃疡性结肠炎是远端结肠炎。

[0047] 根据另外的其他实施方式,远端结肠炎选自直肠炎、直肠乙状结肠炎和左侧结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0048] 根据一个实施方式,待治疗的与IBD相关的病症是结肠袋炎。

[0049] 根据某些实施方式,所述组合物通过口服给药或通过管饲来给药。

[0050] 根据其他实施方式,所述组合物通过直肠给药来给药。

[0051] 根据其他实施方式,所述待给药的组合物被配制成营养药物或药物组合物、膳食制剂或膳食增补剂。

[0052] 根据另外的其他实施方式,所述待给药的组合物被配制成灌肠剂、栓剂或泡沫。

[0053] 根据另外的其他实施方式,所述待给药的组合物中的外泌体的治疗有效量在约0.1mg至约250mg/Kg对象体重的范围内。根据另外的其他实施方式,所述外泌体的治疗有效

量在约1mg至约50mg/Kg对象体重的范围内。

[0054] 从下面的描述和附图，本发明的其他目的、特点和优点将变得清楚。

附图说明

[0055] 图1A-K示出了从牛奶或人奶分离的外泌体的表征。图1A示出了从牛奶或人奶分离的外泌体的数量。图1B和1C分别示出了牛或人MDE的透射电子显微术分析，使用了负染色。图1D和1E分别示出了牛或人MDE的nanosight分析。图1F和1G分别示出了通过DLS测定的牛或人的分离MDE的粒度分布(根据强度)。图1H和1I分别示出了在牛或人的源自于奶的外泌体中作为外泌体的标志物的CD81和CD9以及作为阴性对照的HSP70的蛋白质表达。图1J和1K分别示出了牛或人MDE中的miRNA-148和miRNA-320的表达。

[0056] 图2A-C示出了从奶的脂肪级分分离的外泌体得分析。图2A是从人奶的脂肪级分分离的外泌体中CD81和CD9(外泌体特征性蛋白质)和HSP70(阴性对照)的表达的Western印迹分析。图2B-C示出了从牛奶的脂肪级分分离的外泌体的透射电子显微术分析。图2D示出了在根据方案A(A)、方案B(B)或方案C(C)从牛奶分离的外泌体中miRNA-148a-3p(miRNA-148)的表达的qRT-PCR分析。

[0057] 图3示出了在从几批牛奶分离的源自于奶的外泌体(MDE)中、在以70,000g超速离心(ULT)后的沉淀物中和在以135,000g超速离心后的上清液中TGF-β1和CD81的Western印迹分析。

[0058] 图4A-C示出了源自于奶的外泌体在口服给药后被小鼠的肠道摄取。图4A-B示出了在用从牛奶(图4A)或人奶(图4B)分离、然后用荧光染料DiR标记的外泌体通过管饲法给药的小鼠中外泌体分布的荧光图像。图4C示出了在7天的时间段内用从牛奶或人奶分离的外泌体治疗的小鼠的体重。也呈现了未治疗小鼠的体重。

[0059] 图5A-F示出了在DSS小鼠模型中源自于奶的外泌体的口服给药阻止了结肠炎的发展。图5A-D示出了来自于治疗过的小鼠(DSS，使用或不使用外泌体；分别为图5D和5B)或对照小鼠(未用DSS处理，使用或不使用外泌体；图5C和5A)的代表性结肠区段，其通过H&E染色法染色。图5E示出了图5A-D的H&E染色区段的组织学评分。图5F示出了测试过的组中的疾病活动指数(DAI)。

[0060] 图6A-H示出了从牛奶或人奶分离的源自于奶的外泌体的口服给药减弱了DSS诱导的结肠炎的严重程度。图6A和6C示出了在DSS处理的第1天(DSS D1)和在7天的DSS处理和随后2天不使用DSS或外泌体后的第9天(EXO-D9)时DSS处理的小鼠的体重。图6B和6D示出了在DSS处理的第1天(DSS D1)和在7天的DSS处理和随后使用从牛奶(EXO+D9；图6B)或人奶(EXO+D9；图6D)分离的外泌体治疗2天后的第9天时DSS处理的小鼠的体重。图6E-F示出了从牛奶(图6E)或人奶(图6F)分离的外泌体(EXO+)对结肠缩短的影响。图6G-H示出了在用从牛奶(图6G)或人奶(图6H)分离的外泌体(EXO+)治疗后的病理学评分。

[0061] 图7A-B示出了在MDE治疗后结肠炎结肠中TGF-β1的表达。图7A示出了在未治疗(EXO-)或用源自于奶的外泌体(EXO+)治疗的结肠炎小鼠的结肠中TGF-β1和β-肌动蛋白的蛋白质水平的Western印迹分析。图7B是呈现了图7A的Western印迹分析结果的柱状图。

[0062] 图8A-D示出了在MDE治疗后，奶中高表达的miRNA在结肠炎小鼠的结肠中的表达。呈现了在用源自于奶的外泌体治疗(EXO+)或未用外泌体治疗(EXO-)的结肠炎小鼠的结肠

中let7a(图8A)、miRNA-320(图8B)、miRNA-375(图8C)和miRNA-148(图8D)的表达。

[0063] 图9A-B示出了在MDE治疗后,IL-6和TNF-α基因在结肠炎小鼠的结肠中的表达。确定了用外泌体治疗(EXO+)或未用外泌体治疗(EXO-)的结肠炎小鼠的结肠中TNF-α(图9A)或IL-6(图9B)的基因表达。

具体实施方式

[0064] 本发明提供了用于治疗炎性肠病(IBD)或与其相关的病症的、包含源自于奶的外泌体的组合物,其中所述外泌体包含或包封一种或多种miRNA分子和TGF-β,并且其中所述组合物被配制成用于肠内给药。本发明还提供了包含源自于奶的外泌体的组合物,其中所述组合物被配制成用于直肠给药,并且其中所述外泌体包含或包封一种或多种miRNA分子和TGF-β。本发明还提供了治疗IBD或与其相关的病症的方法,所述方法包括向需要治疗的对象给药包含一种或多种miRNA和TGF-β的组合物,并且其中所述组合物通过肠内给药途径给药。

[0065] 定义

[0066] 术语“奶”和“天然奶”在整个本说明书和权利要求书中可互换使用,并且是指由成熟雌性哺乳动物的乳腺产生的为其幼崽提供营养的营养性液体。奶可以分为两个主要级分:在本文中被称为“脱脂”的液体级分(或“脱脂奶”或“脱脂级分”或“脱脂奶级分”),和“脂肪”级分。所述脱脂奶级分是在去除乳脂后获得的奶级分。在某些实施方式中,术语“乳清”、“乳清级分”、“脱脂奶”、“脱脂级分”和“脱脂奶级分”可互换使用。在某些实施方式中,所述脱脂级分包括乳清级分。

[0067] 当在本文中使用时,术语“治疗”等是指获得所需的药理和/或生理效果。所述效果在完全或部分预防疾病或其症状方面可以是预防性的,和/或在部分或完全治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不良作用方面可以是治疗性的。当在本文中使用时,“治疗”涵盖了对哺乳动物、优选为人类中的疾病的任何治疗,并包括:(a)在无症状期间降低疾病的发生率和/或复发风险;(b)缓解或减轻所述疾病的症状;(c)在可能对疾病易感但尚未被诊断为患有所述疾病的对象中阻止所述疾病的发生;(d)抑制所述疾病,即阻止其发展(例如降低疾病进展速率);(e)减少疾病发作的频率;和(f)缓解疾病,即引起疾病消退。

[0068] 术语“外泌体”是指直径在30至200nm之间的一类微囊泡。外泌体在多泡体与质膜融合时从细胞释放出来,或者直接从质膜释放出来。外泌体可以从奶的脱脂级分(例如脱脂奶级分)和/或奶的脂肪级分获得或分离或衍生。

[0069] 术语“microRNA”和“miRNA”是指一类小的非编码RNA分子,其可以在靶基因表达的转录和转录后调控中发挥作用。

[0070] 当在本文中使用时,术语“组合物”是指包含源自于奶的外泌体和任选的载体和/或一种或多种赋形剂的组合物。本发明的组合物被配制成用于肠内给药。

[0071] 当在本文中使用时,术语“营养药物组合物”是指从食物分离或纯化的可食用组合物,其具有生理益处或在口服给药时提供针对疾病的保护或减弱。因此,所述营养药物组合物可以单独地或与可食用食品或饮料混合,以膳食制剂或增补剂的形式存在。

[0072] 术语“膳食制剂”包括但不限于完全膳食制剂、部分或不完全膳食制剂和疾病或病症特异性膳食制剂。完全膳食制剂(即其含有所有必需的宏量和微量营养物例如蛋白质、糖

类、脂肪、维生素和矿物质)可用作患者的唯一营养来源。患者可以从此类完全膳食制剂获得100％的营养需求。部分或不完全膳食制剂不含所有必需的宏量和微量营养物,并且不能用作患者的唯一营养来源。部分或不完全膳食制剂可用作膳食或营养增补剂。疾病或病症特异性膳食制剂是递送营养物或药物的制剂,并且可以是完全或部分膳食制剂。术语“肠内制剂”、“肠内营养制剂”和“营养组合物”具有与膳食制剂相同的含义,并且在整个本说明书和权利要求书中可互换使用。在某些实施方式中,除了在本文所公开的从奶获得或分离的外泌体中包封的miRNA分子之外,所述膳食制剂或增补剂不包含其他miRNA分子。

[0073] 当在本文中使用时,术语“肠内给药”是指涉及食道、胃、小肠和大肠(即胃肠道)的任何给药。给药方法包括口服、颊、舌下(在舌下溶解药物)和直肠给药以及管饲。

[0074] 术语“管饲”是指除了通过口服给药之外将组合物给药到患者的胃肠道,包括但不限于通过鼻胃管、口胃管、胃管、空肠造口术管(J-管)、经皮内窥镜胃造口术(PEG)、端口例如提供进入胃、空肠的胸壁端口和其他适合的进入端口。

[0075] 当在本文中使用时,术语“载体”包括当与组合物的活性药剂组合时,允许所述活性药剂保留生物活性而不引起与对象免疫系统的破坏性反应的任何材料。

[0076] 术语“可药用”意味着被美国联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他公认药典中列出的可以在动物、更特别是人类中使用。

[0077] 术语“炎性肠病”(IBD)是指一类涉及消化道的全部或一部分的慢性炎症的疾病。所述术语包括本领域中已知的所有种类的IBD。IBD主要包括克罗恩病和溃疡性结肠炎。

[0078] 术语“克罗恩病”的特征在于沿着消化道内衬出现的炎症,并且经常扩散到受影响的组织深处。由克罗恩病引起的炎症可能涉及从口腔到肛门的消化道的不同区域。受克罗恩病影响的最常见区域是被称为回肠和结肠的小肠的最后一部分。炎症可能局限于肠壁,这会导致疤痕形成(狭窄),或者炎症可能穿过肠壁扩散(瘘管)。克罗恩病的体征和症状可以从轻微到严重不等,并且可能会逐渐发展或无警示地突然出现。体征和症状包括但不限于腹泻、腹痛和痉挛、恶心和呕吐、便血、肠道表面或口腔溃疡、食欲下降和体重减轻、发烧、疲劳、关节炎、眼部炎症、皮肤障碍、肝脏或胆管发炎以及生长或性发育迟缓(在儿童中)。

[0079] 术语“结肠炎”是指结肠内衬的炎症。已知根据疾病的病因命名的各种不同类型的结肠炎,包括但不限于溃疡性结肠炎、克罗恩结肠炎、改道性结肠炎、缺血性结肠炎、感染性结肠炎、爆发性结肠炎、胶原性结肠炎、化学性结肠炎、显微镜下结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、白塞氏病、未定型结肠炎和典型结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0080] 溃疡性结肠炎(UC)的特征在于结肠中的长期持续的炎症。症状通常随着时间而发展而不是突然出现。溃疡性结肠炎通常只影响大肠(结肠)和直肠的最内层。它通过结肠的连续延伸而发生。溃疡性结肠炎分为:仅涉及直肠的直肠炎,涉及直肠和乙状结肠的直肠乙状结肠炎,涉及远至降结肠或脾曲的延伸段的左侧结肠炎,以及全结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0081] 当在本文中使用时,术语“结肠袋炎”是指回肠袋(在经历结肠切除术的患者中在回肠组织外通过手术形成的人造直肠)的炎症,这是在患有溃疡性结肠炎、未定型结肠炎或其他类型的结肠炎的患者的管理中产生的。

[0082] 术语活性药剂的“治疗有效量”是所述药剂的足以为给药所述药剂的对象提供有益效果的量。化合物的有效量可能随着诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重等因素而

变。

[0083] 外泌体和制备方法

[0084] 本发明提供了从奶获得的外泌体及其用于治疗IBD或与其相关的病症的用途。

[0085] 本发明的外泌体通过包括将奶分级并获得脱脂级分和脂肪级分的方法从奶获得。本发明的外泌体可以从所述奶的脱脂级分和/或脂肪级分获得/分离。

[0086] 根据某些实施方式,将奶通过在4℃下以5000g-6500g离心30分钟进行分级。从奶获得两个级分:脂肪级分和脱脂奶级分。将所述脱脂级分在4℃下以12000g离心1小时。接下来,可以将上清液通过过滤器(例如0.45和0.22μm过滤器)过滤。然后可以将所述过滤的上清液在4℃下以50000-100000g(例如70000g)超速离心30-120分钟(例如30分钟),以沉淀酪蛋白。可以将所述沉淀物舍弃,并且可以将所述上清液在4℃下以80000-150000g(例如135000g)超速离心30-180分钟(例如90分钟)任何次数例如一次或两次。所述得到的沉淀物包括从所述脱脂奶级分获得/分离的奶外泌体。

[0087] 根据某些实施方式,提供了一种从奶获得外泌体的方法,所述方法包括将奶在4℃下以1000-8000g(例如5000g-6500g)离心30分钟,以获得奶的两个级分:脂肪级分和脱脂奶级分。将所述脂肪级分通过从-80℃或-20℃至37℃和60℃的冷却-加热循环(2-4个循环)进行处理。接下来,可以将脂肪层在4℃下以8000-15000g(例如10000g)离心10-30分钟(例如10分钟)。此时,可以将沉淀物舍弃,并且可以将上清液通过过滤器(例如0.45和/或0.22μm过滤器)过滤,并且可以将过滤的溶液已80000-100000g(例如100000g)超速离心30-90min(例如60min)。将沉淀物舍弃并将上清液在4℃下以135000g离心90分钟。所述得到的沉淀物包括从所述脂肪级分分离的外泌体。

[0088] 根据本发明,通过这些方法获得的外泌体是有利的,因为它们对于进一步使用来说是安全的。外泌体的分离涉及离心和在用作清洗试剂的适合缓冲液(例如PBS)和/或乙酸和/或柠檬酸钠存在下的过滤步骤,并且不涉及可能使所述过程昂贵和安全性降低的其他试剂或装置。通过这些方法获得的外泌体可以被容易地添加到肠内制剂,以增补此类制剂。此外,此类外泌体可以提供IBD或与其相关的病症的预防和/或治疗效果。

[0089] 所述奶可以从各种不同的适合来源获得,包括但不限于牛(奶牛)、山羊、人、骆驼等。在某些实施方式中,所述奶可以在哺乳期之前、期间和/或之后的各个不同时间点获得。所述奶可以在一天中的各个不同时间点(例如早晨、傍晚、午夜)获得。所述奶可以在分娩后的各个不同时间点获得。

[0090] 所述外泌体可以从巴氏消毒之前或之后的牛奶获得。所述外泌体可以从牛奶的脱脂级分和/或脂肪级分和/或乳清级分获得。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0091] 所述外泌体可以从巴氏消毒之前或之后的山羊奶或骆驼奶获得。所述外泌体可以从山羊或骆驼奶的脱脂级分和/或脂肪级分和/或乳清级分获得。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0092] 所述外泌体可以从人类女性母乳获得。所述外泌体可以从人奶的脱脂级分和/或脂肪级分和/或乳清级分获得。所述人奶可以从足月婴儿母亲的母乳和/或早产儿母亲的母乳获得。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0093] 在从不同来源的奶获得的外泌体之间,外泌体中的分子的特性和/或相对丰度可能相同或不同。此外或可选地,在一天中的不同时间获得的从奶分离的外泌体之间,miRNA

的特性和/或相对丰度可能相同或不同。

[0094] 根据本发明的原理，本文中公开的外泌体包含或包封或包围一种或多种miRNA分子和TGF-β。所述外泌体还可以包含或包封另外的生物组分，包括核酸、蛋白质、肽、脂类、矿物质、激素等。

[0095] 在某些实施方式中，所述外泌体包含/包封/包括选自let-7b、mir-320、miR-375和miR-148a的一种或多种miRNA分子。每种可能性是独立的实施方式。

[0096] 在某些实施方式中，所述外泌体包含或包封let-7b、mir-320、miR-375和miR-148a。在某些实施方式中，所述外泌体还包含选自miR-26、miR-99、miR-30、let-7a、miR-146和miR-200的一种或多种miRNA分子。每种可能性是独立的实施方式。

[0097] 在某些实施方式中，所述外泌体包含或包封TGF-β1。在某些实施方式中，所述外泌体包含膜联蛋白A1和/或黏蛋白-1。每种可能性是独立的实施方式。

[0098] 在某些实施方式中，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约20％的酪蛋白。在某些实施方式中，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约10％的酪蛋白。在某些实施方式中，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约5％的酪蛋白。在某些实施方式中，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约2％的酪蛋白。在某些实施方式中，所述外泌体包含少于所述外泌体的总蛋白的约1％的酪蛋白。在某些实施方式中，所述外泌体基本上不含酪蛋白。

[0099] 在某些实施方式中，所述外泌体可以以脱水形式添加到所述组合物。在某些实施方式中，所述外泌体可以以冷冻干燥形式添加到所述组合物。在某些实施方式中，所述外泌体可以以任何适合的形式添加到所述组合物。

[0100] 肠内组合物

[0101] 本发明提供了包含源自于奶的外泌体的组合物，其中所述组合物被配制成用于肠内给药。所述组合物可以被配制成用于口服、颊、舌下或直肠给药或用于管饲。

[0102] 所述组合物可以采取溶液、悬液、乳液、片剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等的形式。所述组合物可以被配制成灌肠剂、栓剂、储库型片剂(受控释放片剂)或泡沫，用于直肠给药。

[0103] 所述被配制成片剂或胶囊的组合物可以包括标准载体例如制药级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适合的制药载体的实例描述在E.W.Martin的《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中。

[0104] 所述组合物可以被配制成包含所述从奶获得或分离的外泌体的膳食制剂或增补剂。所述膳食制剂或增补剂还可以包含其他组分，例如蛋白质来源、糖类来源、一种或多种必需脂肪酸、维生素和矿物质来源和乳化剂。所述糖类来源可以是任何简单或复合糖类，例如单糖、二糖或寡糖。所述糖类来源可以是玉米淀粉、右旋糖、葡萄糖或其组合。所述蛋白质来源可以是任何蛋白质、蛋白质水解物、肽混合物或氨基酸混合物，例如奶、蛋、大豆或肉类蛋白质。所述蛋白质水解物在自然界中可以部分水解，并包括显著部分的链长可变的肽。在某些实施方式中，仅水解具有最高生物学价值的蛋白质，例如乳清、乳清蛋白、酪蛋白、蛋清、蛋固体或大豆。在某些实施方式中，所述蛋白质来源不含乳糖，并且在制剂中避免使用游离氨基酸。根据现在被称为每日参考摄入量(DRI)的推荐膳食许可量(RDA)，所述膳食制剂或增补剂还可以包含维生素和矿物质。所述膳食制剂或增补剂可以进一步包含乳化剂或其他无活性成分例如甜味剂和/或调味剂，它们可以是人造的。根据一个示例性实施方式，

所述膳食制剂或增补剂采取将用液体重构的粉剂的形式。

[0105] 当配制成溶液、悬液或乳液时，所述组合物可以包含例如水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)等作为载体。此类包含源自于奶的外泌体的溶液、悬液或乳液可以被包装在单剂或多剂包装中，用于通过饲管给药。

[0106] 所述组合物可以被配制成用于直肠给药。例如，灌肠剂组合物包含在适合载体中的有效量的源自于奶的外泌体，所述载体例如水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、醇或水性-醇性流体。优选地，将所述组合物用天然或合成增稠剂或胶凝剂例如树胶、丙烯酸酯、卡波姆或改性纤维素增稠。所述组合物还可以包含有效量的润滑剂，例如天然或合成脂肪或油即三脂肪酸甘油酯或卵磷脂。也可以包括无毒的非离子型表面活性剂作为润湿剂和分散剂。灌肠剂组合物的单位剂型可以从预装填的袋子或注射器给药。所述组合物也可以包含有效量的发泡剂例如正丁烷、丙烷或异丁烷。此类组合物可以从预装注射器加压容器递送，以便将所述组合物作为泡沫递送到结肠，这抑制了它从靶位点的逃逸。

[0107] 当所述组合物将要作为灌肠剂给药时，只需将它溶解或分散在小体积例如100ml或更少的液体例如水性混合物中。优选地使所述组合物等渗，以避免对受影响组织的水平衡的任何扰乱。因此，用于灌肠剂的载体可以是生理缓冲盐水。将灌肠剂组合物制备成固体可能是方便的，其包含一定量的所述外泌体和适合量的缓冲剂，在使用时用例如去离子水重构。或者，所述灌肠剂可以作为液体例如在PBS中储存，并以该形式给药。

[0108] 一般来说，栓剂通常从低熔点固体材料制备，其以固体形式给药并在直肠中融化，以释放分散在固体基质中的活性药剂。传统上，所述制成栓剂的固体是油状或蜡状材料例如可可脂等。还使用了温和的石油和植物蜡，以及用此类蜡增稠的植物油的混合物。胶凝剂的可利用性使得能够在水基材料中制备此类制剂，避免了对身体来说相当外源的油状或蜡状材料的给药。此类水基栓剂可以如下制备：将所述外泌体溶解或悬浮在水中，优选地通过添加适合的无机盐使其等渗，然后通过添加增稠剂或胶凝剂例如树胶或改性纤维素使混合物增稠，直至所述组合物在室温下变成软固体，但在身体温度下会液化。通过将所述产品标记为冷藏储存，可以容易地减少平衡栓剂的融化温度的问题。

[0109] 根据本发明的原理，添加到所述组合物的外泌体保留了包含在其中的组分的至少一部分生物活性和/或化学稳定性。

[0110] 本发明的组合物可以包含已知减轻或缓解IBD或与其相关的病症的一种或多种药物。此类药物的实例包括抗炎药剂，包括但不限于皮质类固醇和氨基水杨酸盐，例如美沙拉嗪、巴柳氮和奥沙拉嗪；免疫抑制药物，包括但不限于硫唑嘌呤、巯基嘌呤、环孢菌素和甲氨蝶呤；肿瘤坏死因子(TNF)-α抑制剂；中和TNF-α的生物制剂；以及抗生素。

[0111] 治疗方法

[0112] 本发明提供了用于治疗或预防IBD或与其相关的病症的包含源自于奶的外泌体的组合物，其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β，并且其中所述组合物被配制成用于肠内给药。本发明还提供了治疗或预防IBD或与其相关的病症的方法，所述方法包括向需要治疗的对象给药包含治疗有效量的源自于奶的外泌体的组合物，其中所述外泌体包含一种或多种miRNA分子和TGF-β，并且其中所述组合物通过肠内给药途径给药，从而治疗或预防IBD。

[0113] 根据某些实施方式，所述IBD选自克罗恩病和结肠炎。根据其他实施方式，结肠炎

包括但不限于溃疡性结肠炎、改道性结肠炎、缺血性结肠炎、感染性结肠炎、爆发性结肠炎、胶原性结肠炎、化学性结肠炎、显微镜下结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、白塞氏病、未定型结肠炎和典型结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0114] 根据其他实施方式，溃疡性结肠炎(UC)包括直肠炎、直肠乙状结肠炎、左侧结肠炎和全结肠炎。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0115] 根据另外的其他实施方式，与IBD相关的病症是结肠袋炎。根据另外的其他实施方式，所述与IBD相关的病症是家族性腺瘤性息肉病(FAP)。

[0116] 克罗恩病的体征和症状包括但不限于腹泻、腹痛和痉挛、恶心和呕吐、便血、肠道表面或口腔溃疡、食欲下降和体重减轻。胃肠道以外的其他并发症可能包括贫血、皮疹、关节炎、眼睛发炎和疲倦。

[0117] 结肠炎的常见症状包括但不限于轻度至重度腹痛和压痛(取决于疾病的阶段)、持续性出血性腹泻伴大便中存在或不存在脓液、大便失禁、胃肠胀气、疲乏、食欲不振和体重减轻。溃疡性结肠炎的主要症状是腹痛、腹泻混血。也可能发生体重减轻、发热和贫血。

[0118] 本发明的方法可用于预防或治疗IBD或与其相关的一种或多种症状。应该指出，IBD或与其相关的一种或多种症状的治疗导致所述对象的疾病活动指数(DAI)值下降。

[0119] 本发明的方法可以用作组合疗法。因此，本发明的组合物可以在已知减轻和/或缓解IBD的药物之前、同时或之后给药。

[0120] 根据某些实施方式，所述组合物被每天一次、每天两次、每天三次或每天四次给药至少一天、至少一周、至少一个月或直至实现治疗。或者，所述组合物被每隔一天一次、每三天一次、每周一次给药一周、一个月或直至实现治疗。

[0121] 根据某些实施方式，所述组合物中外泌体的治疗有效量在约0.1mg至250mg/Kg需要治疗的对象的体重的范围内。

[0122] 根据某些实施方式，不含从奶分离的外泌体的膳食制剂或肠内制剂不能实现IBD的预防和/或治疗效果。

[0123] 术语“包含”、“包括”、“具有”及其变化形式意味着“包括但不限于”。术语“由……构成”意味着“包括并限于”。术语“基本上由……构成”意味着组合物、方法或结构可能包括另外的成分、步骤和/或部分，但前提是所述另外的成分、步骤和/或部分不实质性改变所宣称的组合物、方法或结构的基本和新颖特征。

[0124] 当在本文中使用时，术语“约”在指称本文中陈述的数值时应该被理解为所述陈述值+/-10％。

[0125] 当在本文中使用时，没有具体数目的指称包括复数指称物，除非上下文明确指明不是如此。例如，术语“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。

[0126] 应该指出，在整个本说明书和权利要求书中公开的每种可能性代表了本发明的独立实施方式。

[0127] 对于本领域普通技术人员来说，在研究了下述不打算是限制性的实施例后，本发明的其他目的、优点和新颖特点将变得显而易见。此外，在上文中描述和在权利要求书部分中要求的本发明的各种不同实施方式和方面中的每一者，在下述实施例中找到了实验支持。

[0128] 提出下面的实施例是为了提供对本发明的更完整的理解。为了说明本发明的原理

而阐述的特定技术、条件、材料、比例和报告的数据是示例性的，并且不应被解释为限制本发明的范围。

[0129] 实施例

[0130] 方法

[0131] 从奶的脱脂级分或脂肪级分分离源自于奶的外泌体

[0132] 外泌体通过不同方案从人奶或牛奶的脱脂级分分离。

[0133] 从人奶：外泌体通过连续超速离心和过滤来分离。通过在4℃下以6500g离心30min将奶样品分级。从每个样品获得两种级分：脂肪和脱脂奶。外泌体从所述脱脂级分分离。将脱脂奶在4℃下以12000g离心1小时以除去残渣。然后将脱脂奶通过0.45μm和0.22μm过滤器以除去残留的碎片。将过滤的上清液在4℃下以135000g离心90min以沉淀外泌体。

[0134] 从牛奶：奶中存在两类蛋白质：酪蛋白和乳清。人奶含有比例分别为40:60的这些蛋白质；而牛奶中含有比例为80:20的酪蛋白和乳清蛋白。由于牛奶含有比人奶明显更多的酪蛋白，因此从牛奶分离外泌体以与上述人奶相似的方案进行并做出了一项修改。在过滤后，将脱脂奶在4℃下以70000g离心30min以除去酪蛋白。将上清液在4℃下以135000g离心90min以沉淀外泌体。

[0135] 将所述外泌体沉淀物在PBS中在4℃放置过夜以溶解外泌体。将MDE通过0.22μm过滤器过滤。通过BCA蛋白质测定法(Thermo)测量所述外泌体制备物的蛋白质含量。

[0136] 在其他实验中，如下所述进行外泌体从脱脂奶级分的分离：

[0137] 方案A-这个方案使用乙酸和柠檬酸来控制pH。在所述方案的步骤3中，以0.1％至1％的浓度添加乙酸和柠檬酸钠，并在室温和4℃下温育0至5分钟：

[0138] 1.将天然奶(2ml-150ml)在4℃下以5000g离心30分钟。除去分离的脂肪级分，并将液体相脱脂奶用于步骤2。

[0139] 2.将液体相脱脂奶在4℃下以12000g离心60分钟。舍弃含有碎片的沉淀物，并将上清液(sup)用于步骤3。

[0140] 3.将上清液与0.1％至1％乙酸或柠檬酸钠在4℃和室温(RT)下温育(0-5分钟)。

[0141] 4.在温育步骤后，将上清液在4℃下以100000g离心10分钟。舍弃沉淀物(其含有酪蛋白)，并将上清液用于下一步骤。

[0142] 5.将上清液使用0.22μm过滤器过滤，并将过滤的液体在4℃下以135000g离心90分钟。

[0143] 6.得到的沉淀物包含分离的外泌体。

[0144] 方案B-这个方案在分离外泌体期间使用过滤器：

[0145] 1.将天然奶在4℃下以5000g离心30分钟。除去分离的脂肪级分并将液体相脱脂奶用于步骤2。

[0146] 2.将液体相脱脂奶在4℃下以12000g离心60分钟。舍弃含有碎片的沉淀物，并将上清液(sup)用于步骤3。

[0147] 3.将上清液用0.45μm过滤器过滤，并将过滤的液体再次用0.22μm过滤器过滤。将得到的过滤的液体在4℃下以100000g离心60分钟。舍弃沉淀物(其含有酪蛋白)，并将上清液用于下一步骤。

[0148] 4.将上清液在4℃下以135000g离心90分钟。

[0149] 5.得到的沉淀物包含分离的外泌体。

[0150] 方案C-从奶的脂肪级分分离源自于奶的外泌体：

[0151] 1.将天然奶在4℃下以5000g离心30分钟。将分离的脂肪级分用于进一步加工，并除去液体相脱脂奶。

[0152] 2.对奶的脂肪积分进行从-80℃或-20℃至37℃和60℃的冷却-加热循环(2-4个循环)。作为所述冷却-加热循环的结果，脂肪溶解在PBS中。

[0153] 3.然后将所述溶液用0.22μm过滤器过滤，并将过滤的溶液在4℃下以100000g离心60分钟。

[0154] 4.舍弃沉淀物，并将上清液在4℃下以135000g离心90分钟，以沉淀外泌体。

[0155] 5.通过BCA蛋白质测定法(Thermo)测量所述外泌体制备物的蛋白质含量。

[0156] 电子显微术

[0157] 使用负染色，通过电子显微术对外泌体进行分析。将分离的外泌体用2％磷钨酸(PTA)水溶液染色。简单来说，将5μl在PBS中稀释的外泌体放置在Formvar/碳涂层铜200目格网(EMA)上，并与5μl PTA混合10-20秒。除去过量的染色剂并将格网干燥。样品使用Jem-1400 Plus透射电子显微镜(Jeol,Peabody,MA,USA)检查。

[0158] 纳米粒子分析

[0159] 将使用NS300纳米粒子分析仪(NanoSight,Malvern,Worchestershire,UK)进行的纳米粒子追踪分析(NTA)用于测量MDE的粒径分布。将MDE在PBS中的悬液装入Nanosight装置的样品室中，并以24.98fps的帧速率记录60秒的视频。将488nm的蓝色激光源应用于稀释的MDE悬液。粒子运动通过NTA软件(3.2版,NanoSight)进行分析。所有测量均在22℃下以光散射模式进行。

[0160] 动态光散射(DLS)

[0161] DLS和ζ电位的测定使用Zetasizer纳米系列仪器(Malvern Nano-Zetasizer,λ＝532nm激光波长)来进行。外泌体尺寸数据是指散射强度分布(z平均值)。

[0162] DiR标记的MDE

[0163] 将MDE与1μM荧光亲脂示踪剂DiR(1,1-双十八烷基-3,3,3,3-四甲基吲哚三碳菁碘化物;Invitrogen,Life Technologies)在37℃温育15min。在温育结束时添加PBS，以100000g离心60min，所述标记的外泌体沉积，并舍弃未结合的标记物。

[0164] 小鼠中DSS诱导的结肠炎

[0165] 由于简单性、可重复性和均一性，DSS给药是用于研究结肠炎的最广泛使用的动物模型。DSS模型表现出许多与在人类结肠炎中看到的相似的症状，例如腹泻、便血、体重减轻、粘膜溃疡和结肠缩短。使用了两种方案：预防方案和治疗方案。

[0166] 预防方案：在8周龄Balb/c小鼠中通过从第1天起在饮用水中添加5％DSS来诱导结肠炎。对照小鼠接受正常饮用水。将用DSS处理的小鼠或对照小鼠用通过管饲给药的200μl PBS中的剂量为每只小鼠0.5mg/ml的源自于人奶的外泌体(EXO)治疗7天，或仅给药PBS。监测小鼠的体重和疾病活动指数(DAI)。每日使用DAI评分来评估结肠炎的临床进展。所述DAI是体重减轻、粪便稠度和出血的综合评分。评分定义如下：体重减轻：0(无减轻)，1(1-5％)，2(5-10％)，3(10-20％)，4(>20％)；粪便稠度：0(正常)，2(稀便)，4(腹泻)；出血：0(无血)，1(可见的颗粒出血)，2(大量出血，肛门周围有血)；脱垂：0(无)，1(脱垂信号)，2(脱垂)，3(延

长的脱垂)。组织学评分在下述参数的基础上确定:横向扩展炎症(0-4),深度炎症等级(0-4),横向扩展坏死/溃疡(0-4)和深度坏死/溃疡(0-4)。

[0167] 治疗方案:在8周龄Balb/c小鼠中通过在饮用水中添加5%DSS共7天来诱导结肠炎。当出现过度痛苦、垂死或体重减轻≥20%时,将小鼠安乐死。从DSS处理开始起每天对小鼠进行评估。在DSS处理一周后,将水换成正常水。小鼠口服接受在200μl PBS中的0.5mg/小鼠的来自于人奶或牛奶的MDE的管饲,共6天。在实验结束时,将小鼠处死,取出结肠,分析其外观并测量其长度。在去除盲肠和脂肪组织后,将结肠切成三个部分:近端、中端和远端部分。将远端部分(2cm)在4%福尔马林溶液中固定,包埋在石蜡中,用H&E染色,并在光学显微镜下检查。确定组织学评分。还评估了细胞分化、出血、纤维蛋白沉积和病变分布。将结肠的近端和中端部分在液氮中冷冻并在-80℃下保存备用,用于蛋白质、基因和miRNA表达分析。

[0168] 对于蛋白质分析来说,向结肠组织的区段添加不锈钢珠(平均直径5mm)和200μl含有脯氨酸肽酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液。将组织在TissueLyser5上匀浆。将样品简短离心以沉淀组织碎片。通过BCA蛋白质测定法(Thermo)测量蛋白质含量。在RNA提取后进行结肠组织中的基因和miRNA表达分析。

[0169] 总RNA的提取

[0170] 从外泌体

[0171] 向分离的MDE的沉淀物添加Trizol试剂(INVITROGEN,Carlsbad,USA)。添加氯仿,将混合物剧烈振摇并在室温下温育15min,然后在4℃下以12000g离心15min。将水性相转移到新的管。然后添加异丙醇(每1ml Trizol试剂0.5ml)以沉淀RNA,并通过颠倒混合所述溶液。在室温下温育10min后,将样品在4℃下以12000g离心10min。舍弃上清液,并将沉淀物用75%乙醇(每ml Trizol试剂1ml)清洗并在4℃下以12000g离心5min。将沉淀物空气干燥,并重悬浮在20μl无RNA酶水中。

[0172] 从结肠组织

[0173] 向结肠组织的区段添加不锈钢珠(平均直径5mm)和300μl Trizol试剂。将组织在TissueLyser5上匀浆。将样品简短离心以沉淀组织碎片。使用Zymo Direct-zol RNA小量制备试剂盒(Zymo Research,Irvine,CA),按照制造商的说明书对上清液进行RNA分离。

[0174] 通过使用NanoDrop分光光度计在不同波长处测量RNA样品的吸光度来评估RNA的数量和质量。

[0175] 通过qRT-PCR检测MicroRNA

[0176] 总RNA样品:将500ng总RNA(从结肠组织提取)和100ng总RNA(从MDE提取)用于制备cDNA,使用了qScript microRNA cDNA合成试剂盒(QuantaBio,Beverly,MA,USA)。在cDNA合成后,将等同于2.4ng原始RNA样品的量与Perfecta SYBR Green SuperMix(QuantaBio)和通用PCR引物(QuantaBio)混合在15μl qPCR反应体系中。在每个96孔qPCR板的相邻孔中运行3个或2个cDNA样品。所述qPCR板使用StepOnePlus实时PCR系统(Applied Biosystems)运行,使用了两步循环方案(95℃5min,然后是40个循环的95℃5秒和60℃30秒),以熔解曲线结束。在反应完成后,使用固定阈值设置确定Ct值。使用2^(-ΔΔCT)方法确定miRNA的相对量。

[0177] 通过qRT-PCR定量mRNA

[0178] 外泌体中miRNA-148a-3p(mir-148a)的表达通过qRT-PCR来分析。qRT-PCR结果通

过Delta-Delta CT方法2^(-ΔΔCt)来计算,并将所述值针对RNU6B进行归一化(使用的引物:miR-148a-3p:CGCTCAGTGCACTACAGAACTTTT(SEQ ID NO.1),RNU6(NR_002752.1):GCAAATTCGTGA AGCGTTCC(SEQ ID NO:2)。

[0179] 用于mRNA定量的cDNA使用大容量RNA-cDNA试剂盒(Applied Biosystems,Foster City,CA,USA),按照制造商的说明书来产生。

[0180] 将从结肠组织分离的总RNA(1μg)用于产生cDNA。对所述cDNA进行qPCR。使用qRT-PCR测量IL-6和TNF-α的mRNA水平,使用了主混合物(快速qPCR SyGreen Blue混合物,PCR Biosyntesis,Pensylvania,USA)和StepOne Plus实时PCR系统机器(Applied Biosystems)。引物是:

[0181] TNF-α:For 5'-GTTCTGTCCCTTTCACTCAC(SEQ ID NO:3),Rev 5'-TGCCTCTTCTGCCAGTTC(SEQ ID NO:4);

[0182] IL-6:For 5'-GAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAGGA(SEQ ID NO:5),Rev 5'-CGCACTAGGTTTGCCGAGTAGATCT(SEQ ID NO:6);

[0183] GAPDH:For 5'-GCCTTCCGTGTTCCTACC(SEQ ID NO:7),Rev 5'-CTTCACCACCTTCTTGATGTC(SEQ ID NO:8)。

[0184] PCR反应步骤是1个循环的95℃5min,40个循环的95℃5秒和60℃30秒。使用2^(-ΔΔCT)方法确定mRNA的相对量。

[0185] 免疫印迹

[0186] 将蛋白质在SDS-PAGE上运行,然后转移到PVDF膜上。将所述膜用抗体探测并使用增强化学发光检测反应来检测。第一抗体如下:抗CD9抗体(1:1000;SBI System Biosciences,Palo Alto,CA,USA),抗CD81抗体(1:1000;Cosmo Bio,Tokyo,Japan),抗HSP70抗体(1:1000;SBI System Biosciences,Palo Alto,CA,USA),兔抗TGF-β1抗体(Abcam,Cambridge,MA,USA),兔抗β-肌动蛋白抗体(Abcam,Cambridge,MA,USA)。第二抗体是辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗小鼠或抗兔抗体(1:3000;Cell Signaling Technology)。使用NIH-Image软件(http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html)进行定量。

[0187] 实施例1

[0188] 牛奶或人奶的脱脂或脂肪级分中的外泌体的分离和表征

[0189] 在奶中存在两类蛋白质:酪蛋白和乳清。人奶含有比例分别为40:60的酪蛋白和乳清蛋白;而牛奶含有比例分别为80:20的这些蛋白质。由于牛奶中总蛋白的量超过人奶的两倍,因此牛奶含有比人奶明显更多的酪蛋白。从牛奶或人奶的脱脂级分分离了源自于奶的外泌体。由于牛奶或人奶中酪蛋白的量不同,因此使用上文中描述的方案从牛奶或人奶进行了外泌体的分离。

[0190] 正如在图1A-K中看到的,从牛奶或人奶分离的囊泡相似,并被鉴定为外泌体。透射电子显微术分析显示,从牛奶或人奶分离的纳米囊泡具有典型的圆形或杯状外观(分别为图1B和1C)。使用不同方法确认了从奶分离的囊泡的尺寸。例如,使用纳米粒子追踪分析(NTA)这种表征外泌体的常规方法,在追踪布朗运动的基础上测量了外泌体尺寸。对于从牛奶分离的囊泡来说,平均尺寸为179nm,对于从人奶分离的囊泡来说,平均尺寸为166nm(分别为图1D和1E)。还使用动态光散射(DLS)通过Z-平均值来测量外泌体的尺寸。对于从牛奶

或人奶分离的囊泡来说，通过DLS确定的外泌体尺寸分别为131nm和96.91nm(分别为图1F和1G)。还通过DLS评估了多分散性指数(PDI)，以表征外泌体的尺寸分布。对于从牛奶分离的囊泡来说PDI为0.281，对于从人奶分离的囊泡来说PDI为0.261(分别为图1F和1G)，显示出相对均匀的外泌体尺寸分布，这也可以通过NTA分析中的尖锐单峰来证实。根据这些结果，从牛奶或人奶分离的囊泡的尺寸为外泌体的特征尺寸。

[0191] 通过Western印迹分析评估了外泌体纯度。正如图1H和1I中所示，从牛奶或人奶分离的外泌体表达外泌体相关蛋白，即CD9和CD81，而对照蛋白HSP70仅在总细胞裂解液中而没有在外泌体中检测到，表明分离的外泌体被高度纯化并且没有被丰富的细胞内组分和碎片污染。

[0192] 外泌体的一种主要运载物是miRNA。事实上，通过qRT-PCR从牛奶或人奶分离到几种miRNA例如miR-148和miR320(分别为图1J和1K)。

[0193] 合在一起，这些结果证实从牛奶或人奶分离的外泌体具有高纯度。

[0194] 接下来进行外泌体从奶的脂肪级分的分离。

[0195] 图2A示出了在按照方案C从牛奶的脂肪级分分离的外泌体中，通过Western印迹分析确定的外泌体特征性蛋白即CD81和CD9的表达。在这些级分中没有检测到HSP70。图2B-C示出了从牛奶的脂肪级分分离的外泌体的透射电子显微术分析。

[0196] 通过qRT-PCR分析了在按照方案A、B或C从牛奶分离的外泌体中miRNA-148a-3p(miRNA-148)的表达。qRT-PCR结果通过Delta-Delta CT方法2^(-ΔΔCt)来计算，并将所述值针对RNU6B进行归一化。图2D中示出的结果表明无论是从牛奶的脱脂还是脂肪级分分离的外泌体均含有miRNA分子，例如miR-148。

[0197] 下一个目标是确定所述源自于奶的外泌体是否含有抗炎性多肽。作为候选物，评估了TGF-β1这种已知在结肠中具有抗炎活性的蛋白质。如图3中所示，发现与其他奶级分例如以70,000g超速离心后的沉淀物或以135,000g超速离心后的上清液相比，TGF-β1在源自于奶的外泌体(MDE)中高表达(图3)。

[0198] 合在一起，这些结果证实外泌体可以从天然奶，从脱脂奶级分或脂肪奶级分两者分离，并且所述分离的外泌体携带或包封天然miRNA分子，包括miR-148和miRNA-320以及抗炎性蛋白例如TGF-β1。

[0199] 实施例2

[0200] 外泌体在肠道中积累

[0201] 为了确定源自于奶的外泌体是否可以被肠摄取，进行了下述实验。

[0202] 将按照上述方案从牛奶或人奶分离的源自于奶的外泌体(MDE)以每只小鼠0.5mg/ml的剂量在200μl PBS中管饲给药到Balb/c小鼠(n＝4/组)共7天。将MDE用红外荧光膜染料DiIR(Molecular Probes)按照制造商的说明书标记，以在体内追踪外泌体的定位模式。从第6天到第7天，将所述DiR染料标记的外泌体通过管饲给药到Balb/c小鼠。在管饲给药后2小时，观察小鼠并使用Typhoon FLA 9500扫描仪使用740nm激发和790nm发射滤光片获取外泌体分布的荧光图像。成像揭示出在源自于牛奶或人奶的外泌体的管饲给药后荧光信号在肠道中的积累(分别为图4A和4B)。在外泌体给药期间对小鼠称重，并且图4C中呈现的结果显示外泌体对被治疗小鼠的体重没有影响。

[0203] 因此，这些结果表明口服给药的源自于奶的外泌体在肠道中积累。

[0204] 实施例3

[0205] 口服给药的源自于奶的外泌体减弱结肠炎的发展

[0206] 为了确定源自于奶的外泌体对结肠炎的预防效果，使用了小鼠中的葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎的动物模型。

[0207] 通过从第1天起在饮用水中添加5％DSS在Balb/c小鼠中诱导结肠炎。对照小鼠接受正常饮用水。将用DSS处理的小鼠或对照小鼠用通过管饲给药的200μl PBS中的剂量为每只小鼠0.5mg/ml的源自于人奶的外泌体(EXO)治疗7天，或仅给药PBS。

[0208] 将来自于治疗或对照小鼠的代表性结肠区段用H&E染色，所述染色的区段示出在图5A-D。H&E染色区段的组织学评分示出在图5E中。图5F示出了在各个不同测试组(n＝5/组)中的疾病活动指数(DAI)(其是粪便稠度、直肠刺激和便血的综合评分)。

[0209] 这项实验的结果显示，源自于奶的外泌体在DSS诱导的结肠炎小鼠的结肠中防止细胞损伤(图5D和5E)并抑制这些小鼠中结肠炎症状的发展。因此显示MDE在预防或减弱DSS诱导的结肠炎的发展中发挥有益效果。

[0210] 实施例4

[0211] 从牛奶或人奶分离的源自于奶的外泌体的口服给药减弱由DSS诱导的结肠炎的严重程度

[0212] 接下来，评估了MDE对结肠炎小鼠的影响。

[0213] 使用在饮用水中提供一周的5％DSS在Balb/c小鼠中诱导结肠炎。然后将小鼠用外泌体(EXO+)治疗5-6天，或者不用外泌体治疗(EXO-)作为对照。在DSS处理的7天和外泌体给药的2天期间评估小鼠的体重。如图6A和6C中所示，在DSS处理的7天和没有外泌体给药的2天期间小鼠的体重显著降低。然而，给药从牛奶或人奶分离的MDE两天提高小鼠的体重(分别为图6B和6D)，使得与初始小鼠的体重相比没有观察到体重的显著差异(图6B和6D)。这些结果表明从牛奶或人奶分离的外泌体阻止与结肠炎相关的体重减轻并加速体重恢复。

[0214] 所述从牛奶或人奶分离的外泌体减轻DSS诱导的结肠炎的其他体征和症状。因此，外泌体治疗显著减少结肠的缩短：在源自于牛奶的外泌体治疗后，结肠长度的中位数为7.5cm，与此相比在对照组中为6cm(图6E)。在源自于人奶的外泌体治疗后，结肠长度的中位数为7.7cm，与此相比在对照组中为7cm(图6F)。此外，与MDE治疗的结肠炎小鼠相比，在未治疗的结肠炎小鼠中结肠区段的组织学分析揭示出广泛的结肠损伤和免疫细胞浸润(在固有层和黏膜中)。这种效果通过组织学评分得以反映：从牛奶分离的外泌体将组织学评分从5.83降低到0.6(图6G)，并且从人奶分离的外泌体将组织学评分从5.9降低到4.13(图6H)。

[0215] 因此，这些结果表明MDE减轻DSS诱导的结肠炎的表现并减弱其严重程度。

[0216] 实施例5

[0217] MDE提高结肠炎结肠中TGF-β1的水平

[0218] 下一个目标是确定MDE治疗对结肠炎结肠中TGF-β1蛋白的水平的影响。如图7A-B中所示，与未治疗的结肠炎小鼠相比，在MDE治疗后，用MDE治疗的结肠炎小鼠的结肠组织中TGF-β1蛋白的水平显著提高。MDE治疗的与未治疗的结肠炎小鼠相比，用作对照的β-肌动蛋白的蛋白水平一致。

[0219] 这些结果证实了在结肠炎小鼠中MDE治疗提高结肠中的TGF-β1表达。

[0220] 实施例6

[0221] MDE对结肠炎结肠中miRNA表达的影响

[0222] 接下来调查MDE治疗对小鼠的结肠炎结肠中miRNA表达的影响。在本研究中分析了四种miRNA:miRNA-320,miRNA-375,let-7a和miRNA148。发现这些miRNA以及另外的8种miRNA在MDE中高表达(参见WO2017/090049)。如图8A-D中所示,与未治疗的小鼠相比,在MDE治疗的小鼠中let7a、miRNA-320和miRNA-375的表达明显更高(分别为图8A、8B和8C)。与未治疗的小鼠相比,在MDE治疗的小鼠中miRNA-148的表达也更高(图8D)。

[0223] 这些结果显示,向结肠炎小鼠给药MDE导致被治疗小鼠的结肠炎结肠中miRNA的高表达,暗示MDE影响结肠炎结肠中的miRNA表达。

[0224] 实施例7

[0225] MDE影响炎症相关的基因

[0226] 接下来,评估了MDE对结肠炎结肠中促炎性细胞因子的表达的影响。

[0227] 如图9A-B中所示,与未治疗的结肠炎小鼠相比,在MDE治疗的结肠炎小鼠中观察到促炎性细胞因子TNF-α和IL-6的更低的基因表达。在MDE治疗后,TNF-α基因的表达被显著下调(图9A)。此外,与未治疗的小鼠相比,在MDE治疗的小鼠中IL-6的基因表达被下调(图9B)。

[0228] 合在一起,这些结果显示,MDE治疗不仅提高小鼠的结肠炎结肠中抗炎性细胞因子TGF-β1的表达,而且降低该组织中促炎性细胞因子IL-6和TNF-α的表达。因此,源自于奶的外泌体是用于治疗和/或预防结肠炎的有用药物。

[0229] 上面的特定实施方式的描述如此充分地揭示了本发明的总体本质,以致于其他人可以通过使用当前知识容易地修改和/或改编这些特定实施方式以适应于各种不同应用,而无需过多实验并且不背离一般性概念,并且因此这些改编和修改应该并且打算被涵盖在所公开的实施方式的含义和等同性范围之内。尽管本发明已结合特定实施方式进行了描述,但显然对于本领域技术人员来说,许多替代、修改和变化将是显而易见的。因此,打算包括落于权利要求书的精神和广阔范围内所有此类替代、修改和变化。

序列表

<110> 哈达斯特医疗研究服务和开发有限公司

<120> 用于治疗炎性肠病的源自于奶的细胞外囊泡

<130> HDST/062-PCT

<150> USP 62/847,339

<151> 2019-05-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 1

cgctcagtgc actacagaac tttt 24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2

gcaaattcgt gaagcgttcc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 3

gttctgtccc tttcactcac 20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 4
tgcctcttct gccagttc 18
<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic oligonucleotide
<400> 5
gagtcacaga aggagtggct aagga 25
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic oligonucleotide
<400> 6
cgcactaggt ttgccgagta gatct 25
<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic oligonucleotide
<400> 7
gccttccgtg ttcctacc 18
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic oligonucleotide
<400> 8
cttcaccacc ttcttgatgt c 21

外泌体来源	数目
奶牛（方案B）	$4.78 X10^{8}$
人（方案B）	$2.33 X10^{8}$

图1A

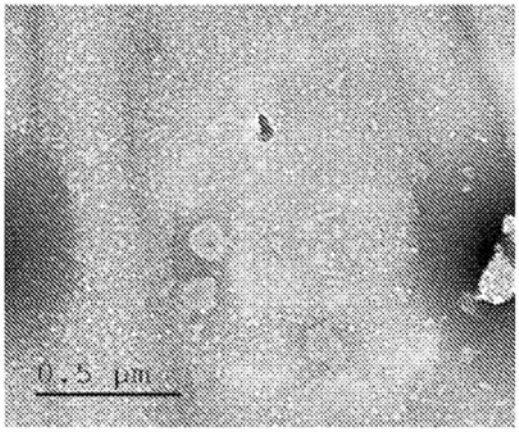

图1B

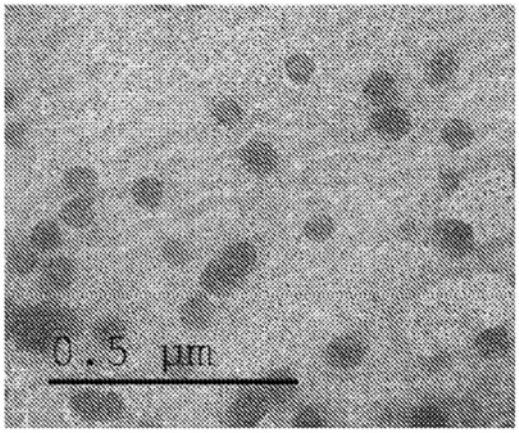

图1C

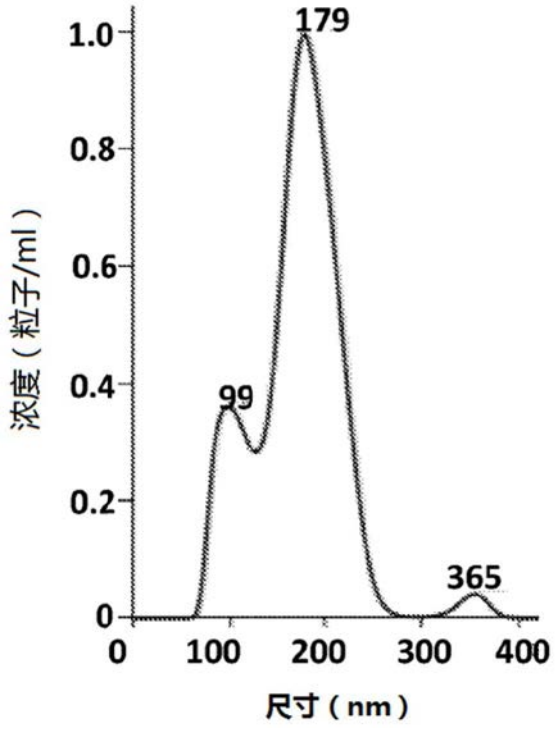
179
99
365
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
浓度（粒子/ml）
0
100
200
300
400
尺寸（nm）

图1D

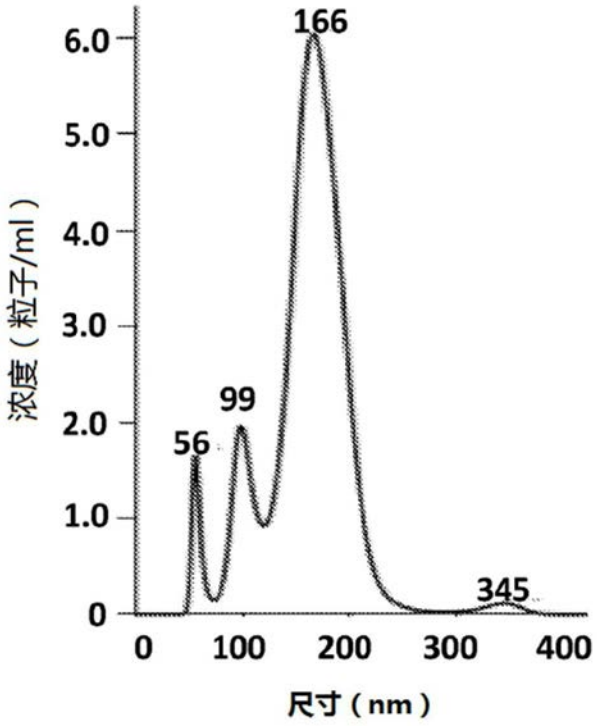
166
99
56
345
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
浓度（粒子/ml）
0
100
200
300
400
尺寸（nm）

图1E

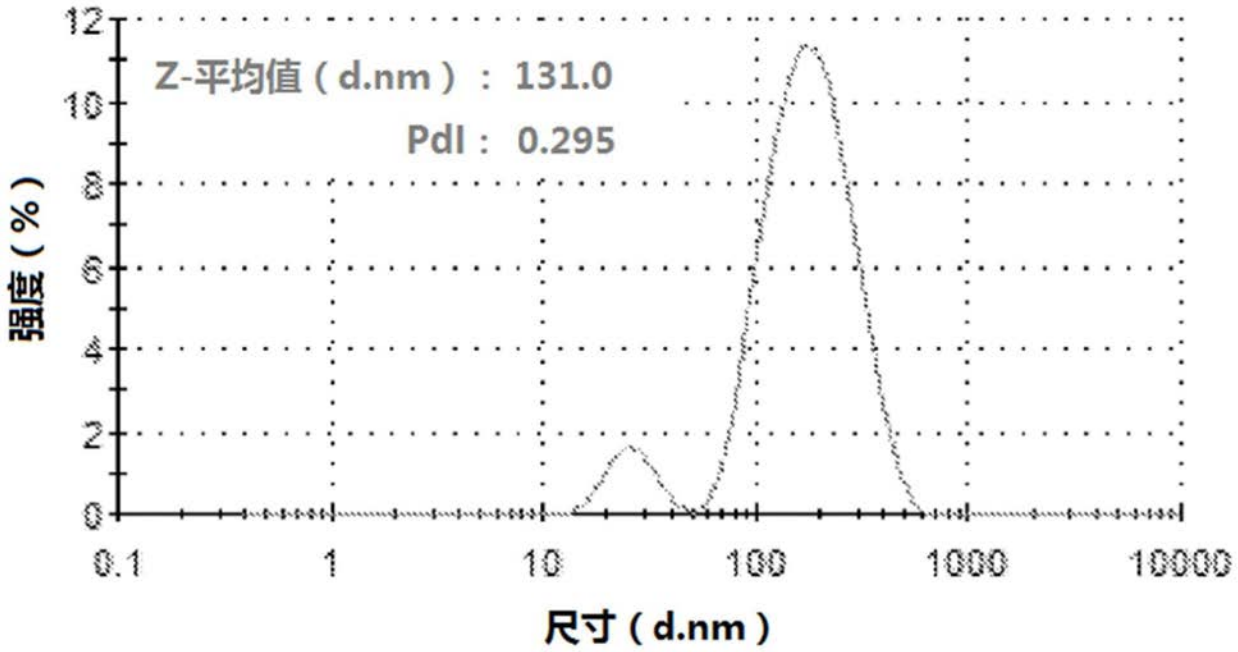
Z-平均值（d.nm）：131.0
PdI：0.295
强度（%）
尺寸（d.nm）
0
2
4
6
8
10
12
0.1
1
10
100
1000
10000

图1F

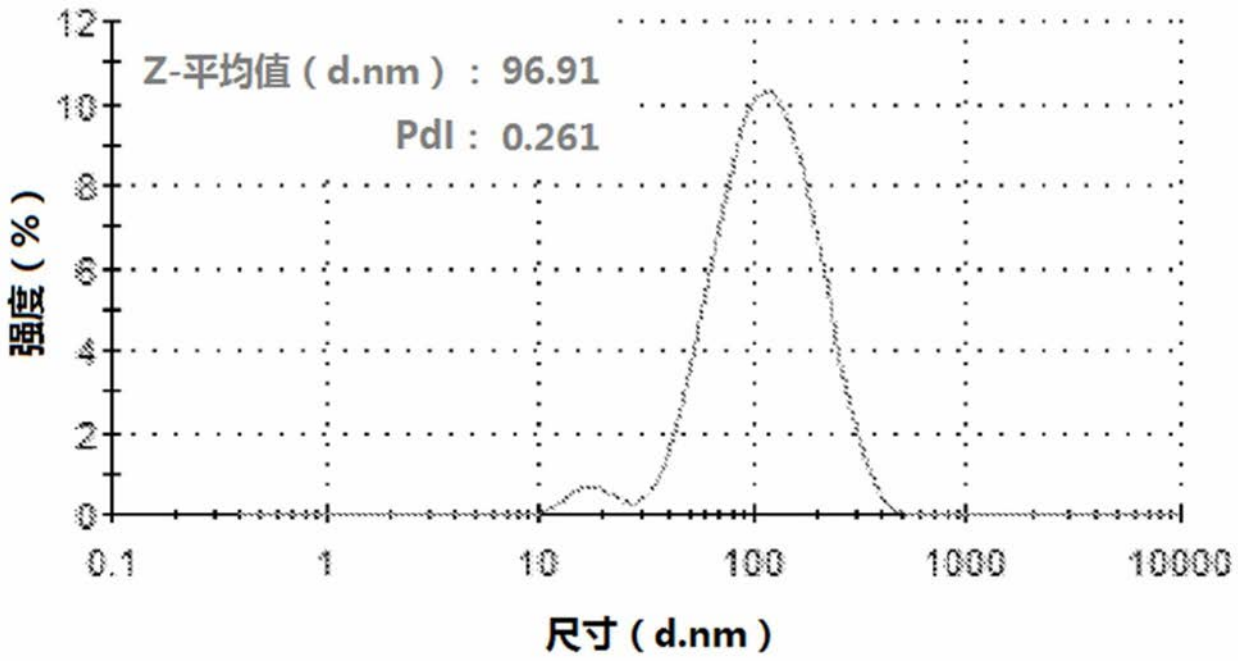
Z-平均值（d.nm）：96.91
PdI：0.261
强度（%）
尺寸（d.nm）
0
2
4
6
8
10
12
0.1
1
10
100
1000
10000

图1G



图1H

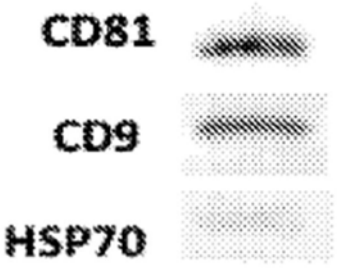

图1I

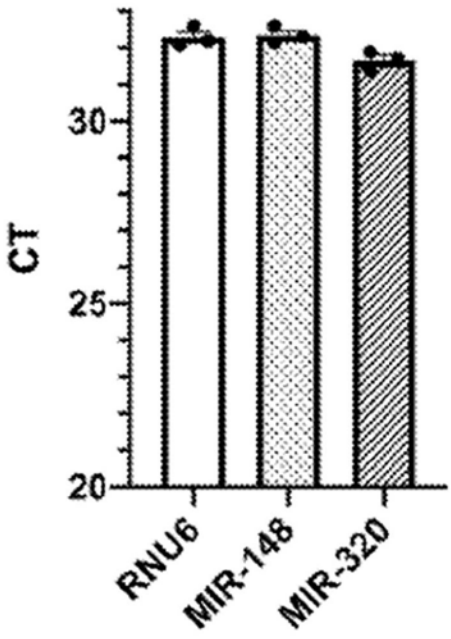

图1J

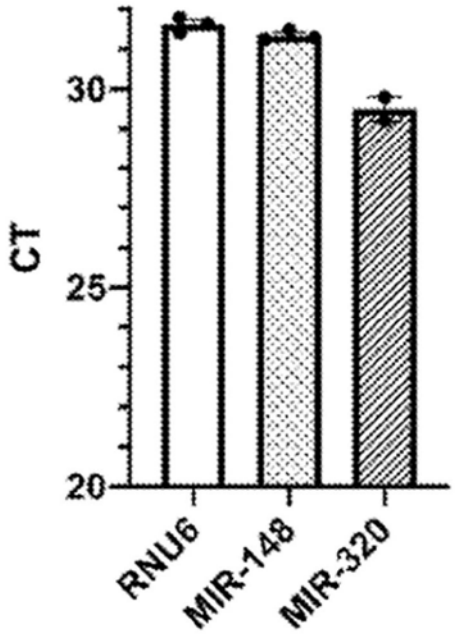

图1K

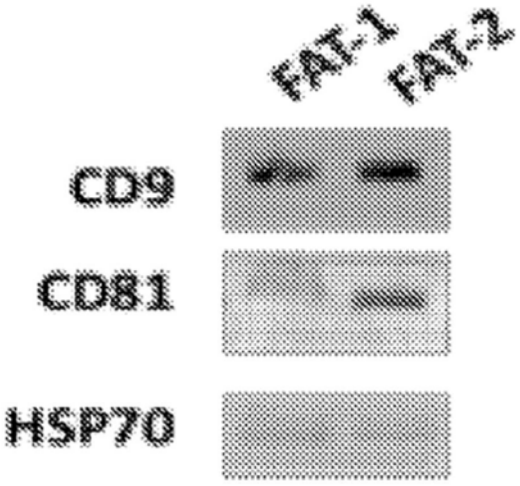

图2A

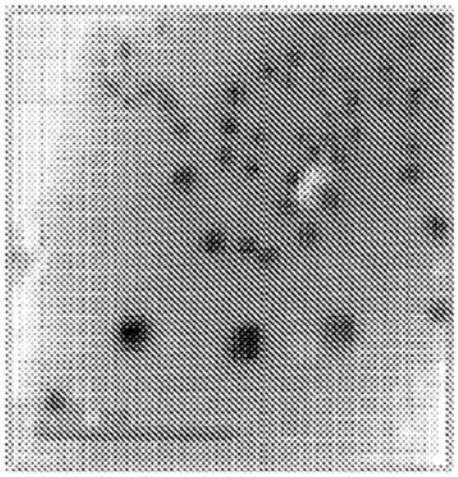

图2B

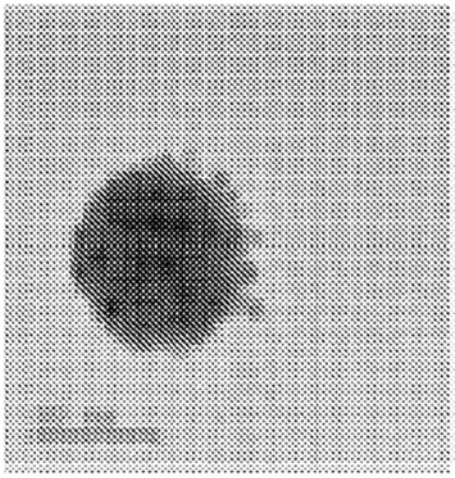

图2C

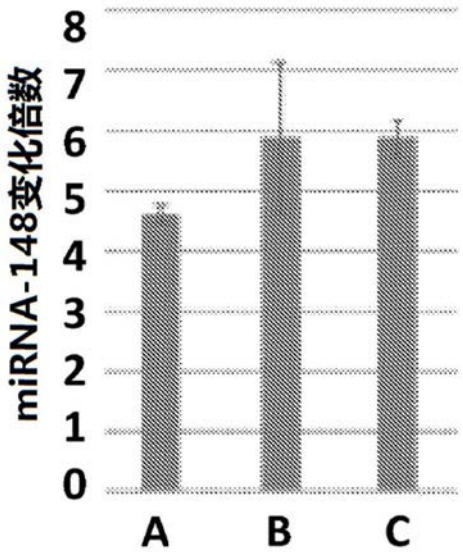
miRNA-148变化倍数
8
7
6
5
4
3
2
1
0
A
B
C

图2D

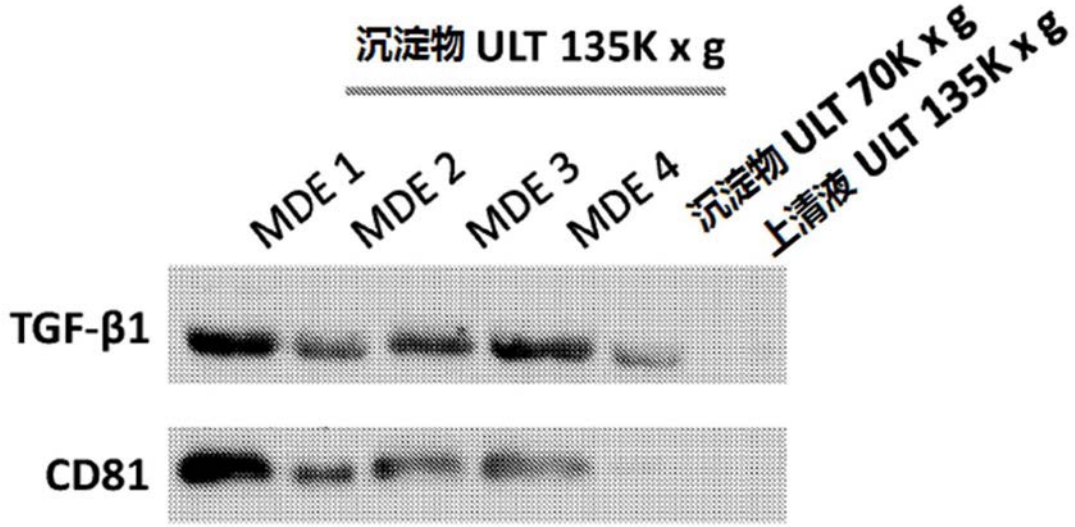
沉淀物 ULT 135K x g
MDE 1
MDE 2
MDE 3
MDE 4
沉淀物 ULT 70K x g
上清液 ULT 135K x g
TGF-β1
CD81

图3

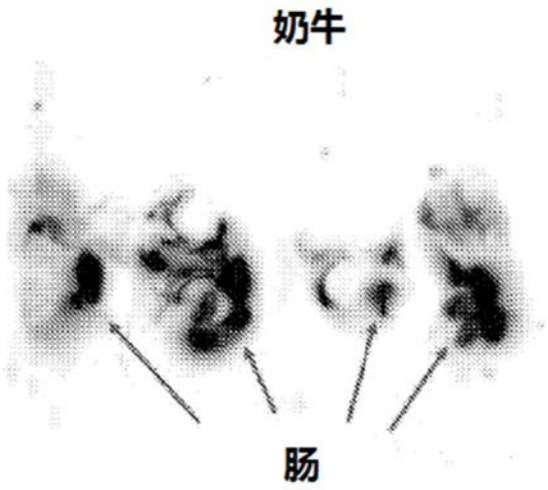

图4A

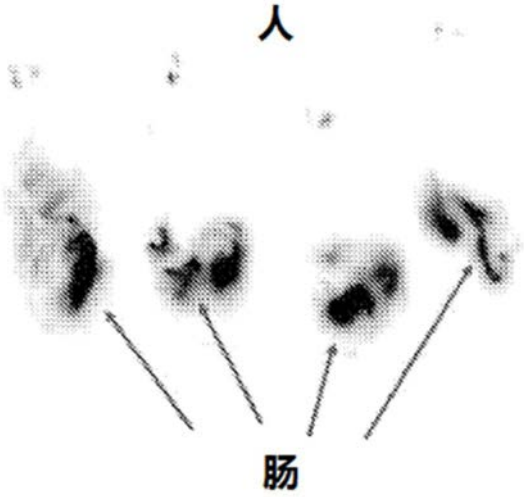

图4B

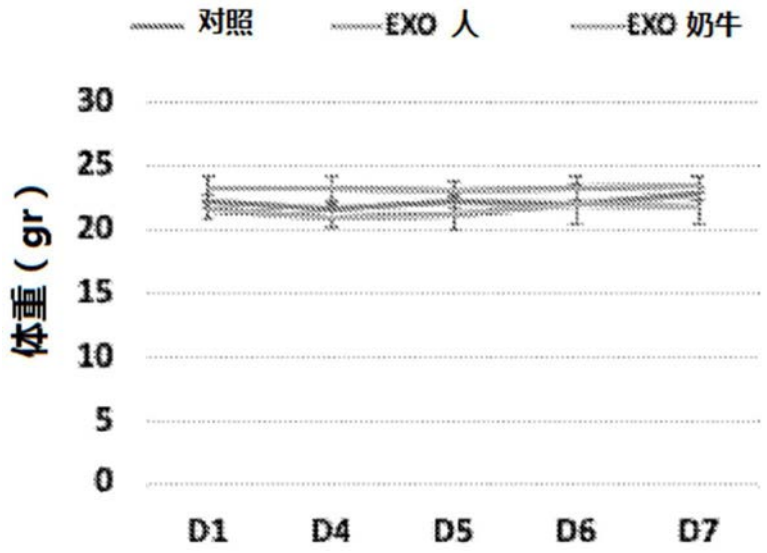

图4C

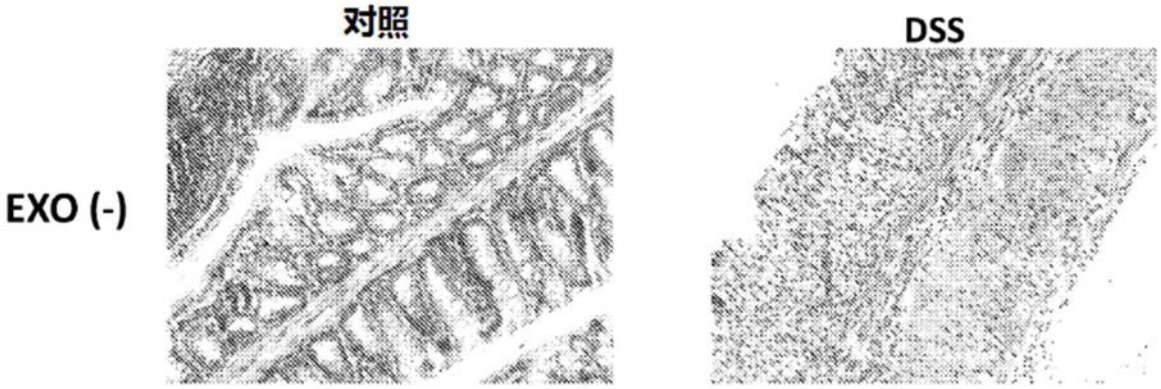

图 5A 图 5B

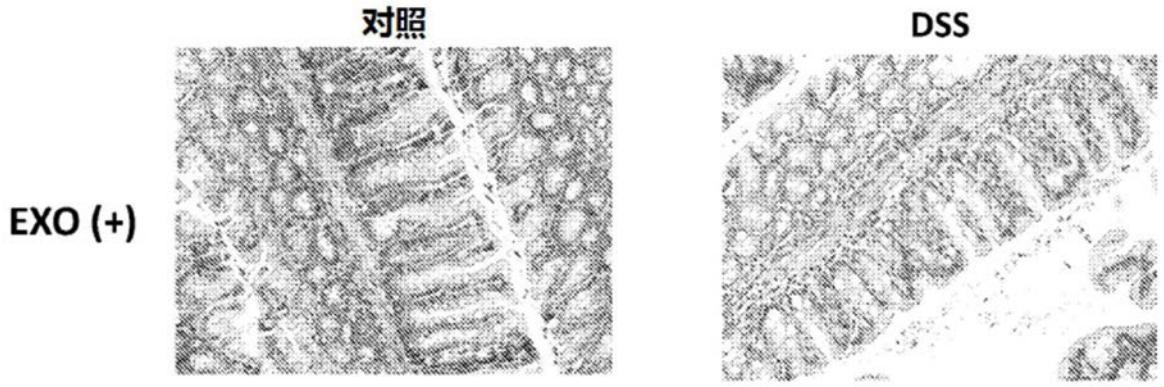

图 5C 图 5D

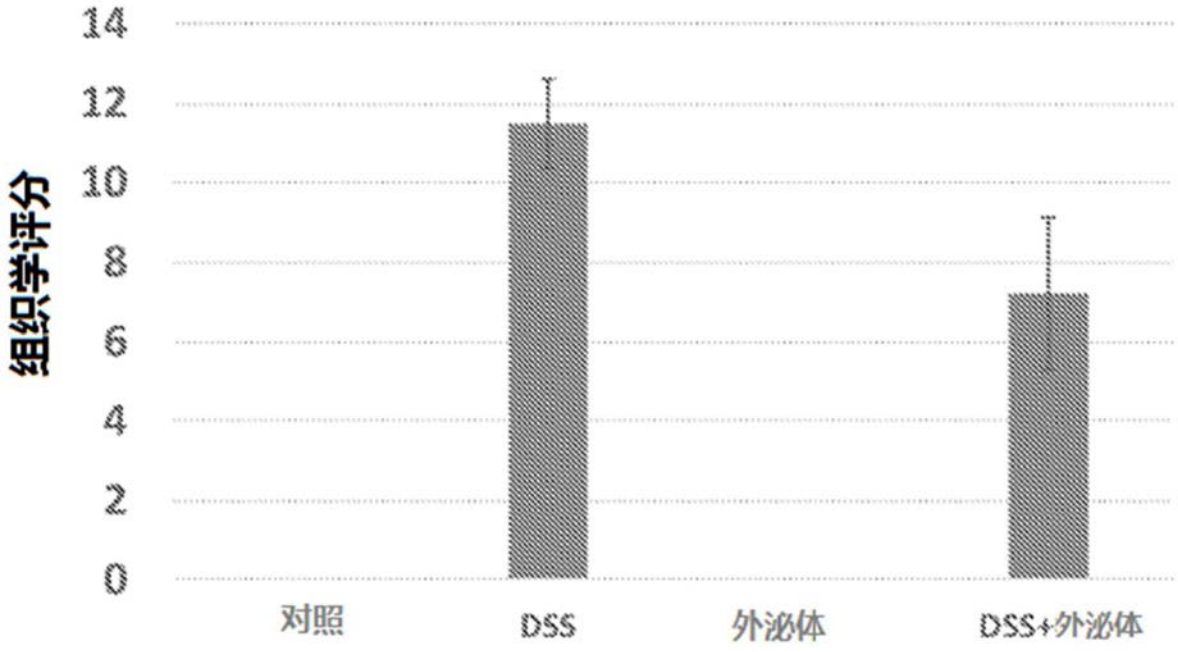

图5E

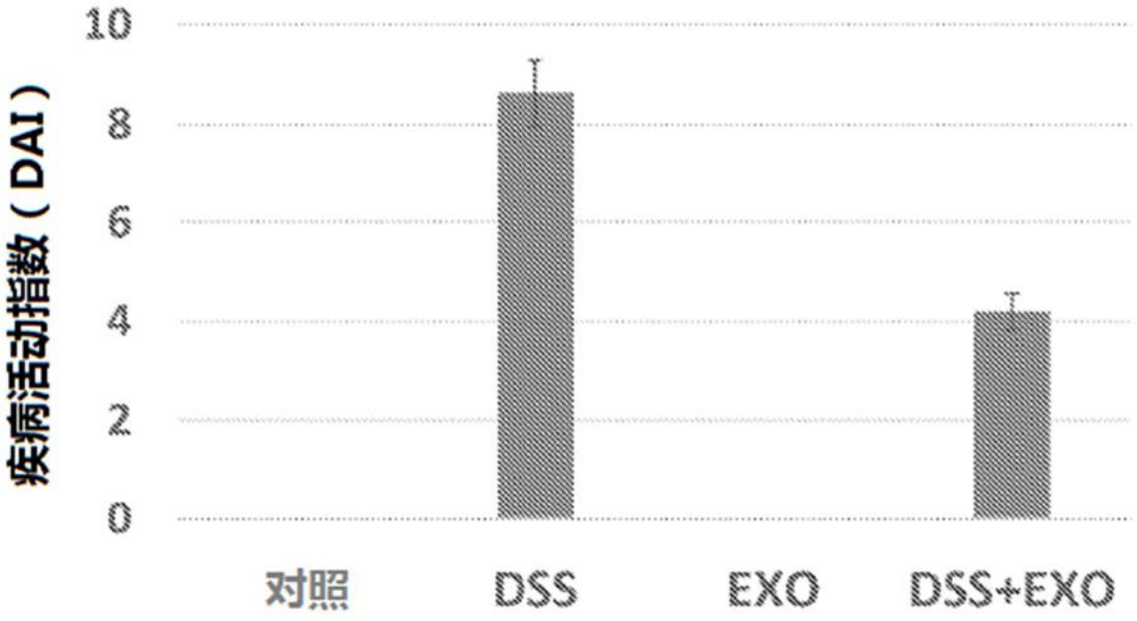
疾病活动指数（DAI）
10
8
6
4
2
0
对照
DSS
EXO
DSS+EXO

图5F

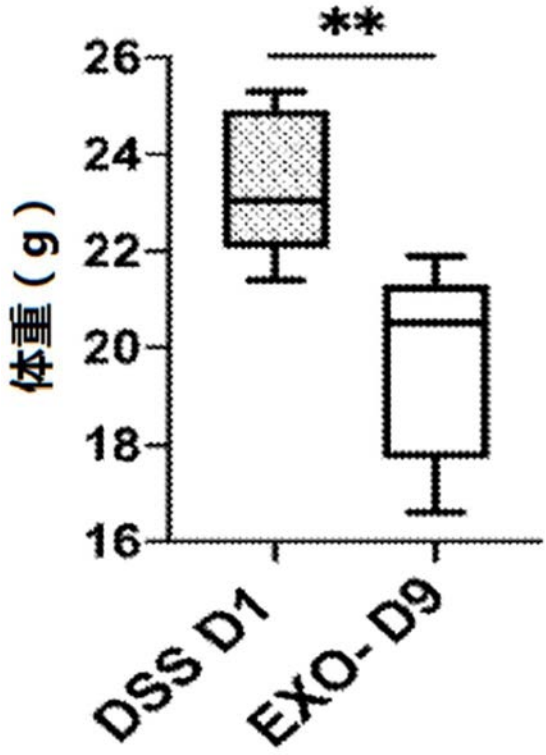
**
体重（g）
26
24
22
20
18
16
DSS D1
EXO- D9

图6A

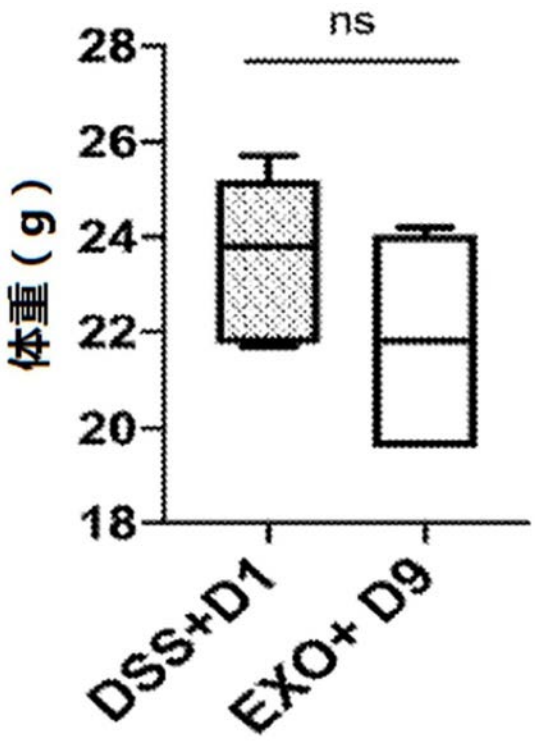
ns
28
26
24
22
20
18
体重（g）
DSS+D1
EXO+ D9

图6B

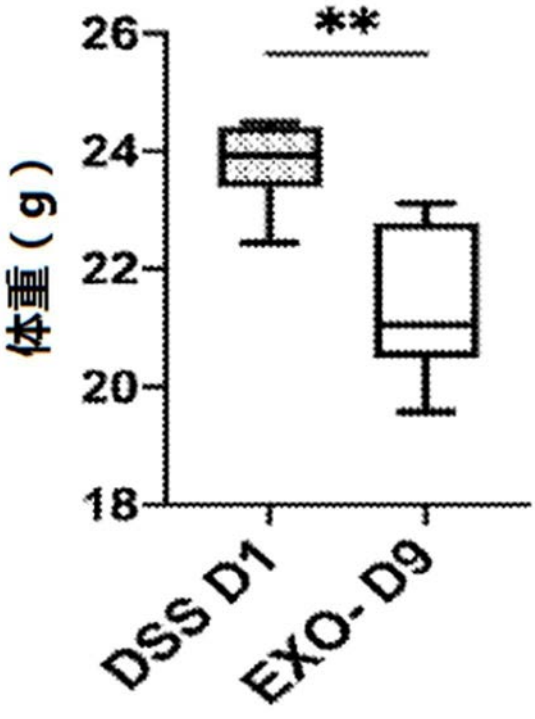
**
26
24
22
20
18
体重（g）
DSS D1
EXO- D9

图6C

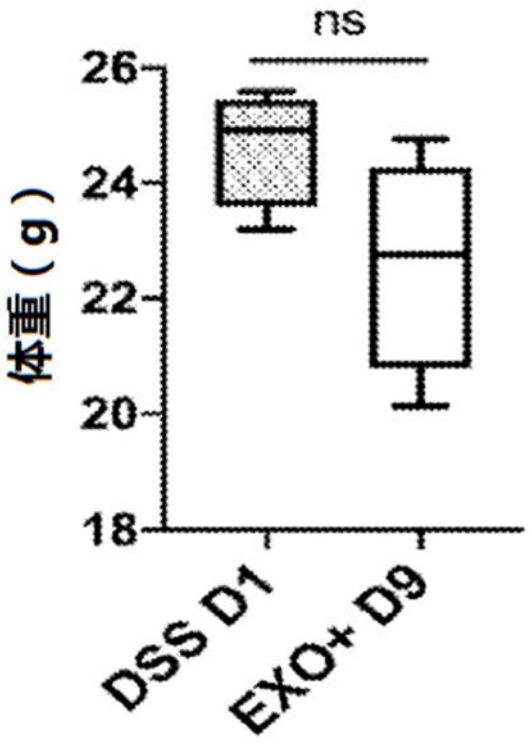

图6D

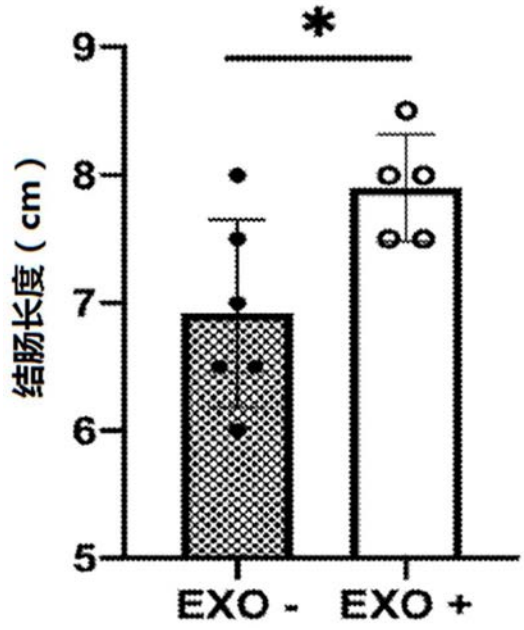

图6E

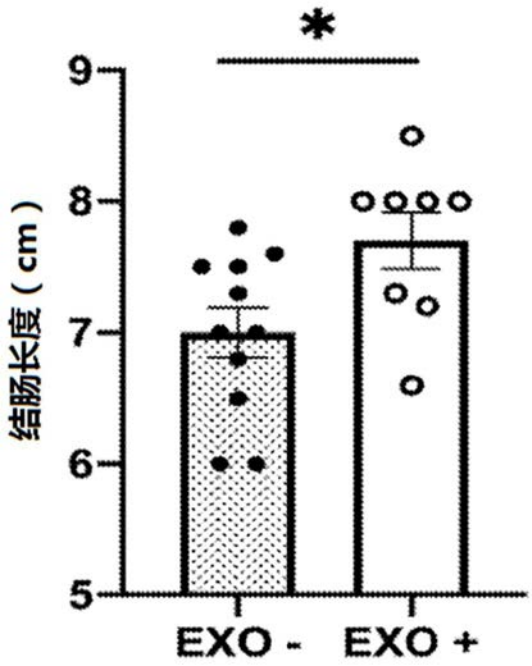

图6F

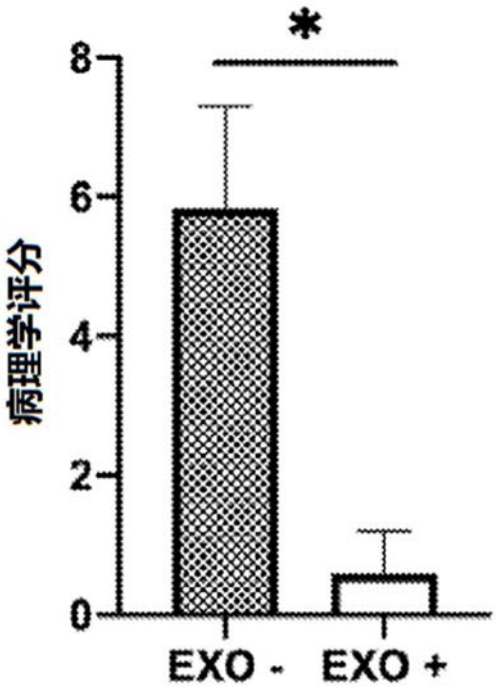

图6G

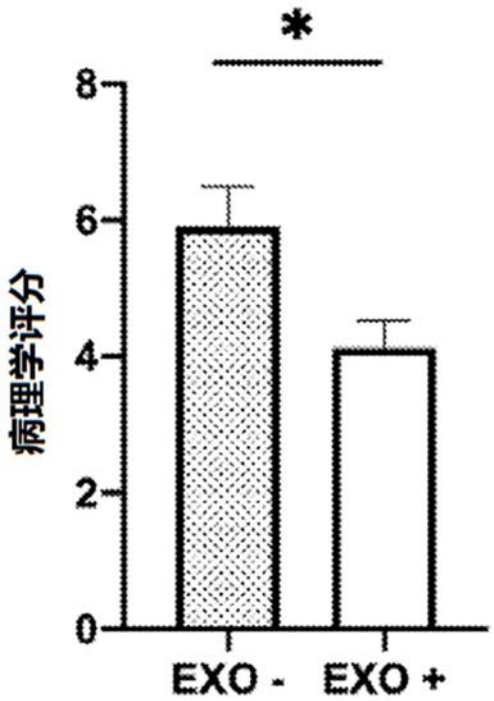

图6H

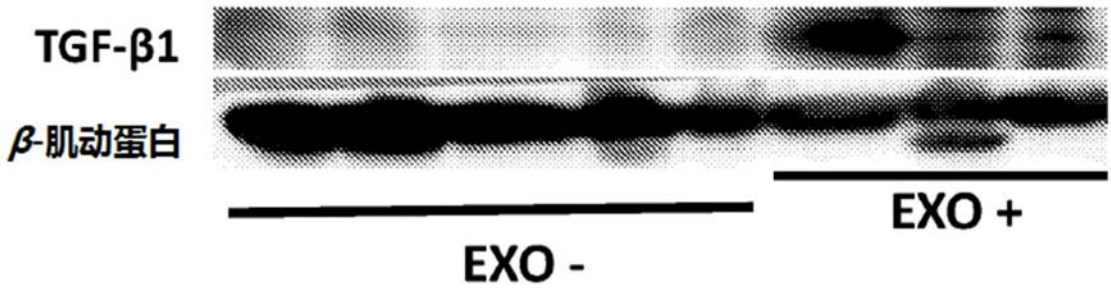

图7A

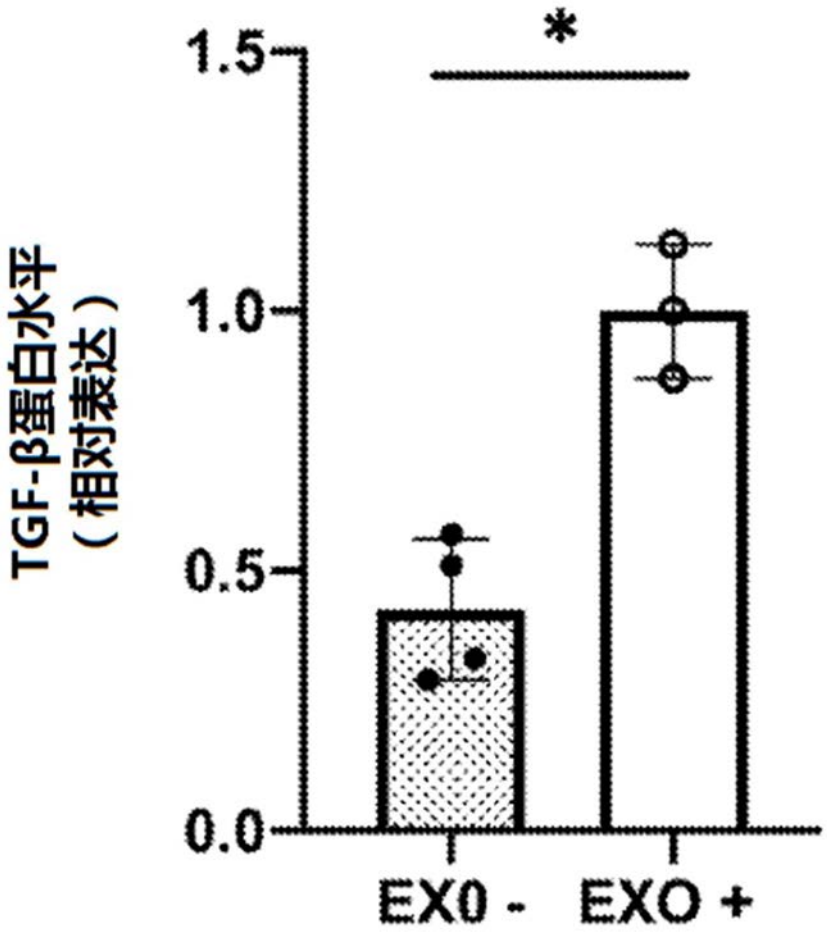

图7B

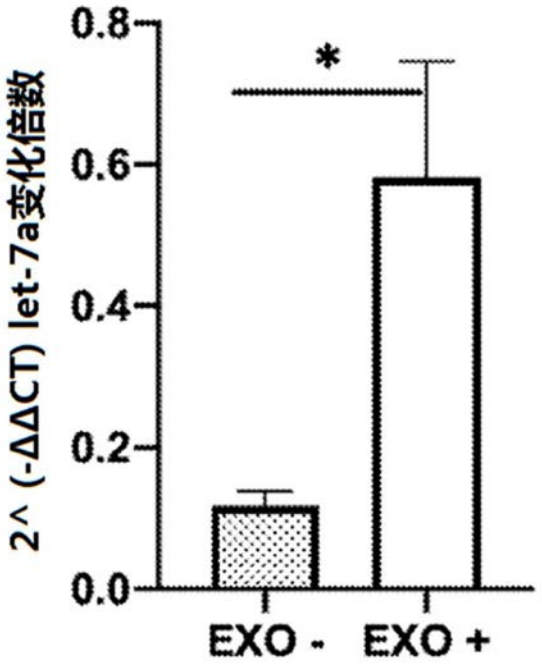
2^ (-ΔΔCT) let-7a变化倍数
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
EXO -
EXO +

图8A

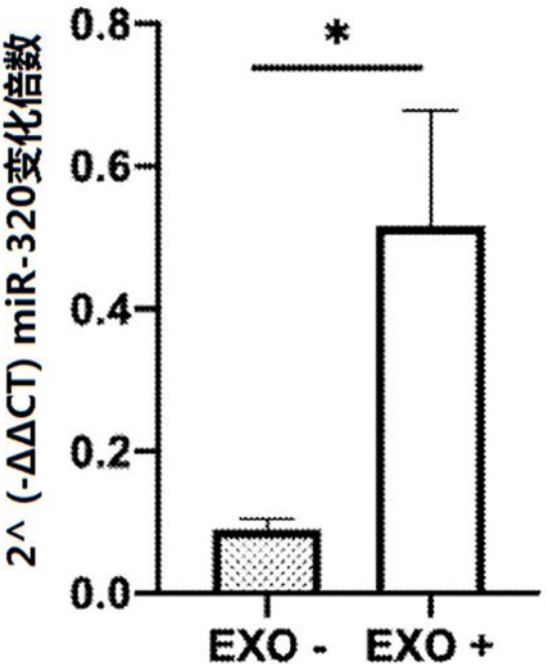
2^ (-ΔΔCT) miR-320变化倍数
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
EXO -
EXO +

图8B

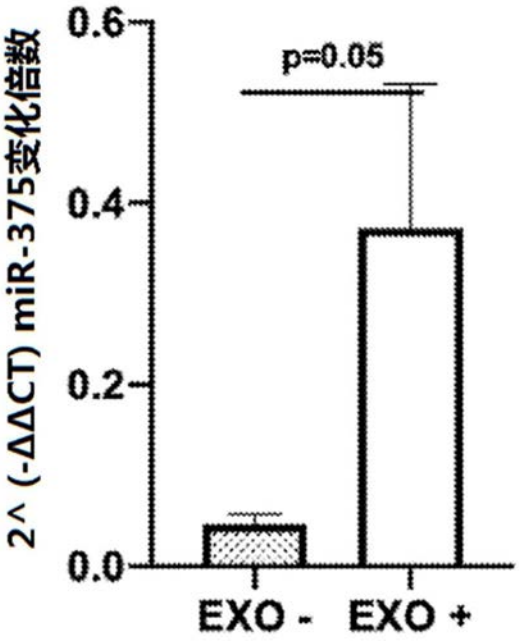
0.6
0.4
0.2
0.0
2^ (-ΔΔCT) miR-375变化倍数
p=0.05
EXO -
EXO +

图8C

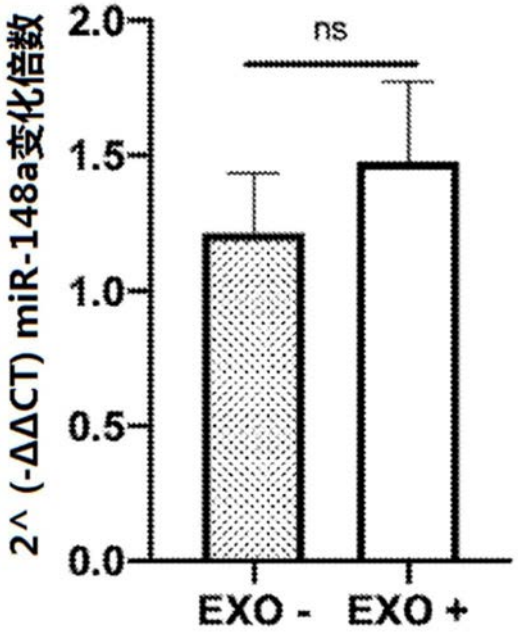
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2^ (-ΔΔCT) miR-148a变化倍数
ns
EXO -
EXO +

图8D

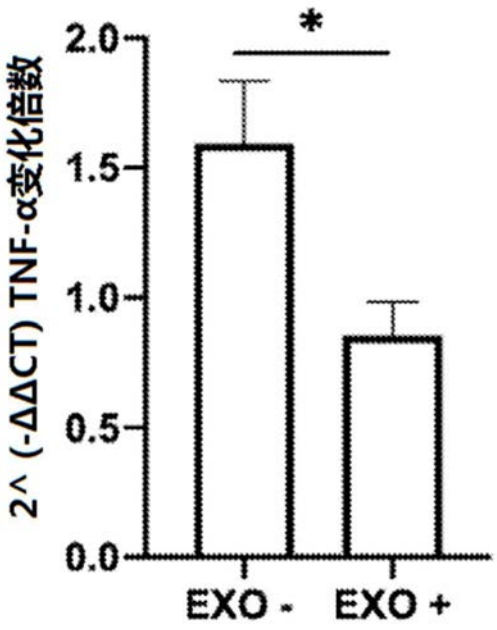
*
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2^ (-ΔΔCT) TNF-α变化倍数
EXO -
EXO +

图9A

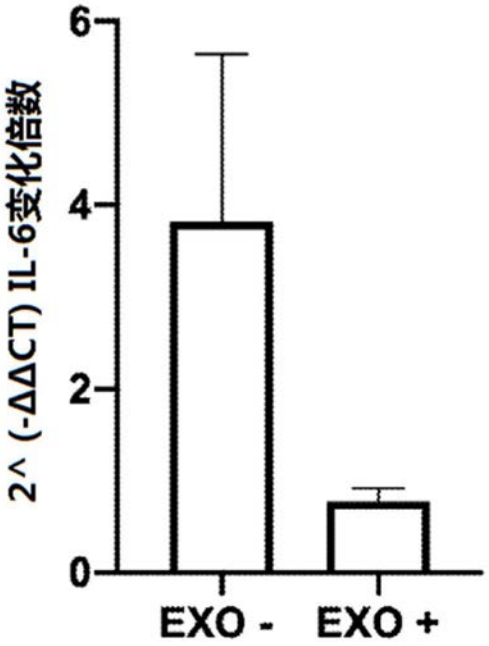
6
4
2
0
2^ (-ΔΔCT) IL-6变化倍数
EXO -
EXO +

图9B