



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115297850 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202080094331.X

(22) 申请日 2020.12.04

(30) 优先权数据

62/943,943 2019.12.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/063475 2020.12.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/113761 EN 2021.06.10

(71) 申请人 得克萨斯州大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 拉古·卡尔卢里

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

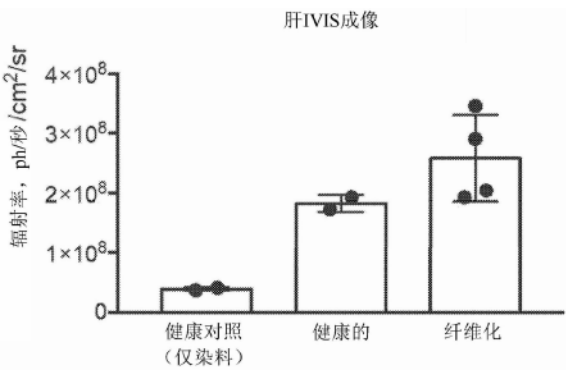
权利要求书4页 说明书30页 附图57页

(54) 发明名称

用于肝纤维化和其他与纤维化相关的疾病的  
基于外排体的治疗

(57) 摘要

本文中提供了基于脂质的纳米粒(例如外排体)的组合物,该基于脂质的纳米粒含有治疗性、靶向STAT3的抑制性RNA。还提供了使用这样的组合物来治疗患有纤维化或与纤维化相关的疾病的患者的方法。



1. 组合物,其包含基于脂质的纳米粒,所述基于脂质的纳米粒含有与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA。
2. 权利要求1所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含CD47。
3. 权利要求1或2所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含生长因子。
4. 权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒是脂质体或外排体。
5. 权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA是siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、miRNA或miRNA前体。
6. 权利要求5所述的组合物,其中所述抑制性RNA是反义寡核苷酸并且其中所述反义寡核苷酸是经修饰的。
7. 权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA敲低了STAT3蛋白的表达。
8. 权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA的尺寸为18至30个核苷酸。
9. 权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:1。
10. 权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:2。
11. 权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:3。
12. 权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:4。
13. 权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:5。
14. 药物组合物,其包含权利要求1至13中任一项所述的组合物以及赋形剂。
15. 权利要求14所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于肠胃外施用。
16. 权利要求15所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内、肌肉、皮下或腹膜内注射。
17. 权利要求14至16中任一项所述的药物组合物,其还包含抗微生物剂。
18. 权利要求17所述的药物组合物,其中所述抗微生物剂是苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、布罗波尔、西曲溴铵、西吡氯铵、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪唑烷脒、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇或硫柳汞。
19. 在有此需要的患者中治疗纤维化或与纤维化相关的病症的方法,其包括向所述患者施用权利要求14至18中任一项所述的药物组合物。
20. 权利要求19所述的方法,其中施用所述药物组合物实现所述抑制性RNA向所述患者中的细胞的递送。
21. 权利要求19或20所述的方法,其中所述纤维化是肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤。
22. 权利要求21所述的方法,其中所述纤维化是肝纤维化。
23. 权利要求19至21中任一项所述的方法,其中所述药物组合物通过全身性施用来施用。
24. 权利要求23所述的方法,其中所述全身性施用是静脉内施用。
25. 权利要求19至24中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用至少第二治疗。

26. 权利要求19至25中任一项所述的方法,其中所述患者是人。
27. 权利要求26所述的方法,其中所述基于脂质的纳米粒是外排体,其中所述外排体对于所述患者是自体的。
28. 权利要求19至27中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Colla1的表达。
29. 权利要求19至27中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Acta2的表达。
30. 权利要求19至27中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Colla2的表达。
31. 权利要求19至27中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Vim的表达。
32. 权利要求19至31中任一项所述的方法,其中所述肝细胞是肝星形细胞。
33. 权利要求19至31中任一项所述的方法,其中所述肝星形细胞是活化的肝星形细胞。
34. 组合物,其包含基于脂质的纳米粒,所述基于脂质的纳米粒含有与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA。
35. 权利要求34所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含CD47。
36. 权利要求34所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含生长因子。
37. 权利要求34所述的组合物,其中所述基于脂质的纳米粒是脂质体或外排体。
38. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA是siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、miRNA或miRNA前体。
39. 权利要求38所述的组合物,其中所述抑制性RNA是反义寡核苷酸并且其中所述反义寡核苷酸是经修饰的。
40. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA敲低了STAT3蛋白的表达。
41. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA的尺寸为18至30个核苷酸。
42. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:1。
43. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:2。
44. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:3。
45. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:4。
46. 权利要求34所述的组合物,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:5。
47. 药物组合物,其包含权利要求34至46中任一项所述的组合物以及赋形剂。
48. 权利要求47所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于肠胃外施用。
49. 权利要求48所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内、肌肉内、皮下或腹膜内注射。
50. 权利要求48所述的药物组合物,其还包含抗微生物剂。
51. 权利要求50所述的药物组合物,其中所述抗微生物剂是苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、布罗波尔、西曲溴铵、西吡氯铵、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪唑烷脒、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇或硫柳汞。
52. 在有此需要的患者中治疗纤维化或与纤维化相关的病症的方法,其包括向所述患者施用权利要求47至51中任一项所述的药物组合物。

53. 权利要求52所述的方法, 其中施用所述药物组合物实现所述抑制性RNA向所述患者中的细胞的递送。

54. 权利要求52所述的方法, 其中所述纤维化是肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化 (IPF) 或辐射诱发的肺损伤。

55. 权利要求54所述的方法, 其中所述纤维化是肝纤维化。

56. 权利要求52所述的方法, 其中所述药物组合物通过全身性施用来施用。

57. 权利要求56所述的方法, 其中所述全身性施用是静脉内施用。

58. 权利要求52所述的方法, 其还包括向所述患者施用至少第二治疗。

59. 权利要求52所述的方法, 其中所述患者是人。

60. 权利要求59所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米粒是外排体, 其中所述外排体对于所述患者是自体的。

61. 权利要求60所述的方法, 其中所述外排体获自从所述患者获得的体液样品。

62. 权利要求61所述的方法, 其中所述体液样品是血液、淋巴、唾液、尿、脑脊液、骨髓抽吸物、眼渗出物/泪、或血清。

63. 权利要求60所述的方法, 其中所述外排体从间充质细胞获得。

64. 权利要求52所述的方法, 其中所述组合物施用多于一次。

65. 权利要求52所述的方法, 其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Colla1的表达。

66. 权利要求52所述的方法, 其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Acta2的表达。

67. 权利要求52所述的方法, 其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Colla2的表达。

68. 权利要求52所述的方法, 其中施用所述药物组合物降低了所述患者的肝细胞中Vim的表达。

69. 权利要求52所述的方法, 其中所述肝细胞是肝星形细胞。

70. 权利要求52所述的方法, 其中所述肝星形细胞是活化的肝星形细胞。

71. 制备治疗性组合物的方法, 其包括将与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA引入到基于脂质的纳米粒中。

72. 权利要求71所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含CD47。

73. 权利要求71或72所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米粒在其表面上包含生长因子。

74. 权利要求71至73中任一项所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米粒是脂质体或外排体。

75. 权利要求71至74中任一项所述的方法, 其中所述抑制性RNA是siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、miRNA或miRNA前体。

76. 权利要求75所述的方法, 其中所述抑制性RNA是反义寡核苷酸并且其中所述反义寡核苷酸是经修饰的。

77. 权利要求71至76中任一项所述的方法, 其中所述抑制性RNA敲低了STAT3蛋白的表达。

78. 权利要求71至77中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA的尺寸为18至30个核苷酸。

79. 权利要求71至78中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:1。

80. 权利要求71至78中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:2。

81. 权利要求71至78中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:3。

82. 权利要求71至78中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:4。

83. 权利要求71至78中任一项所述的方法,其中所述抑制性RNA包含SEQ ID NO:5。

## 用于肝纤维化和其他与纤维化相关的疾病的基于外排体的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年12月5日提交的美国临时专利申请No.62/943,943的优先权权益,其通过引用以其整体并入本文。

[0003] 背景

### 1. 技术领域

[0004] 本发明总体上涉及医学领域。更特别地,其涉及用于治疗纤维化和与纤维化相关的疾病的组合物和方法。

### 2. 背景技术

[0005] 肝纤维化的特征在于肝中过多的胞外基质(extracellular matrix,ECM)沉积,其替代了功能性实质并在全球范围内严重影响了健康(Hernandez-Gea et al.,2001)。目前,除了减轻持续的肝损伤或肝移植之外,没有有效的抗纤维化治疗(Battaller et al.,2005)。用于肝纤维化的有效治疗迫切需要创新的新方法。在肝纤维化的关键调节子中,主要涉及信号转导及转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)信号传导途径,其驱动成纤维细胞和肝星形细胞(hepatic stellate cell,HSC)的活化以及其向肌成纤维细胞样表型的转化(Chakraborty et al.,2017;Xiang et al.,2018;Pechkovsky et al.,2012)。STAT3是转录因子,其响应于细胞因子激活通过Janus酪氨酸激酶(JAK)而被磷酸化。在激活之后,磷酸化的STAT3二聚化并转移到细胞核中以激活细胞因子响应性下游基因的转录(Chakraborty et al.,2017)。激活STAT3的细胞因子包括TGFβ1(Meng et al.,2016)、IL-6细胞因子家族和生长激素(growth hormone,GH)。已报道了在患者和小鼠模型中观察到的纤维化肝中有STAT3活化(Xiang et al.,2018;Choi et al.,2019),并且使用索拉非尼(Sorafenib)或其他抑制剂进行的STAT3抑制部分改善了小鼠中CC14诱发的肝纤维化(Choi et al.,2019;Su et al.,2015)。尽管STAT3已成为肝纤维化的重要弱点(vulnerability),但由于缺乏STAT3特异性抑制剂,因此STAT3的治疗性靶向仍是挑战(Bartneck et al.,2014)。因此,需要新的抑制STAT3信号传导的方法来开发特定的抗纤维化治疗。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开内容的一些实施方案包括纳米粒、组合物、药物组合物、核酸、抑制性RNA分子、用于制备治疗性组合物的方法、用于分离外排体(exosome)的方法、用于制备基于脂质的纳米粒的方法和用于治疗对象的方法。本公开内容的组合物可以包含以下组分中的至少1、2、3、4、5或更多种:脂质体、外排体、抑制性RNA、siRNA、shRNA、miRNA、生长因子、未经修饰的反义寡核苷酸、经修饰的反义寡核苷酸和抗微生物剂。在一些实施方案中,这些组分中的任何一种或更多种可以从本公开内容的组合物中排除。本公开内容的方法可以包括以下步骤中的至少1、2、3、4或更多个:施用药物组合物,施用外排体,施用脂质体,施用抑制性RNA,

生成脂质体,从对象中获得外排体,从间充质细胞中纯化外排体,生成抑制性RNA,合成 siRNA,制备脂质纳米粒,将抑制性RNA引入到基于脂质的纳米粒中,将抑制性RNA包封在纳米粒中,将对象诊断为患有纤维化,以及治疗对象的纤维化。预期在一些实施方案中,这些步骤中的任何一个或更多个可以从本公开内容的方法中排除。

[0008] 在一些实施方案中,本文提供了包含基于脂质的纳米粒的组合物,该基于脂质的纳米粒含有与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA。在一些方面中,基于脂质的纳米粒在其表面上包含CD47。在一些方面中,基于脂质的纳米粒在其表面上包含生长因子。在一些方面中,基于脂质的纳米粒是脂质体或外排体。在一些方面中,抑制性RNA是 siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、miRNA或miRNA前体(pre-miRNA)。在某些方面中,反义寡核苷酸是经修饰的。在一些方面中,抑制性RNA敲低了STAT3蛋白的表达。在一些方面中,抑制性RNA的尺寸为18至30个核苷酸。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:1至5中的任一个具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:1具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:4具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,抑制性RNA包含与SEQ ID NO:5具有至少、具有至多或具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9或100% (或其中可推导出的任何范围) 的同一性。在一些实施方案中,抑制性RNA包含SEQ ID NO:5。预期在一些实施方案中,这些组分中的任何一种或更多种可以从本公开内容的组合物中排除。在一些实施方案中,本文中公开了制备治疗性组合物的方法,其包括将本公开内容的抑制性RNA (例如,与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA) 引入到基于脂质的纳米粒 (例如,脂质体、外排体等) 中。

[0009] 在一些实施方案中,本文中提供了包含本发明实施方案中任一个的基于脂质的纳米粒以及赋形剂的药物组合物。在一些方面中,所述组合物被配制用于肠胃外施用。在某些方面中,所述组合物被配制用于静脉内、肌内、皮下或腹膜内注射。在某些方面中,所述组合物还包含抗微生物剂。在某些方面中,抗微生物剂是苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、布罗波尔(bronopol)、西曲溴铵(centrimide)、西吡氯铵(cetylpyridinium chloride)、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(exetidine)、咪唑烷脒(imidurea)、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇或硫柳汞(thimerosal)。

[0010] 在一些实施方案中,本文中提供了在有此需要的患者中治疗纤维化或与纤维化相

关的病症的方法,其包括向所述患者施用本发明实施方案中任一个的组合物。在一些方面中,施用药物组合物实现抑制性RNA向患者中的细胞的递送。在一些方面中,所述纤维化是肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)或辐射诱发的肺损伤。在一些实施方案中,所述纤维化是肝纤维化。在一些方面中,药物组合物通过全身性施用来施用。在某些方面中,全身性施用是静脉内施用。在某些方面中,所述方法还包括向所述患者施用至少第二治疗。在一些方面中,患者是人。在某些方面中,基于脂质的纳米粒是外排体,其中所述外排体对于患者是自体的。在某些方面中,外排体获自从患者获得的体液样品。在某些方面中,体液样品是血液、淋巴、唾液、尿、脑脊液、骨髓抽吸物、眼渗出物/泪、或血清。在某些方面中,外排体获自间充质细胞。在某些方面中,该组合物施用多于一次。在一些实施方案中,组合物施用至少或至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15次,或其中可推导出的任何范围。在某些方面中,施用本公开内容的组合物(例如,包含含有与STAT3多核苷酸杂交的抑制性RNA的基于脂质的纳米粒的组合物)降低了患者的细胞(例如,肝细胞)中一种或更多种STAT3相关基因的表达。在一些实施方案中,施用组合物降低了患者肝细胞中Col1a1的表达。在一些实施方案中,施用组合物降低了患者肝细胞中Acta2的表达。在一些实施方案中,施用组合物降低了患者肝细胞中Col1a2的表达。在一些实施方案中,施用组合物降低了患者肝细胞中Vim的表达。

[0011] 如本文中使用的就指定组分而言的“基本上不含”在本文中用于意指没有指定组分被有目的地配制成组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何非预期的污染导致的指定组分的总量远低于0.05%,例如低于0.01%。在一些实施方案中,“基本上不含”指定组分的组合物包含或含有至多0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.005%、0.001%、0.0001%或更少的指定组分。在一些实施方案中,“基本上不含”指定组分的组合物是其中用标准分析方法不能检出指定组分的量的组合物。

[0012] 如本文在说明书中所使用的,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或更多个/种。如本文在权利要求书中所使用的,当与词语“包含/包括”结合使用时,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。

[0013] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互相排斥的,否则在权利要求书中术语“或/或者”的使用用于意指“和/或”,尽管本公开内容支持仅指代替代方案和“和/或”的限定。本文中使用的“另外的”可意指至少第二或更多。

[0014] 在本申请通篇,术语“约”用于表示这样的值,其包括测量或定量方法的误差的固有变化。

[0015] 如在本说明书和权利要求中使用的,词语“包含(comprising)”(及其任何形式,例如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”)、“具有(having)”(及其任何形式,例如“具有(have)”和“具有(has)”)、“包括(including)”(及其任何形式,例如“包括(includes)”和“包括(include)”)或“含有(containing)”(及其任何形式,例如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是包含性的或开放式的,并且不排除另外的、未记载的要素或方法步骤。预期本文在术语“包含/包括”的背景下描述的一些实施方案也可在术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”的背景下实施。

[0016] 在治疗性、诊断性或生理性目的或作用的背景下的任何方法也可以以“用途”权利要求语言描述,例如本文所讨论的任何化合物、组合物或药剂用于实现或实施所述治疗性、

诊断性或生理性目的或作用“的用途”。

[0017] 可以基于本文中描述的任何方法使用一种或更多种序列或组合物的用途。在本申请通篇讨论了另一些实施方案。关于本公开内容的一个方面所讨论的任何实施方案也适用于本公开内容的其他方面,反之亦然。例如,本文中所描述的方法中的任何步骤都可以适用于任何其他方法。此外,本文所述的任何方法可以排除任何步骤或步骤的组合。在实施例部分中的实施方案应理解为适用于本文中所述技术的所有方面的实施方案。

[0018] 从以下详细描述中,本发明的其他目标、特征和优点将变得明显。然而,应理解,虽然详细描述和具体实例指示了本发明的某些实施方案,但是其仅以举例说明的方式给出,因为根据该详细描述,本发明的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得明显。

## 附图说明

[0019] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过结合本文中给出的具体实施方案的详细描述来参考这些附图中的一个或多个可更好地理解本发明。

[0020] 图1.肝IVIS成像。

[0021] 图2A至2B.肝实质的损伤。图2A示出了来自用不同外排体处理进行处理的纤维化小鼠的肝的H&E染色切片。图2B示出了图2A中看到的纤维化水平的量化。

[0022] 图3A至3B.肺实质的损伤。图3A示出了来自用不同外排体处理进行处理的纤维化小鼠的肺的H&E染色切片。图3B示出了图3A中看到的纤维化水平的量化。

[0023] 图4A至4F. STAT3在原代HSC中的敲低效率和外排体的生物分布。图4A和4B示出了在用 $5\mu\text{g}/20$ 亿个 $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$  (图4A) 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$  (图4B) 处理的HSC中的相对Stat3的表达。图4C示出了在非纤维化(假(sham)) (左图) 和纤维化小鼠(右图) ( $n=1$ ) 中分析所列器官的经DiR标记的外排体的存在的代表性图像。图4D至4F示出了所列组的冷冻肝组织中经AF647标记的外排体和DAPI的免疫荧光成像(图4D) 和量化(图4E和4F) (每个所分析组织3个视野)。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。对于图4A和4D,使用了未配对的双尾t检验。对于图4B,使用了单因素ANOVA与Sidak事后分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0024] 图5A至5K. 图5A示出了培养7天的小鼠肝星形细胞(HSC)的图像(左图)。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。原代小鼠HSC的 $\alpha$ -SMA和DAPI的免疫荧光染色(中图和右图)。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。图5B和5C示出了STAT3的qPCR分析。图5D示出了 $\text{CCl}_4$ 和 $\text{iExosomes/siRNA/mASO}$ 处理方案的示意图。上面的箭头指示 $\text{CCl}_4$ 注射(第0天),以及下面的箭头指示 $\text{iExosomes/siRNA/mASO}$ 注射(第9天)。图5E和5F示出了用 $1\mu\text{g}$   $10$ 亿个 $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理的小鼠中胶原I的免疫组织化学染色(图5E) 和量化(图5F)。(每个所分析组织3个视野)。 $n=3$ ;比例尺: $100\mu\text{m}$ 。图5G和5H示出了在用 $1\mu\text{g}$   $10$ 亿个 $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理的小鼠中 $\alpha$ -SMA的免疫荧光染色(图5G) 和量化(图5H)。(每个所分析组织3个视野)。 $n=3$ 。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。图5I示出了来自用 $1\mu\text{g}$   $10$ 亿个 $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理的小鼠的肝的H&E染色(每个所分析组织5个视野), $n=5$ ;比例尺: $100\mu\text{m}$ 。图5J和5K示出了坏死的肝细胞(图5J) 和退化的肝细胞(图5K)的百分比。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。图中的各个点描绘了不同的小鼠。图5B(左图),未配对

的双尾Student t-检验。图5B(右图)和图5C至5K,单因素ANOVA与Sidak事后分析;p值在所有图表中都示出。 $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $****p<0.0001$ ; ns:不显著。

[0025] 图6A至6J.靶向STAT3的iExosomes降低了肝纤维化。图6A和6B示出了用所示的 $1\mu\text{g}/10$ 亿个(图6A)或 $5\mu\text{g}/20$ 亿个(图6B)  $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理进行处理的小鼠的肝中STAT3的相对mRNA表达。在 $5\mu\text{g}/20$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠;在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,使用了 $n=4$ 至5只不同的小鼠,单因素ANOVA。图6C和6D示出了来自 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的处理组的肝切片的代表性天狼星红(Sirius red)染色(图6C)和量化(图6D)(每个所分析组织3个视野)。  $n=5$ 至6只不同的小鼠,单因素ANOVA。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。该图描绘了天狼星红阳性区域的百分比。图6E和6F示出了来自 $5\mu\text{g}/20$ 亿个的处理组的肝切片的代表性天狼星红染色(图6E)和量化(图6F)(每个所分析组织3个视野)。  $n=3$ 至5只不同的小鼠。比例尺: $100\mu\text{m}$ 。该图描绘了天狼星红阳性区域的百分比。图6G和6H示出了胶原I的免疫组织化学染色的代表性图像(每个所分析组织3个视野)(图6G)以及每个视野( $100\times$ )的胶原I<sup>+</sup>区域的百分比量化(图6H)。  $n=3$ 。图6I和6J示出了 $\alpha$ -SMA免疫荧光染色(图6I;每个所分析组织3个视野)和每个视野( $100\times$ )的 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>细胞数量的量化(图6J)。  $n=3$ 至4只不同的小鼠;比例尺: $100\mu\text{m}$ 。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。图中的各个点描绘了不同的小鼠。除非另有说明,否则使用单因素ANOVA或双尾未配对的t检验;p值在所有图表中都示出。 $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$ ; ns:不显著。

[0026] 图7A至7K.靶向STAT3的iExosomes保留了肝功能性实质。图7A至7D示出了在具有所示处理的肝中的相对Col1a1(图7A和7B)和Acta2(图7C和7D)的表达。在 $5\mu\text{g}/20$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠;在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,  $n=5$ 只不同的小鼠,在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,使用单因素ANOVA用于统计学分析。图7E和7F示出了在具有所示处理的小鼠中ALT的血清水平。在 $5\mu\text{g}/20$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠;在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠,使用单因素ANOVA用于统计学分析。图7G和7H示出了在具有所示处理的小鼠中AST的血清水平。在 $5\mu\text{g}/20$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠;在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,  $n=4$ 至5只不同的小鼠,在 $1\mu\text{g}/10$ 亿个的组中,使用单因素ANOVA用于统计学分析。图7I示出了石蜡包埋的肝切片的H&E染色(每个所分析组织3至5个视野)。  $n=4$ 至5只不同的小鼠;比例尺: $100\mu\text{m}$ 。图7J和7K示出了坏死的肝细胞和退化的肝细胞的百分比。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。图中的各个点描绘了不同的小鼠。单因素ANOVA或未配对的双尾t检验;p值在所有图表中都示出。 $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $****p<0.0001$ ; ns:不显著。

[0027] 图8A和8B.图8A示出了用 $5\mu\text{g}/20$ 亿个  $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理的小鼠中所列器官的H&E染色。图8B示出了用 $1\mu\text{g}/10$ 亿个  $\text{iExo}^{\text{siRNA-STAT3}}$ 或 $\text{iExo}^{\text{mASO-STAT3}}$ 处理的小鼠中所列器官的H&E染色。

[0028] 图9A至9H. iExosomes处理期间纤维化肝转录组的重编程。图9A示出了热图,其描绘了实验组(siCntrl iExo ( $n=3$ ), siSTAT3iExo ( $n=3$ ), mASO Scrbl iExo ( $n=3$ ) 和mASO STAT3iExo ( $n=3$ ))中所有探针的相对强度。使用 $\log_2$ 转换的mRNA-Seq表达数据对行和列两者进行欧几里得聚类(Euclidean clustering)。图9B和9C示出了描绘了所列实验组的肝中差异调节基因的数量火山图(volcano plot)。图9D示出了STAT3信号传导的热图。图9E示出了与ECM沉积和重塑相关的选定基因。图9F和9G示出了通过使用基因本体(gene ontology, GO)分析(WebGestalt)富集来表示靶基因中的差异。图9H示出了ECM相关基因和

通过NetworkAnalyst生成的用于STAT3信号传导的相互作用网络。。

[0029] 图10A至10H.在活化的肝星形细胞中的Col1a1敲除。图10A示出了天狼星红染色以评估ECM和胶原I相关的纤维化,其表明在纤维化的背景下,来自活化的肝星形细胞或 $\alpha$ SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞(Col1a1<sup>CKO</sup>)的I型胶原的遗传损失显著降低。图10B示出了表明在患有肝纤维化的Col1a1<sup>CKO</sup>中胶原I显著降低的结果。图10C示出了表明在患有肝纤维化的Col1a1<sup>CKO</sup>中肝组织学显著改善的结果。图10D至10F示出了来自图10A至10C的结果的定量。图10G和10H示出了基因表达数据,其表明在患有肝纤维化的Col1a1<sup>CKO</sup>小鼠中与肝纤维化相关的许多全表达模式得以显著改善。

[0030] 发明详述

[0031] 本文中提供了经改造以携带抑制性RNA分子的外排体,该抑制性RNA分子包括反义寡核苷酸(anti-sense oligonucleotide,ASO)和siRNA,其靶向STAT3,STAT3是器官纤维化(包括肝和肺纤维化)的调节子。这些经改造的外排体可用于治疗纤维化,包括肝纤维化和肺纤维化。由于从间充质干细胞获得的外排体非常大量地分布至肺和肝,因此ASO或siRNA的递送是有效的。

[0032] I. 基于脂质的纳米粒

[0033] 基于脂质的纳米粒可以是脂质体、外排体、脂质制品或另外的基于脂质的纳米粒,例如基于脂质的囊泡(例如,DOTAP:胆固醇囊泡)。基于脂质的纳米粒可以是带正电荷、带负电荷或中性的。基于脂质的纳米粒可包含必要的组分以允许转录和翻译、信号转导、趋化性或其他细胞功能。预期在一个实施方案中可以排除这些条目中的一个或多个。

[0034] 基于脂质的纳米粒在其表面上可包含CD47。CD47(整合素相关蛋白)是在大多数组织和细胞上表达的跨膜蛋白。CD47是信号调节蛋白 $\alpha$ (Signal Regulatory Protein Alpha, SIRP- $\alpha$ )的配体,其在吞噬细胞(例如巨噬细胞和树突细胞)上表达。活化的CD47-SIRP- $\alpha$ 启动抑制吞噬作用的信号转导级联。因此,不受理论的束缚,外排体表面上的CD47的表达可阻止通过巨噬细胞的吞噬作用(参见WO 2016/201323,其通过引用整体并入本文)。

[0035] A. 脂质体

[0036] “脂质体”是通用术语,包括通过产生封闭的脂质双层或脂质聚集体形成的多种单层和多层脂质载剂。脂质体可表征为具有囊泡结构,所述囊泡结构具有通常包含磷脂的双层膜,和通常包含水性组合物的内部介质。本文中提供的脂质体包括单层脂质体、多层脂质体和多囊脂质体。本文中提供的脂质体可带正电荷、带负电荷或带中性电荷。在某些实施方案中,脂质体是电荷中性的。

[0037] 多层脂质体具有由水性介质分隔的多个脂质层。这样的脂质体在包含磷脂的脂质悬浮在过量的水溶液中时自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自身重排并包载脂质双层之间的水和溶解的溶质。亲脂性分子或具有亲脂性区域的分子也可溶解在脂质双层中或与脂质双层缔合。

[0038] 在一些具体方面中,多肽、核酸或小分子药物可例如包封在脂质体的水性内部中、散布在脂质体的脂质双层内、通过与脂质体和多肽/核酸二者缔合的连接分子与脂质体连接、包埋在脂质体中、与脂质体复合等。

[0039] 如本领域普通技术人员已知的,根据本发明实施方案使用的脂质体可通过不同方法制备。例如,将磷脂,例如如中性磷脂二油酰基磷脂酰胆碱

(dioleoylphosphatidylcholine, DOPC) 溶解在叔丁醇中。然后将脂质与多肽、核酸和/或其他组分混合。将吐温20添加至脂质混合物,以使得吐温20为组合物重量的约5%。向该混合物添加过量的叔丁醇,以使得叔丁醇的体积为至少95%。涡旋混合物,在干冰/丙酮浴中冷冻并冻干过夜。冻干制剂被储存在-20℃下,并可使用长至三个月。当需要时,将冻干脂质体在0.9%盐水中重构。

[0040] 或者,脂质体可通过将脂质在容器(例如,玻璃、梨形烧瓶)中的溶剂中混合来制备。容器的体积应为预期的脂质体混悬液的体积的十倍。使用旋转蒸发器,在负压下在约40℃下去除溶剂。溶剂通常在约5分钟至2小时内去除,这取决于所期望的脂质体体积。组合物可在真空下的干燥器中进一步干燥。干燥的脂质通常由于随着时间的推移趋于恶化而在约1周之后丢弃。

[0041] 干燥的脂质可在无菌、无热原的水中在约25mM至50mM磷脂下通过摇动直至全部脂质膜重悬而水合。然后可将水性脂质体分成等分试样,将每个等分试样放置于小瓶中,冻干并在真空下密封。

[0042] 如上所述制备的干燥脂质或冻干脂质体可脱水并在蛋白质或肽的溶液中重构,并用合适的溶剂(例如DPBS)稀释至合适的浓度。然后将混合物在涡旋混合器中剧烈摇动。通过在29,000×g下离心去除未包封的另外的材料(例如包括但不限于激素、药物、核酸构建体等的试剂),并洗涤脂质体沉淀物。将经洗涤的脂质体以合适的总磷脂浓度,例如约50mM至200mM重悬。包封的另外的材料或活性剂的量可根据标准方法确定。在确定包封在脂质体制剂中的另外的材料或活性剂的量之后,可将脂质体稀释至合适的浓度并储存在4℃下直至使用。包含脂质体的药物组合物将通常包含无菌的可药用载体或稀释剂,例如水或盐水溶液。

[0043] 可与本发明实施方案一起使用的其他脂质体包括阳离子脂质体,例如,如在W002/100435A1、美国专利5,962,016、美国申请2004/0208921、W003/015757A1、W004/029213A2、美国专利5,030,453和美国专利6,680,068中所述,其全部均在没有声明放弃(disclaimer)的情况下通过引用在此整体并入。

[0044] 在制备这样的脂质体中,可使用本文中所述的,或者如本领域普通技术人员已知的任何方案。制备脂质体的另外的非限制性实例描述于美国专利4,728,578、4,728,575、4,737,323、4,533,254、4,162,282、4,310,505和4,921,706;国际申请PCT/US85/01161和PCT/US89/05040中,其各自通过引用并入本文。

[0045] 在某些实施方案中,基于脂质的纳米粒是中性脂质体(例如,DOPC脂质体)。本文中使用的“中性脂质体”或“不带电荷的脂质体”被限定为具有一种或更多种脂质组分的脂质体,所述脂质组分产生基本上中性的净电荷(基本上不带电荷)。“基本上中性”或“基本上不带电荷”意指给定群体(例如,脂质体群体)中的少数(如果有的话)脂质组分包含未被另一组分的相反电荷消除的电荷(即,少于10%的组分包含未消除的电荷,更优选少于5%,且最优选少于1%)。在某些实施方案中,中性脂质体可主要包含在生理条件下(即,在约pH 7下)本身是中性的脂质和/或磷脂。

[0046] 本发明实施方案的脂质体和/或基于脂质的纳米粒可包含磷脂。在某些实施方案中,单种磷脂可用于产生脂质体(例如,中性磷脂(例如DOPC),可用于产生中性脂质体)。在另一些实施方案中,可使用多于一种磷脂来产生脂质体。磷脂可来自天然或合成来源。磷脂

包括,例如,磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油和磷脂酰乙醇胺;因为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱在生理条件下(即,在约pH 7下)是不带电荷的,所以这些化合物可特别用于产生中性脂质体。在某些实施方案中,磷脂DOPC用于产生不带电荷的脂质体。在某些实施方案中,可使用非磷脂的脂质(例如,胆固醇)。

[0047] 磷脂包括甘油磷脂和某些鞘脂。磷脂包括但不限于:二油酰基磷脂酰胆碱(“DOPC”)、卵磷脂酰胆碱(“EPC”)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(“DLPC”)、二豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(“DPPC”)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(“DSPC”)、1-豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(“MPPC”)、1-棕榈酰基-2-豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“PMPC”)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱(“PSPC”)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(“SPPC”)、二月桂酰基磷脂酰甘油(“DLPG”)、二豆蔻酰基磷脂酰甘油(“DMPG”)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(“DPPG”)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(“DSPG”)、二硬脂酰基鞘磷脂(“DSSP”)、二硬脂酰基鞘磷脂酰乙醇胺(“DSPE”)、二油酰基磷脂酰甘油(“DOPG”)、二豆蔻酰基磷脂酸(“DMPA”)、二棕榈酰基磷脂酸(“DPPA”)、二豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(“DMPE”)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)、二豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)、脑磷脂酰丝氨酸(“BPS”)、脑鞘磷脂(“BSP”)、二棕榈酰基鞘磷脂(“DPSP”)、二豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(“DAPC”)、1,2-二花生酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(“DBPC”)、1,2-二十二碳烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(“DEPC”)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(“DOPE”)、棕榈酰氧基磷脂酰胆碱(“POPC”)、棕榈酰氧基磷脂酰乙醇胺(“POPE”)、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺和二亚油酰基磷脂酰胆碱。

[0048] B. 外排体

[0049] 本文中使用的术语“微囊泡”和“外排体”是指直径(或当颗粒不是球形时的最大尺寸)为约10nm至约5000nm,更通常30nm至1000nm,并且最通常约50nm至750nm的膜性颗粒,其中外排体膜的至少一部分直接从细胞获得。本公开内容的外排体的直径可为至少、至多或约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000或5000nm,或其中可推导出的任何范围。最常见的是,外排体的尺寸(平均直径)达到供体细胞尺寸的5%。因此,特别考虑的外排体包括从细胞脱落的外排体。

[0050] 外排体可在任何合适的样品类型例如如体液中检测到或从其中分离。本文中使用的术语“分离的”是指从其天然环境中分离出来,并且意指包括至少部分纯化,并且可包括大量纯化。本文中使用的术语“样品”是指适合于本发明提供的方法的任何样品。所述样品可以是包含适合于检测或分离的外排体的任何样品。样品的来源包括血液、骨髓、胸膜液、腹膜液、脑脊液、尿、唾液、羊水、恶性腹水、支气管肺泡灌洗液、滑液、乳汁、汗、泪、关节液和支气管清洗液(bronchial wash)。在一个方面中,样品是血液样品,包括例如全血或其任何级分或组分。适用于本发明的血液样品可从已知的任何来源(包括血细胞或其组分,例如静脉的、动脉的、外周的、组织、带,等)提取。例如,可使用公知和常规的临床方法(例如,用于抽取和处理全血的方法)获得和处理样品。在一个方面中,示例性样品可以是患有癌症的对象抽取的外周血。

[0051] 外排体还可从组织样品,例如手术样品、活检样品、组织、粪便和培养的细胞中分离。当从组织来源分离外排体时,可能需要将组织均质化以获得单细胞悬液,随后裂解细胞以释放外排体。当从组织样品分离外排体时,选择不导致外排体破坏的均质化和裂解方法是

重要的。本文中考虑的外排体优选地从在生理上可接受的溶液例如缓冲盐水、生长培养基、多种水性培养基等中的体液中分离。

[0052] 可从新鲜收集的样品或从已冷冻或冷藏储存的样品中分离外排体。在一些实施方案中,外排体可从细胞培养基中分离。尽管不是必需的,但如果在用体积排除聚合物进行沉淀之前澄清流体样品以除去来自样品的任何碎片,则可获得较高纯度的外排体。澄清方法包括离心、超速离心、过滤或超滤。最典型地,外排体可通过本领域公知的多种方法分离。一种优选的方法是由体液或细胞培养物上清液进行差速离心。用于分离外排体的示例性方法描述于(Losche et al.,2004;Mesri和Altieri,1998;Morel et al.,2004)中。或者,外排体也可如(Combes et al.,1997)中所述通过流式细胞术分离。

[0053] 用于分离外排体的一种被接受的方案包括超速离心,其通常与蔗糖密度梯度或蔗糖垫层(cushion)结合以使相对低密度的外排体漂浮。由于与其他微囊泡或大分子复合物尺寸分布重叠的可能性,通过连续差速离心分离外排体是复杂的。此外,离心可无法提供足够的方式来基于囊泡的尺寸分离囊泡。然而,连续离心当与蔗糖梯度超速离心结合时,可提供高的外排体富集。

[0054] 使用超速离心途径的替代途径,基于尺寸分离外排体是另一种选择。已报道了使用超滤方法成功纯化外排体,所述超滤方法比超速离心耗时更少,并且不需要使用特殊设备。类似地,可获得商业试剂盒(EXOMIR™,Bioo Scientific),其允许在一个微滤器上去除细胞、血小板和细胞碎片,并使用正压以驱动流体来在第二微滤器上捕获大于30nm的囊泡。但是,对于该过程,外排体未被回收,其RNA含量直接从在第二微滤器上捕获的物质中提取,然后可用于PCR分析。基于HPLC的方案可潜在地使得人们能够获得高纯度的外排体,尽管这些方法需要专用设备且难以扩大规模。一个重要的问题是血液和细胞培养基二者均包含大量与外排体尺寸范围相同的纳米粒(一些非囊泡)。例如,一些miRNA可包含在胞外蛋白质复合物中,而不是外排体中;然而,可进行蛋白酶(例如,蛋白酶K)处理以消除“外排体”蛋白质的任何可能的污染。

[0055] 在另一个实施方案中,可通过通常用于富集外排体样品的技术,例如涉及免疫特异性相互作用的技术(例如,免疫磁捕获)来捕获癌细胞来源的外排体。免疫磁捕获,也称为免疫磁细胞分离,通常涉及将针对特定细胞类型上发现的蛋白质的抗体附着于小的顺磁珠上。当抗体包被的珠与样品(例如血液)混合时,它们附着于并包围特定的细胞。然后将样品放置在强磁场中,使得珠沉淀至一侧。在去除血液之后,捕获的细胞与珠一起保留。该通用方法的许多变型形式在本领域中是公知的,并且适用于分离外排体。在一个实例中,外排体可附着于磁珠(例如,醛/硫酸盐珠),并随后将抗体添加至混合物以识别附着于珠的外排体表面上的表位。已知存在于癌细胞来源外排体上的示例性蛋白质包括ATP结合盒亚家族A成员6(ABCA6)、四次穿膜蛋白-4(TSPAN4)、SLIT和NTRK样蛋白4(SLITRK4)、推定的原钙黏着蛋白β-18(PCDHB18)、髓样细胞表面抗原CD33(CD33)和磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1(GPC1)。癌细胞来源的外排体可使用例如针对这些蛋白质中的一种或更多种的抗体或适配体来分离。

[0056] 应注意,并非在细胞中表达的所有蛋白质均在由该细胞分泌的外排体中被发现。例如,钙连蛋白、GM130和LAMP-2都是在MCF-7细胞中表达但未在由MCF-7细胞分泌的外排体中被发现的蛋白质(Baietti et al.,2012)。作为另一个实例,一项研究发现,190/190胰腺导管腺癌患者具有比健康对照更高的GPC1+外排体水平(Melo et al.,2015,其通过引用整

体并入本文)。值得注意的是,平均仅2.3%的健康对照具有GPC1+外排体。

[0057] 1.用于从细胞培养物中收集外排体的示例性方案

[0058] 在第1天,在T225烧瓶中在含有10%FBS的培养基中接种足够的细胞(例如,约500万个细胞)以使得在第二天细胞为约70%汇合(confluent)。在第2天,吸出细胞上的培养基,用PBS将细胞洗涤两次,并随后向细胞添加25至30mL基础培养基(即,无PenStrep或FBS)。将细胞孵育24至48小时。优选48小时孵育,但是一些细胞系对无血清培养基更敏感,并且因此孵育时间应减少到24小时。请注意,FBS包含将严重影响(skew)NanoSight结果的外排体。

[0059] 在第3/4天,收集培养基并在室温下以 $800 \times g$ 离心5分钟以使死细胞和大碎片沉淀。将上清液转移至新的锥形管,并将培养基以 $2000 \times g$ 再次离心10分钟以去除其他大碎片和大囊泡。使培养基通过 $0.2 \mu m$ 过滤器,并随后将其等分至超速离心管(例如,25 $\times$ 89mm Beckman Ultra-Clear),每管35mL。如果每个管的培养基体积小于35mL,则用PBS填充管的剩余部分以达到35mL。使用SW 32 Ti转子(k因子266.7,RCF最大133,907)在4 $^{\circ}C$ 下以28,000rpm将培养基超速离心2至4小时。小心吸出上清液,直至剩余约1英寸的液体。将管倾斜并允许剩余的培养基缓慢进入抽吸器移液管。如果期望的话,可将外排体沉淀物重悬于PBS中,并以28,000rpm超速离心,重复1至2小时,以进一步纯化外排体群体。

[0060] 最后,将外排体沉淀物重悬于210 $\mu L$  PBS中。如果每个样品存在多个超速离心管,则使用相同的210 $\mu L$  PBS连续重悬每个外排体沉淀物。对于每个样品,取10 $\mu L$ ,并且将其添加至990 $\mu L$   $H_2O$ ,以用于纳米粒追踪分析。将剩余的200 $\mu L$ 含外排体的混悬液用于下游过程,或立即储存在-80 $^{\circ}C$ 下。

[0061] 2.用于从血清样品中提取外排体的示例性方案

[0062] 首先,使血清样品在冰上解冻。然后,将250 $\mu L$ 的无细胞血清样品在11mL PBS中进行稀释;通过 $0.2 \mu m$ 孔过滤器进行过滤。将经稀释的样品在4 $^{\circ}C$ 下以 $150,000 \times g$ 超速离心过夜。第二天,小心弃去上清液,并在11mL PBS中洗涤外排体沉淀物。在4 $^{\circ}C$ 下以 $150,000 \times g$ 进行第二轮的超速离心,持续2小时。最后,小心弃去上清液,并将外排体沉淀物重悬于100 $\mu L$  PBS中以进行分析。

[0063] C.用于外排体和脂质体的电穿孔的示例性方案

[0064] 将 $1 \times 10^8$ 个外排体(通过NanoSight分析所测量)或100nm脂质体(例如,从Encapsula Nano Sciences购买)和1 $\mu g$ 的siRNA(Qiagen)或shRNA在400 $\mu L$ 电穿孔缓冲液(1.15mM磷酸钾,pH 7.2,25mM氯化钾,21%Optiprep)中混合。使用4mm小池(cuvette)对外排体或脂质体进行电穿孔(参见,例如Alvarez-Erviti et al.,2011;El-Andaloussi et al.,2012)。在电穿孔之后,将外排体或脂质体用不含蛋白酶的RNase进行处理,随后添加10 $\times$ 浓缩的RNase抑制剂。最后,根据超速离心方法将外排体或脂质体用PBS洗涤,如上所述。

[0065] II.抑制性RNA

[0066] A.反义寡核苷酸

[0067] 反义寡核苷酸(ASO)治疗剂是单链核酸治疗剂,通常为约16至30个核苷酸长,并且与培养物或生物体中的靶细胞中的靶核酸序列互补。

[0068] 在一些实施方案中,药剂是单链反义RNA分子、单链反义DNA分子或包含DNA和RNA两者的单链反义多核苷酸。在一个具体实施方案中,反义分子是包含DNA和RNA两者的ASO。

反义分子与靶mRNA例如STAT3mRNA内的序列互补。反义分子可以以通过与mRNA碱基配对进行的化学计量方式以及物理阻碍翻译机制来抑制翻译。反义分子可以具有至少或至多15至30个与靶mRNA互补的核苷酸。例如,反义分子可具有至少或至多15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个(或其中可推导出的任何范围或值)与靶mRNA互补的连续核苷酸的序列。

[0069] 在一些实施方案中,ASO包含至少或至多8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个(或其中可推导出的任何范围或值)核苷酸。这些值中的任何一个均可用于限定ASO中核苷酸数量的范围。例如,ASO可包含、至少包含或至多包含8至50、15至30或20至25个核苷酸。在一些实施方案中,ASO由8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个(或其中可推导出的任何范围或值)核苷酸组成。这些值中的任何一个均可用于限定ASO中核苷酸数量的范围。例如,ASO可以由8至50、15至30或20至25个核苷酸组成。

[0070] 在本公开内容的一个方面中,所述药剂是单链反义核酸分子(ASO)。反义寡核苷酸(ASO)是合成分子,以及在一些实施方案中,包含18至21个核苷酸的长度并且与靶基因的mRNA序列互补。ASO通过序列特异性杂交结合同源mRNA序列,这导致mRNA的切割或失能以及对靶基因表达的抑制。

[0071] 1.ASO的修饰

[0072] 在某些实施方案中,可以修饰本公开内容的ASO。“经修饰的ASO”是指其中核酸的一种或更多种组分(即糖、碱基和磷酸部分)与自然界中存在的那些不同(例如与人体中存在的那些不同)的分子。本领域中描述了对ASO的数种修饰。这些修饰旨在在维持对靶mRNA的特异性的同时改善ASO的特性,例如对核酸酶的抗性、跨生物膜的渗透性、溶解度、稳定性、或者药代动力学和药效学特性的调节。例如,核苷酸上的修饰可以包括但不限于LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基及其组合。预期在一个实施方案中可以排除这些修饰中的一个或更多个。

[0073] 提供了涉及反义核酸、化学修饰和治疗用途的专利,例如美国专利No.5,898,031涉及经化学修饰的含有RNA的治疗性化合物,以及美国专利No.6,107,094涉及使用这些化合物作为治疗剂的方法。美国专利No.7,432,250涉及通过施用单链经化学修饰的RNA样化合物来治疗患者的方法;以及美国专利No.7,432,249涉及含有单链经化学修饰的RNA样化合物的药物组合物。美国专利No.7,629,321涉及使用具有多个RNA核苷和至少一个化学修饰的单链寡核苷酸来切割靶mRNA的方法。本段中列出的每一个专利都通过引用以其整体并入本文中。

[0074] a. 经修饰的碱基

[0075] 治疗性核酸可包括天然(即A、G、U、C或T)或经修饰的(例如7-脱氮鸟苷、肌苷等)碱基。碱基的修饰包括经修饰的碱基(或经修饰的核苷或经修饰的核苷酸)的并入,该经修饰的碱基是存在于核糖核酸(即A、C、G和U)和脱氧核糖核酸(即A、C、G和T)中的标准碱基、糖和/或磷酸骨架化学结构的变化形式。包括在该范围内的是例如:Gm(2'-甲氧基鸟苷酸)、Am(2'-甲氧基腺苷酸)、Cf(2'-氟胞苷酸)、Uf(2'-氟尿苷酸)、Ar(核糖腺苷酸)。适配体还可以包括胞嘧啶或任何胞嘧啶相关碱基,包括5-甲基胞嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、

5-羟甲基胞嘧啶、2-硫代胞嘧啶、5-卤代胞嘧啶(例如,5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-氯胞嘧啶和5-碘胞嘧啶)、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、5-三氟甲基胞嘧啶、N<sub>4</sub>,N<sub>4</sub>-乙醇胞嘧啶、吩噻嗪胞苷、吩噻嗪胞苷、呋唑胞苷或吡啶吡啶胞苷。适配体还可包括鸟嘌呤或任何鸟嘌呤相关碱基,包括6-甲基鸟嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、6-丙基鸟嘌呤、8-卤代鸟嘌呤(例如,8-氟鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤和8-碘鸟嘌呤)、8-氨基鸟嘌呤、8-巯基鸟嘌呤、8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或3-脱氮鸟嘌呤。适配体还可以进一步包括腺嘌呤或任何腺嘌呤相关碱基,包括6-甲基腺嘌呤、N<sub>6</sub>-异戊烯基腺嘌呤、N<sub>6</sub>-甲基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-N<sub>6</sub>-异戊烯基腺嘌呤、8-卤代腺嘌呤(例如,8-氟腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-氯腺嘌呤和8-碘腺嘌呤)、8-氨基腺嘌呤、8-巯基腺嘌呤、8-硫代烷基腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-卤代腺嘌呤(例如,2-氟腺嘌呤、2-溴腺嘌呤、2-氯腺嘌呤和2-碘腺嘌呤)、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤或3-脱氮腺嘌呤。还包括尿嘧啶或任何尿嘧啶相关碱基,包括5-卤代尿嘧啶(例如,5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶)、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、假尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-偶氮嘧啶或4-硫代尿嘧啶。

[0076] 本领域中已知的其他经修饰的碱基变体的一些实例包括但不限于,例如,4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、2'-甲氧基胞苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿苷、二氢尿苷、2'-0-甲基假尿苷、b-D-半乳糖基腺苷、肌苷、N<sub>6</sub>-异戊烯基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基假尿苷、1-甲基鸟苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、3-甲基胞苷、5-甲基胞苷、N<sub>6</sub>-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷、b-D-甘露糖基腺苷、5-甲氧基羰基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、2-甲硫基-N<sub>6</sub>-异戊烯基腺苷、N-((9-b-D-呋喃核糖基-2-甲基硫代嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、N-((9-b-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰基)苏氨酸、尿苷-5-氧基乙酸甲基酯、尿苷-5-氧基乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿苷、腺苷、2-硫代胞苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-甲基尿苷、N-((9-b-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、2'-0-甲基-5-甲基尿苷、2'-0-甲基尿苷和怀丁苷(wybutosine)、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷。

[0077] 还包括在美国专利No.3,687,808、3,687,808、4,845,205、5,130,302、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,594,121、5,596,091、5,614,617、5,645,985、5,830,653、5,763,588、6,005,096和5,681,941中描述的经修饰核碱基,其各自通过引用以其整体并入本文中。

[0078] b. 经修饰的糖

[0079] 用于ASO的经修饰的糖部分在本领域中是公知的,并且在例如美国专利No.9,045,754中进行了描述,其通过引用以其整体并入本文中。经修饰的糖可用于改变(通常是提高)

ASO对其靶标的亲和力和/或提高核酸酶抗性。例如,在一些实施方案中,可以通过在ASO的核苷亚基中并入取代基来提高ASO对其靶标的结合亲和力。在一些实施方案中,取代基是T取代基,取代基位于ASO的核苷亚基的呋喃戊糖部分的2'位置处。取代基包括但不限于氟、烷氧基、氨基烷氧基、烯丙基氧基、咪唑基烷氧基和聚乙二醇。烷氧基和氨基烷氧基通常包括低级烷基,特别是C1至C9烷基。在一个具体实施方案中,2'取代基是2'-O-甲基。聚乙二醇具有 $(O-CH_2-CH_2)_n-O-$ 烷基结构。在一个具体实施方案中,取代基是式 $(-O-CH_2-CH_2)_n-O-$ 烷基的聚乙二醇取代基,其中 $n=1$ 且烷基 $=CH_3$ 。已显示这种修饰提高了寡核苷酸对其靶标的亲和力和寡核苷酸的核酸酶抗性二者。参见以上引用的美国专利No. 7,629,321。用于提高结合亲和力的另一个特别有用的2'-取代基是2'-氟基。

[0080] 本领域中已知的经修饰的核苷和核苷酸糖骨架变体的一些实例包括但不限于具有例如2'核糖基取代基的那些,所述2'核糖基取代基例如F、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、ON<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、O(C1至10烷基)、O(C2至10烯基)、O(C2至10炔基)、S(C1至10烷基)、S(C2至10烯基)、S(C2至10炔基)、NH(C1至10烷基)、NH(C2至10烯基)、NH(C2至10炔基)和O-烷基-O-烷基。期望的2'核糖基取代基包括2'-甲氧基(2'-OCH<sub>3</sub>)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、2'-O-烯丙基(2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>)和2'-氟(2'-F)。2'-取代基可以在阿拉伯糖(上)位或核糖(下)位。这些变体中的一个或多个可以从本公开内容的一些实施方案中排除。

[0081] 本领域中已知且可用于本公开内容的ASO的另一类经修饰的ASO在核糖部分的2'位置处含有烷基修饰。开发这些ASO以提高与靶mRNA的结合亲和力和杂交稳定性,并且以提高ASO的核酸酶抗性。在这一类别中,最常用的ASO是2'-O-甲基(2'-OME)和2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)ASO。具有这种类型的修饰的ASO不能激活RNase H。因此,为了诱导RNase H激活,已开发出嵌合的ASO,在其中由硫代磷酸酯脱氧核糖核心组成的中央间隙(central gap)区域侧接有核酸酶抗性臂,例如2'-OME或2'-MOE,其具有更强的核酸酶抗性。结果产生了“间隔聚体(gapmer)”,在其中RNase H可以位于中央间隙并激活靶标特异性mRNA降解,而臂阻止ASO降解。与第一类经修饰的ASO相比,该类别的ASO具有对mRNA更高的亲和力,显示出更好的组织吸收,并且具有提高的对核酸酶的抗性,更长的体内半衰期和更小的毒性。

[0082] 本领域中已知且可用于本公开内容的ASO的另一类ASO包含呋喃糖环的修饰以及磷酸酯键联、核糖部分或核苷酸的修饰。这些修饰被设计为改善ASO的核酸酶稳定性、靶标亲和力和药代动力学谱。第三类别的ASO的常见实例是锁核酸(Locked nucleic acid, LNA)、肽核酸(Peptide nucleic acid, PNA)和吗啉代氨基磷酸酯(MF),该类别的ASO在生物流体中更稳定,因为其对通过核酸酶和肽酶进行的降解具有高抗性。该类别的ASO还表现出与mRNA的强杂交亲和力。此外,PNA识别双链DNA,并能够通过染色体双链体DNA的链侵入来调节基因表达或诱导突变。该类别的ASO也不会激活RNase H,而是依赖空间阻碍核糖体机制来导致翻译阻滞。该类别的ASO不与血清蛋白结合,因为其不带电荷。电荷的缺乏降低了非特异性相互作用的几率,但提高了从身体清除的速率。其静电中性骨架可降低溶解度并使摄取更困难。

[0083] 优选的经修饰糖的代表性列表包括但不限于:双环经修饰的糖(BNA的),包括亚甲基氧基(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNA和亚乙基氧基(4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'桥)BNA;经取代的糖,尤其是具有

2'-F、2'-OCH<sub>3</sub>或2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>取代基的2'-取代的糖；和4'-硫修饰的糖。糖也可以用糖模拟基团等替换。用于制备经修饰糖的方法是本领域中技术人员所公知的。教导这样的经修饰糖的制备的一些代表性专利和公开包括但不限于美国专利No.4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747、5,700,920、6,531,584、和6,600,032；以及WO 2005/121371。

#### [0084] c. 经修饰的核苷酸间键联

[0085] 核酸治疗剂可另外包含至少一种硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联修饰可以发生在有义链或反义链或两者(在包括有义链的核酸治疗剂中)在链的任何位置处的任何核苷酸上。例如,核苷酸间键联修饰可发生在有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个核苷酸间键联修饰可在有义链或反义链上以交替模式发生;或者有义链或反义链可包含交替模式的核苷酸间键联修饰两者。有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以与反义链的相同或不同,并且有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以相对于在反义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式具有偏移。

[0086] 在某些实施方案中,本公开内容的ASO包含一个或更多个通过磷键联连接的核苷亚基,所述磷键联包括磷酸二酯、硫代磷酸酯、3'-(或-5')脱氧-3'-(或-5')硫代-硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、3'-(或-5')脱氧次膦酸酯、硼代磷酸酯、3'-(或-5')氨基氨基磷酸酯、膦酸氢酯、硼代磷酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯磷键联。在一些实施方案中,本公开内容的ASO包含通过碳酸酯、氨基甲酸酯、甲硅烷基、硫、磺酸酯、磺酰胺、甲缩醛、硫代甲乙醚、肟、亚甲基亚氨基、亚甲基甲基亚氨基、亚甲基肼、亚甲基二甲基肼和亚甲基氧基甲基亚氨基键联连接的核苷亚基。

[0087] 例如,本领域中所述的并且可用于本公开内容的ASO的一类经修饰的ASO是在ASO的磷酸基团中具有一个被硫基团(硫代磷酸酯)、甲基(甲基磷酸酯)或胺基团(氨基磷酸酯)替代的非桥联氧原子的ASO。与磷酸二酯寡核苷酸相比,这些ASO具有对核酸酶的更大的抗性和更长的血浆半衰期。这些ASO能够激活RNase H,携带有利于其递送至细胞的负电荷,并具有合适的药代动力学。在这些修饰中,硫代磷酸酯修饰使用最广泛。例如,FDA批准的ASO药物Vitravene以及临床试验中的大多数其他ASO药物都是硫代磷酸酯ASO。

[0088] 另外,核苷酸中的碱基可以通过除磷酸二酯键以外的键联连接,只要所述键联不干扰杂交即可。因此,抑制性核酸可以是肽核酸,其中成分碱基通过肽键而不是磷酸二酯键连接。抑制性核酸可以通过使用已知方法将RNA转化为cDNA来制备(参见例如Ausubel et.al., Current Protocols in Molecular Biology Wiley 1999)。抑制性核酸也可以是cRNA(参见,例如, Park et.al., (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 325 (4): 1346-52)。

#### [0089] B. 小干扰RNA

[0090] siRNA(例如, siNA)在本领域中是公知的。例如, siRNA和双链RNA已在美国专利No. 6,506,559和6,573,099以及美国专利申请2003/0051263、2003/0055020、2004/0265839、2002/0168707、2003/0159161和2004/0064842中进行了描述,其全部通过引用以其整体并入本文中。

[0091] 在siRNA中,核酸的组分不需要全部是相同类型或同质的(例如, siRNA可以包含核

苷酸和核酸或核苷酸类似物)。通常,siRNA形成双链结构;双链结构可以由部分或完全互补的两个单独的核酸产生。在本公开内容的某些实施方案中,siRNA可仅包含单一核酸(多核苷酸)或核酸类似物并且通过与自身互补(例如,形成发夹环)形成双链结构。siRNA的双链结构可以包含、至少包含或至多包含16、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多个连续的核碱基,包括其中的所有范围和值。siRNA可包含与互补核酸(其可以是同一核酸的另一部分或单独的互补核酸)杂交以形成双链结构的17至35个连续核碱基、18至30个连续核碱基、19至25个核碱基、20至23个连续核碱基、20至22个连续核碱基或21个连续核碱基。

[0092] 可用于实践本公开内容的方法的本公开内容的药剂包括但不限于siRNA。通常来说,双链RNA(double-stranded RNA,dsRNA)(在本文中可替代地称为小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA))的引入诱导了强效且特异性的基因沉默,这种一种被称为RNA干扰或RNAi的现象。RNA干扰被称为“共抑制”、“转录后基因沉默”、“有义抑制”和“压制(quelling)”。RNAi是有吸引力的生物技术工具,因为其提供了用于敲除特定基因活性的方式。

[0093] 在设计RNAi时需要考虑数种因素,例如siRNA的性质、沉默作用的持久性以及递送系统的选择。为了产生RNAi作用,引入到生物体中的siRNA通常会包含外显子序列。此外,RNAi过程是同源依赖性,因此必须仔细选择序列以使基因特异性最大化,同时使同源序列而不是基因特异性序列之间的交叉干扰可能性最小化。优选地,siRNA在siRNA的序列和待抑制基因序列之间显示出或表现出大于80%、85%、90%、95%、98%或甚至100%的同一性或其中可推导出的任何范围和值。与靶基因具有小于约80%同一性的序列实质上没那么有效。因此,siRNA与待抑制基因之间的同源性越大,不相关基因的表达就越不太可能会受到影响。

[0094] 另外,siRNA的尺寸是重要的考虑因素。在一些实施方案中,本公开内容涉及siRNA分子,其包含、至少包含或至多包含19至25个(或其中可推导出的任何范围或值)核苷酸,并且能够调节基因表达。在本公开内容的上下文中,在一些实施方案中,siRNA的长度小于500、200、100、50或25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA的长度为约19个核苷酸至约25个核苷酸。

[0095] 靶基因通常意指包含编码多肽的区域或者调节对多肽表达重要的复制、转录、或翻译或其他过程的多核苷酸区域的多核苷酸;或者包含编码多肽的区域和与之可操作地连接的调节表达的区域二者的多核苷酸。在细胞中表达的任何基因都可被靶向。优选地,靶基因是涉及对疾病重要或作为研究对象特别令人感兴趣的细胞活动的进展或与其相关的基因。

[0096] siRNA可从商业来源、天然来源获得,或者可使用本领域普通技术人员公知的许多技术中的任一种来合成。例如,预设计的siRNA的一种商业来源是Ambion®,Austin,Tex。另一种是Qiagen®(Valencia,Calif.)。可应用于本公开内容的组合物和方法中的抑制性核酸可以通过任何来源已发现为目的蛋白质的经验证的下调剂的任何核酸序列。无需过度实验并使用本公开内容的公开内容,另外的siRNA可被设计并用于实施本公开内容的方法是应理解的。

[0097] siRNA还可包含一个或更多个核苷酸的改变。这样的改变可包括添加非核苷酸材料,例如添加至19至25个核苷酸的RNA的末端或添加至内部(在RNA的一个或更多个核苷酸处)。在某些方面中, RNA分子包含3'-羟基。本公开内容的RNA分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸,包括非天然存在的核苷酸或脱氧核糖核苷酸。双链寡核苷酸可包含经修饰骨架,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或本领域已知的其他经修饰骨架,或者可包含非天然的核苷间键联。siRNA的另外的修饰(例如,2'-O-甲基核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、5-C-甲基核苷酸、一个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键联、以及反向脱氧无碱基(deoxyabasic)残基并入)可见于美国申请公开2004/0019001和美国专利No.6,673,611(其各自通过引用以其整体并入)。上述所有这样的改变的核酸或RNA被统称为经修饰的siRNA。

[0098] 因为已知外排体包含DICER和活性RNA加工RISC复合物(参见PCT公开WO 2014/152622,其通过引用以其整体并入本文),所以转染到外排体中的shRNA可成熟为在外排体本身内结合RISC-复合物的siRNA。或者,成熟的siRNA本身可转染到外排体或脂质体中。如果已通过任何来源发现了任何抑制性核酸是目的蛋白质的经验证的下调剂,则这样的抑制性核酸均可应用于本公开内容的组合物和方法中。

### [0099] III. 疾病的治疗

[0100] 包括人在内的哺乳动物的许多严重疾病与纤维化有关。如本文所用,“纤维化”包括涉及形成纤维组织的任何病症(无论这样的形成是期望的还是不期望的)。这样的病症包括但不限于:结缔组织炎症、纤维瘤形成(纤维瘤病)、纤维化(包括肺纤维化和肝纤维化)、弹力纤维增生症(心内膜纤维)、纤维肌病形成、纤维瘤形成、纤维性瘤形成、纤维黏液瘤形成和纤维囊炎(包括囊性纤维化)。

[0101] 在一些实施方案中,在动物中可使用STAT3表达抑制剂治疗的纤维化包括但不限于肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤。在一些实施方案中,可治疗的纤维化包括但不限于肺纤维化(例如,肺部纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、辐射诱发的肺损伤或由用于癌症的治疗引起的辐射诱发的肺损伤)、皮肤纤维化、肾纤维化、肝纤维化(例如,肝硬化)、胃肠纤维化(例如,胃肠道的纤维化、与胃肠炎症相关的纤维化、与炎性肠病相关的纤维化、与溃疡性结肠炎相关的纤维化、与克罗恩病(Crohn's disease)相关的纤维化、肠纤维化、小肠纤维化、髂骨纤维化、盲肠纤维化或结肠纤维化)、心脏纤维化(例如,心房纤维化、心内膜心肌纤维化或心肌梗塞)、脑纤维化(例如,胶质瘢痕),或其他形式的纤维化,包括但不限于动脉僵硬、关节纤维化(例如,膝盖、肩部或其他关节)、克罗恩病(例如,肠)、迪皮特朗挛缩(dupuytren's contracture)(例如手或手指)、瘢痕疙瘩(例如,皮肤)、纵隔纤维化(例如纵隔软组织)、骨髓纤维化(例如,骨髓)、佩伦涅病(peyronie's disease)(例如,阴茎)、肾源性全身纤维化(例如,皮肤)、进行性大块纤维化(例如,煤工尘肺的并发症)、腹膜后纤维化(例如,腹膜后腔的软组织)、硬皮病/系统性硬化症(例如,皮肤或肺)、黏连性囊炎(例如,肩部)或其他器官纤维化。

[0102] 可治疗的动物包括但不限于哺乳动物、啮齿动物、灵长类动物、猴(例如,猕猴、恒河猴、猪尾猕猴)、人、犬科动物、猫科动物、猪、禽类(例如,鸡)、牛、小鼠、兔和大鼠。如本文所用,术语“个体”、“对象”和“患者”可互换使用,并且可指人和非人对象二者。在一些情况下,动物需要治疗(例如,通过表现出疾病或纤维化的迹象)。

[0103] 如本文所用,术语“治疗”(treating)(及其变化形式,例如“治疗”(treatment))应在其最广泛的背景下考虑。特别是,术语“治疗”并不一定意味着对动物进行治疗直到完全康复。因此,“治疗”包括症状的改善、与病症相关的症状的缓解或与病症相关的作用、病症的严重程度的降低、或者预防、预防性地改善症状或以其他方式降低发生特定病症的风险。如本文所用,提及“治疗”动物包括但不限于预防性治疗和治疗性治疗。本文所述的任何组合物(例如药物组合物)可用于治疗动物。

[0104] 关于治疗纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤),治疗可包括但不限于预防性治疗和治疗性治疗。因此,治疗可包括但不限于:预防纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤);降低纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的风险;改善或缓解纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的症状;引发针对纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的身体响应;抑制纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的发展或进展;抑制或预防与纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)相关的症状的发作;降低纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的严重程度;导致纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)或与纤维化相关的一种或更多种症状的消退(例如,纤维化量的减少);导致纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的缓解;或者预防纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)的复发。在一些实施方案中,治疗不包括纤维化的预防性治疗(例如,预防或改善未来的纤维化)。

[0105] 可使用任何合适的施用方法(例如本文所公开的那些)和使用任何合适量的STAT3表达抑制剂(例如,siRNA或ASO)治疗动物(例如,人)。在一些实施方案中,治疗方法包括治疗动物的纤维化(例如,肝纤维化、肺部纤维化、肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化(IPF)或辐射诱发的肺损伤)。本公开内容的一些实施方案包括用包含一种或更多种STAT3表达抑制剂(例如,siRNA或ASO)的组合物(例如,药物组合物)来治疗对象(例如,动物,例如人或灵长类动物)的方法,其包括一种或更多种这样的组合物的一次或更多次施用;如果存在多于一次的施用,则组合物可相同或不同。

[0106] 使用STAT3表达抑制剂的治疗可导致与STAT3活性相关(例如,受其调节)的一种或更多种基因的表达降低。在一些实施方案中,本公开内容的治疗降低了与STAT3活性相关的一种或更多种基因(包括例如Col1a1、Acta2、Col1a2和/或Vim)的表达。在一些实施方案中,本公开内容的治疗降低患者的靶细胞(例如,肝细胞)中Col1a1的表达。本公开内容的示例性靶细胞包括肝细胞,例如活化的肝星形细胞和 $\alpha$ SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞。

[0107] 在一些实施方案中,任选地包括其他纤维化治疗,并且其可与本文所述的本发明的治疗一起使用。其他纤维化治疗可包括任何已知的适合治疗纤维化的纤维化治疗。已知的纤维化治疗的一些实例包括但不限于施用:抗生素(例如,青霉素、甲氧西林

(methicillin)、苯唑西林(oxacillin)、萘夫西林(nafcillin)、羧苄西林(cabencicillin)、替卡西林(ticarcillin)、哌拉西林(piperacillin)、美洛西林(mezlocillin)、阿洛西林(azlocillin)、替卡西林克拉维酸、哌拉西林他唑巴坦(piperacillin tazobactam)、头孢菌素、头孢氨苄(cephalexin)、头孢地尼(cefdinir)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢克洛(cefaclor)、头孢吡肟(cefepime)、磺胺(sulfa)、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、红霉素/磺胺异噁唑、大环内酯类、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、四环素类、四环素、多西环素、米诺环素、替加环素(tigecycline)、万古霉素、亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meripenem)、甲磺酸黏菌素/黏菌素、氨基糖苷类、妥布霉素、阿米卡星(amikacin)、庆大霉素、喹诺酮类、氨曲南(aztreonam)或利奈唑胺(linezolid)、抗炎药(例如,NSAID、阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、皮质类固醇、皮质醇、皮质酮、可的松(cortisone)或醛固酮)、支气管扩张剂(例如,沙丁胺醇(albuterol)或盐酸左沙丁胺醇)、黏液降黏剂(mucus thinner)(例如,高渗盐水或Domase alfa)和抗纤维化药物(例如,吡非尼酮(pirfenidone)、尼达尼布(nintedanib)、N-乙酰基半胱氨酸、依伐卡托(ivacaftor)或鲁玛卡托(lumacaftor)/依伐卡托)。其他纤维化治疗还可包括施用非药物呼吸治疗,例如但不限于气道清除技术(例如,体位引流和胸部叩诊、运动、呼吸练习,或者使用机械设备例如高频胸部加压背心或呼气正压治疗)。其他纤维化治疗还可包括器官移植(例如,肺、皮肤、肾、肝、心脏、小肠或结肠)。预期在本公开内容的一些实施方案中可排除一种或更多种其他的纤维化治疗。

[0108] 在一些实施方案中,阿片(opioid)受体抑制剂纳曲酮(naltrexone)、吡非尼酮、尼达尼布或其组合的施用可用作治疗方案的一部分(即,作为另外的纤维化治疗);阿片受体抑制剂纳曲酮、吡非尼酮、尼达尼布或其组合的施用可包括分开施用(即,在与STAT3表达抑制剂分开的组合物中)或可将其添加至包含STAT3表达抑制剂的组合物。

[0109] 在一些实施方案中,另外的任选治疗(例如,作为另外的纤维化治疗)还可包括手术干预、激素治疗、免疫治疗和辅助系统治疗中的一种或更多种。预期在本公开内容的一些实施方案中可排除一种或更多种另外的任选治疗。

[0110] 对于疾病的治疗,治疗性组合物的合适剂量将取决于如上所定义的待治疗的疾病类型、疾病的严重程度和病程、患者的临床史和对药剂的响应,以及主治医师的酌处权。该药剂适合以一次或在系列治疗中施用于患者。

[0111] 可以以有效地实现所期望效果的组合量提供治疗性和预防性方法和组合物。可使组织、肿瘤或细胞与包含一种或更多种药剂的一种或更多种组合物或药理制剂接触,或者通过使组织、肿瘤和/或细胞与两种或更多种不同的组合物或制剂接触。同样,预期可将这样的组合治疗与化学治疗、放射治疗、手术治疗或免疫治疗结合使用。

[0112] 组合施用可包括以同一剂型同时施用两种或更多种药剂,以分开的剂型同时施用,以及分开施用。即,可将主题治疗性组合物与另外的治疗剂一起配制在同一剂型中并同时施用。或者,可同时施用主题治疗性组合物和另外的治疗剂,其中两种药剂存在于分开的制剂中。在另一替代方案中,可在施用所述治疗剂之后紧接着施用另外的治疗剂,或者反之亦然。在分开施用方案中,主题治疗性组合物和另外的治疗剂可相距数分钟、或相距数小时或相距数天施用。

#### [0113] IV. 药物组合物

[0114] 预期表达或包含治疗剂的外排体可全身或局部地施用以增强端粒酶活性。其可静脉内、鞘内和/或腹膜内施用。其可单独地或与第二药物组合施用。

[0115] 无意于本发明受到治疗制剂的特定性质的限制。例如,这样的组合物可与生理上可耐受的液体、凝胶、固体载体、稀释剂或赋形剂一起提供于制剂中。可将这些治疗制剂以类似于其他治疗剂的方式施用于哺乳动物,例如家养动物以用于兽医用途,以及人中以用于临床用途。一般而言,治疗效力所需的剂量将根据用途类型和施用方式以及个体对象的特定需求而变化。

[0116] 在预期临床应用的情况下,可能有必要以适于目的应用的形式制备包含外排体的药物组合物。通常来说,药物组合物可包含有效量的溶解或分散在可药用载体中的一种或更多种外排体和/或另外的药剂。短语“可药用或药理学上可接受的”是指当施用于动物例如人(视情况而定)时,不产生不良、变应性或其他不利的反应的分子实体和组合物。根据本公开内容,包含如本文中公开的外排体或者另外的活性成分的药物组合物的制备对本领域技术人员是已知的,如由Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990所例示,其通过引用并入本文。此外,对于动物(例如,人)施用,应理解,制剂应符合如由FDA生物标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0117] 另外地,根据本公开内容的某些方面,适合于施用的组合物可在具有或不具有惰性稀释剂的可药用载体中提供。本文中使用的“可药用载体”包括任何和所有水性溶剂(例如,水、醇/水溶液、乙醇、盐溶液、肠胃外载剂,例如氯化钠、林格右旋糖(Ringer's dextrose)等);非水性溶剂(例如,脂肪、油剂、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),植物油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯);脂质;脂质体;分散介质;包衣(例如,卵磷脂);表面活性剂;抗氧化剂;防腐剂(例如,抗细菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体、对羟基苯甲酸酯(例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞,或其组合);等张剂(例如,糖和氯化钠);吸收延迟剂(例如,单硬脂酸铝和明胶);盐;药物;药物稳定剂;凝胶;树脂;填充剂;结合剂;赋形剂;崩解剂;润滑剂;甜味剂;矫味剂;染料;流体和营养补充剂;例如材料及其组合,如本领域普通技术人员已知的。载体应是可吸收的,并且包括液体、半固体(即糊状物(paste))或固体载体。另外,如果期望的话,该组合物可包含少量的助剂物质,例如润湿剂或乳化剂、稳定剂或pH缓冲剂。根据公知的参数调节药物组合物中多种组分的pH和确切浓度。可例如通过使用包衣,例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,来维持合适的流动性。

[0118] 可药用载体特别地配制成用于向人施用,尽管在某些实施方案中可能期望使用配制成用于向非人动物施用但对于向人施用是不可接受的(例如,由于政府法规)的可药用载体。除非任何常规载体与活性成分不相容(例如,不利于接受体或其中所含组合物的治疗效力),否则考虑将其用于治疗性组合物或药物组合物中。根据本公开内容的某些方面,以任何方便和可行的方式,即通过溶液剂、混悬剂、乳化、混合、包封、吸收等将组合物与载体组合。这样的操作对于本领域技术人员而言是常规的。

[0119] 本公开内容的某些实施方案可包括不同类型的载体,这取决于其是以固体、液体还是气雾剂形式施用,以及施用途径(例如注射)是否需要无菌。如本领域普通技术人员已

知的,所述组合物可如下施用:静脉内、皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、肌内、皮下、经黏膜、经口、表面、局部、通过吸入(例如,气雾剂吸入)、通过注射、通过输注、通过持续输注、通过直接局部灌注浸浴靶细胞、通过导管、通过灌洗、在脂质组合物(例如,脂质体)中、或者通过其他方法或前述方法的任意组合(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, 其通过引用并入本文)。

[0120] 外排体可配制成为用于肠胃外施用,例如配制成为用于通过静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。通常来说,这样的组合物可制备成液体溶液剂或混悬剂;也可制备成适用于在注射之前添加液体之后制备溶液剂或混悬剂的固体形式;并且制剂还可被乳化。

[0121] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散剂;包含芝麻油、花生油、或水性丙二醇的制剂;以及用于临时制备无菌可注射溶液剂或分散剂的无菌散剂。在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且必须是达到其可容易地注射之程度的流体。其在制造和储存条件下也应该是稳定的,并且必须防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0122] 配制之后,溶液将以与剂量制剂相容的方式并以例如治疗有效的量施用。制剂易于以多种剂型施用,例如,配制成为用于肠胃外施用,例如,可注射溶液剂,或用于递送至肺的气雾剂、或者配制成为用于消化施用,例如药物释放胶囊等。

[0123] 术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于对象的物理上离散的单元,每个单位含有预定量的治疗性组合物,所述预定量经计算产生与其施用(即,合适的途径和治疗方案)相关的以上讨论的期望响应。根据治疗数量和单位剂量二者,待施用的量取决于所期望的效果。施用于患者或对象的本公开内容的组合物的实际剂量量可通过物理和生理因素(例如对象的体重、年龄、健康状况和性别、所治疗疾病的类型、疾病渗透程度、先前或同时的治疗干预、患者的特发病、施用途径、以及特定治疗物质的效力、稳定性和毒性)来确定。例如,剂量还可包含每次施用约 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $1000\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ (该这样的范围包括干预剂量)或更多,以及其中可推导出的任何范围。在从本文中所列数字可推导出的范围的一些非限制性实例中,可施用约 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ ,约 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $500\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 等的范围。作为另一个实例,剂量还可包含每次施用约10亿至约5000亿个外排体(该这样的范围包括干预剂量)或更多,以及其中可推导出的任何范围。在从本文中所列数字可推导出的范围的一些非限制性实例中,可施用约100万个外排体至约5000亿个外排体、约500万个外排体至约2500亿个外排体等的范围。在一个实例中,剂量可包含在5mL体积中约1500亿个外排体,并且可将这样的剂量施用于重70kg的人患者。在任何事件中,负责施用的医疗人员将确定组合物中活性成分的浓度和个体对象的合适剂量。

[0124] 施用于动物患者的组合物的实际剂量量可通过物理和生理因素(例如体重、病症严重程度、所治疗疾病的类型、先前或同时的治疗干预、患者的特发病、以及施用途径)来确定。取决于剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据对象的响应而变化。在任何事件中,负责施用的医疗人员将确定组合物中活性成分的浓度和个体对象的合适剂量。

[0125] 在某些实施方案中,药物组合物可包含例如至少或至多约0.1%的活性化合物。在另一些实施方案中,活性化合物可包含单位重量的约2%至约75%,或例如约25%至约60%,以及其中可推导出的任何范围。自然地,每种治疗上有用的组合物中活性化合物的量可以以这样的方式制备:在任何给定的单位剂量的化合物中将获得合适的剂量。制备这样

的药物制剂的本领域技术人员将考虑以下因素,例如溶解度、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保存期限以及其他药理学考虑因素,并且因此,可期望多种剂量和治疗方案。

[0126] 在另一些非限制性实例中,剂量还可包含每次施用约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重、至约1000毫克/kg/体重或更多,以及其中可推导出的任何范围。在从本文中所述数字可推导出的范围的一些非限制性实例中,基于上述数字,可施用约5毫克/kg/体重至约100毫克/kg/体重,约5微克/kg/体重至约500毫克/kg/体重等的范围。

#### [0127] V. 试剂盒和诊断

[0128] 在本公开内容的多个方面中,设想了包含从体液或组织培养基中纯化外排体所必需组分的试剂盒。在另一些方面中,设想了包含分离外排体并将其用于治疗性核酸、治疗性蛋白质或抑制性RNA进行转染所必需组分的试剂盒。该试剂盒可包含一个或更多个密封的小瓶,其中包含任何这样的组分。在一些实施方案中,试剂盒还可包含合适的容器装置,所述容器是不会与试剂盒的组分反应的容器,例如eppendorf管、测定板、注射器、瓶或管。容器可由可灭菌材料(例如塑料或玻璃)制成。试剂盒还可包含说明单,其概述了本文中所阐述方法的程序性步骤,并且将遵循与本文中所述或本领域普通技术人员已知的基本上相同的程序。指令信息可在包含机器可读指令的计算机可读介质中,当使用计算机执行该机器可读指令时,导致显示从样品中纯化外排体并用治疗性载体转染外排体的真实或虚拟程序。

#### [0129] VI. 实施例

[0130] 包括以下实施例以示出本发明的某些实施方案。本领域技术人员应理解,以下实施例中公开的技术表示本发明人发现的在本发明的实践中运行良好的技术,并因此可认为构成用于其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可在所公开的一些具体实施方案中进行许多改变,并且仍然获得相似或类似的结果。

##### [0131] 实施例1-外排体向CC14诱导的肝纤维化小鼠模型的肝的定位

[0132] 以每两周i.p.注射CCl<sub>4</sub>持续六周来在Balb/c成年小鼠中诱导肝纤维化。向有和没有肝纤维化二者的小鼠静脉内施用10<sup>9</sup>个经染料标记的外排体或仅染料。在施用之后三小时,对小鼠实施安乐死。使用IVIS成像对给予经DiR标记的外排体的小鼠进行测定(图1)。使用共聚焦显微术对给予经PHK67标记的外排体的小鼠进行测定。在健康和纤维化小鼠二者中,外排体定位至肝;然而,相对于健康小鼠,在纤维化小鼠中的定位水平提高。

##### [0133] 实施例2-施用负载有STAT3抑制性RNA的外排体之后肝纤维化的降低

[0134] 以每两周i.p.注射CCl<sub>4</sub>持续六周来在C57Bl6成年小鼠中诱导肝纤维化。然后每48小时施用MSC来源的外排体(15亿个外排体/剂量,其包含1.5μg siRNA或ASO/注射)。外排体包含无规(scrambled) siRNA、STAT3 siRNA、未经修饰的STAT3反义寡核苷酸、经修饰的无规反义寡核苷酸或经修饰的STAT3反义寡核苷酸。处理之后,对小鼠实施安乐死,将它们的肝切片并进行处理以用于苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色,并对染色的切片成像(图2A)。将纤维化水平量化(图2B)。结果显示,STAT3 siRNA、未经修饰的STAT3反义

寡核苷酸以及经修饰的STAT3反义寡核苷酸均降低了纤维化水平。

[0135] 实施例3-施用负载有STAT3抑制性RNA的外排体之后肺纤维化的降低

[0136] 使用博来霉素(bleomycin)来在小鼠中诱导肺纤维化。然后每48小时施用MSC来源的外排体(20亿个外排体/剂量,其包含5 $\mu$ g siRNA或ASO/注射)。外排体包含STAT3 siRNA、未经修饰的STAT3反义寡核苷酸、经修饰的无规反义寡核苷酸或经修饰的STAT3反义寡核苷酸。处理之后,对小鼠实施安乐死,将它们的肺切片并进行处理以用于苏木精和伊红(H&E)染色,并对染色的切片成像(图3A)。将纤维化水平量化(图3B)。结果显示,STAT3 siRNA提供了纤维化水平的最大的降低。

[0137] 实施例4-肝纤维化中外排体介导的STAT3治疗性靶向

[0138] 结果

[0139] 为了确定负载有靶向STAT3的siRNA或ASO的iExosomes(经改造以递送核酸有效载荷的外排体)的效率,将从野生型(wild-type, WT)小鼠中分离的原代肝星形细胞(HSC)培养7天,这导致了HSC的自发活化(图4A)(Zhai et al., 2019; Lu et al., 2014; Mederacke et al., 2013)。HSC的活化的特征在于 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达(图4B)。与基于脂质的转染试剂(图5A和5B)相比, iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3处理</sup>以类似的效率显著降低了HSC中的Stat3 mRNA水平(图4C和4D)。

[0140] 之前报道了外源施用的外排体在小鼠中的向性(tropism)(Mendt et al., 2018; Kamerkar et al., 2017),其包括数个GI器官,例如胰腺和肝。本发明人确定了人间充质基质细胞(mesenchymal stromal cell, MSC)来源的外排体向健康小鼠的肝的向肝性(liver tropism)(图4C)。为了进一步研究外排体在纤维化组织中的生物分布,将经DiR标记的外排体腹腔内(i.p.)施用至由四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的纤维化肝和WT小鼠中。结果显示,在正常肝和胰腺中检测到与外排体相关的特异性积累信号,以及在肾、肠和脾中检测到较低量的信号(图4C)。然而,与健康的肝相比,纤维化肝表现出经DiR标记的外排体的更高的富集。此外,在i.p.注射经标记的iExosomes/siSTAT3/mASO STAT3之后(24小时之后),本发明人将经Alexa-Fluor 647(AF647)标记的siSTAT3或经修饰的ASO(modified ASO, mASO) STAT3电穿孔至外排体(iExo<sup>siRNA647-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO647-STAT3</sup>)中,并且结果显示经荧光标记的siRNA和ASO以比裸siRNA或ASO更高的比率在肝中积累(图4D至4F)。

[0141] 为了验证iExosomes在体内治疗肝纤维化的功能,对WT小鼠进行每周两次的CCl<sub>4</sub>i.p.注射以诱导慢性肝纤维化(图5D)。在诱导纤维化之后的第9天,还将小鼠用裸siRNA或ASO、或者iExo<sup>siRNA</sup>或iExo<sup>mASO</sup>处理(图5D)。具有靶向STAT3的siRNA或ASO的iExosomes以以下两种剂量施用:用1 $\mu$ g siRNA或ASO电穿孔的10亿个外排体(1 $\mu$ g/10亿个iExo);和用5 $\mu$ g siRNA或ASO电穿孔的20亿个外排体(5 $\mu$ g/20亿个iExo)。虽然siRNA靶向人和小鼠STAT3二者,但ASO被设计为靶向人STAT3并呈现为针对小鼠序列的3个核苷酸错配。ASO设计包括未经修饰的ASO(umASO)和经修饰的ASO(mASO, 参见方法)。对照包括未经处理的小鼠和用包含非靶向对照siRNA(siCtrl)或ASO(经修饰的无规[mASO Scrbl]或umASO STAT3)的外排体处理的小鼠。在用1 $\mu$ g/10亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和5 $\mu$ g/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理之后,使用siRNA或mASO靶向STAT3的iExosomes显著降低了纤维化肝中的Stat3表达(图6A和6B)。与单独的siRNA(siRNA-STAT3)或ASO(mASO-STAT3)相比,在5 $\mu$ g/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>下观察到了优越的效力(图6A和6B)。umASO在体内没有显

著抑制Stat3,这可能是由于在这种情况下稳定性降低,而mASO的增强的稳定性与Stat3的稳健靶向相关(图6A和6B)。siRNA靶向的iExosomes和mASO靶向的iExosomes二者在抑制纤维化肝中的Stat3表达方面显示出类似的效力(图6A和6B)。

[0142] 反复暴露于肝毒素CCl<sub>4</sub>导致显著的炎症和肝损伤,这驱动进行性纤维化以及激活的HSC或肌成纤维细胞的积累(Mederacke et al.,2013)。应用肝切片的天狼星红染色和胶原I染色以评估胞外基质(ECM)沉积。结果显示,在用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠中ECM显著减少,而在用1μg/10亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠中观察到纤维化适度减少(图6C至6H、图5D和5E)。通过用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理也显著抑制了I型胶原沉积(图6E至6H)。值得注意的是,与用单独的siRNA-STAT3或mASO-STAT3处理的小鼠相比,在用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠中,α-SMA(纤维化肝中活化的HSC(activated HSC,aHSC)的公认标志物(图4B))的表达模式被显著抑制(图6J),而在用1μg/10亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠中未观察到显著降低(图5H)。

[0143] 除了在转录水平下STAT3下调之外,与用siRNA-STAT3或mASO-STAT3处理相比,用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理还导致了I型胶原的α1链(Coll1a1)和平滑肌肌动蛋白(Acta2)的显著转录抑制(图7A至7D)。如通过丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)水平测量的,在用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠中,肝功能显著改善,并且在某种程度上用siRNA-STAT3或mASO-STAT3处理也是如此(图7E至7H)。ALT和AST二者水平降低至接近用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的健康对照小鼠的那些的水平(图7E至7H)。CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化的组织病理学评价显示出肝细胞变性、灶性桥接坏死和小叶结构的显著结构破坏(图7I至7K,未经处理组)。值得注意的是,与对照处理(包括用siRNA-STAT3或mASO-STAT3处理)相比,当向小鼠施用5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>时,肝细胞坏死和变性的百分比显著降低(图7I至7K)。当施用1μg/10亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>时,在小鼠中观察到肝组织病理学上的显著改善(图5I至5K)。iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>或iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理未导致对其他器官的可观察到的细胞毒性(图8A和8B)。

[0144] 为了确定iExosomes处理对靶细胞基因表达的影响,本发明人对来自经5μg/20亿个iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理的小鼠的整个肝进行了RNA测序。将每个实验组中的差异表达基因(Differentially expressed gene,DEG)绘制在热图中(图9A),并将给定基因的表达的显著变化定义为增加或减少的比率大于两倍和调整后的p值<0.05。热图和火山图表明,iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理,当与它们各自的对照相比时,导致了基因表达变化(图9A至9C)。来自iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>组的肝转录物分析显示出1,918个基因的表达提高和2,460个基因的表达降低,而iExo<sup>mASO-STAT3</sup>组中的肝转录物分析显示出2,140个基因的表达提高和2,021个基因的表达降低(图9B和9C)。在iExosomes处理之后,一组涉及STAT3信号传导的基因被抑制,包括SPP1和Thbs1(Arriazu et al.,2017;Breitkopf et al.,2005),其在肝纤维化的发展中起着至关重要的作用(图9D)。与肝纤维化中的STAT3信号传导相关的通常差异失调的基因与ECM沉积和重塑相关(图9E)。iExosomes处理抑制了包括Coll1a1、Acta2、Coll1a2和Vim在内的典型纤维化相关基因的表达(图9E),表明STAT3是肝纤维化的关键调节子。过表达分析(Over-representation analysis)表明DEG主要以ECM-受体相互作用途径

富集(图9F和9G),并且还表明下调的基因富集以用于涉及以下的途径:细胞色素P450对异生物物质的代谢,蛋白质消化和吸收,初级胆汁酸生物合成,亚油酸代谢和化学致癌作用(图9F和9G)。对于iExo<sup>siRNA-STAT3</sup>和iExo<sup>mASO-STAT3</sup>处理二者,观察到一组类似的被改变的下游途径(图9F和9G),并且其支持该数据集作为用于进一步研究肝纤维化中STAT3调节途径的有用工具。为了进一步研究肝纤维化中STAT3信号传导与靶向的ECM基因之间的关联,基于DEG构建了与STAT3mRNA和肝纤维化相关的ECM调节网络。如图9H中所示,生成的网络显示出24种ECM相关基因的连接。该网络分析将STAT3确定为针对ECM沉积的重要调节节点以用于未来的临床治疗。

[0145] 总之,这些研究支持之前关于STAT3在促进肝纤维化中在肝细胞和星形细胞中的关键作用的报道(Wang,Lafdil,Kong et al.,2011)。肝纤维化中的STAT3失调是复杂的,因为肝细胞中的保护功能和aHSC/肌成纤维细胞中的促纤维化(Chakraborty et al.,2017;Wang,Lafdil,Kong et al.,2011;Wang,Lafdil,Wang et al.,2011)。靶向STAT3的iExosomes方法的抗纤维化结果可反映aHSC/肌成纤维细胞的优先摄取(图5C)。这也与之前使用来自脂肪来源间充质干细胞的外排体的报道一致,这些报道示出了通过抑制STAT3表达的外排体miR-181-5p来防止肝纤维化(Qu et al.,2017)。尽管多种抑制剂在鼠中已显示出效力,但它们靶向STAT3的特异性仍有待验证(Beebe et al.,2018)。所公开的方法提供了基因靶向特异性并且可与另外的siRNA靶标组合使用。此外,外排体在用于肝癌的治疗性方法中的作用也已显现(Lou et al.,2020)。肝癌中转化的肝细胞依赖于STAT3表达(Wang,Lafdil,Wang et al.,2011;Jung et al.,2017),并且靶向STAT3的iExosomes也可在限制肝癌进展方面提供益处。之前关于胰腺癌的研究已经提出了开发具有靶向致癌Kras的siRNA的临床级外排体(Mendt et al.,2018;Kamerkar et al.,2017)。这支持了在肝纤维化中使用外排体抑制STAT3的临床应用潜力。

#### [0146] 方法

##### [0147] HSC分离和 $\alpha$ -SMA染色

[0148] 根据之前描述的方法(Vinas et al.,2003),从8周龄雌性Balb/c小鼠中分离小鼠原代HSC。将它们在包含20%FBS(Gemini)的高葡萄糖杜氏改良Eagle培养基(DMEM,Gibco)中培养。将经培养活化的原代HSC(在第7天)用Cy3- $\alpha$ -SMA抗体(Sigma,C6198,1:200)免疫染色过夜。使用Axiovert 200和AxioCam HRc相机(Zeiss)拍摄在200 $\times$ 放大率下的代表性图像。

##### [0149] 实时PCR分析

[0150] 使用TRIzol<sup>TM</sup>(Invitrogen,15596018)从肝组织中分离总RNA,并通过高容量cDNA反转录试剂盒(Life Technology)根据制造商的说明生成cDNA。使用SYBR Green PCR Master Mix进行定量RT-PCR。将靶基因的mRNA总量相对于GAPDH表达归一化。使用以下引物序列:

[0151] GAPDH正向5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3',反向5'-AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'。STAT3正向5'-AGAACCTCCAGGACGACTTTG-3',反向5'-TCACAATGCTTCTCCGCATCT-3';Colla1正向5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3',反向5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3';Acta2正向5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3',反向5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'。对 $\Delta$ Ct进行方差统计学分析。呈现倍数变化并将其相对于对照组归一化,将对照比较组设置为1。

[0152] 外排体的纯化和电穿孔

[0153] 骨髓来源的MSC获自德克萨斯大学MD安德森癌症中心细胞治疗实验室(Cell Therapy Laboratory at the University of Texas MD Anderson Cancer Center),并在补充有20%FBS、1%青霉素-链霉素(Corning)、1%L-谷氨酰胺(Corning)和1%非必需氨基酸(non-essential amino acid, NEAA, Gibco)的 $\alpha$ MEM(Corning)中培养。第4至6代MSC被用于外排体收集。根据我们建立的方案(Mendt et al., 2018; Kamerkar et al., 2017),将外排体通过差速离心方法纯化。简言之,使细胞生长至70%至80%汇合度,用1 $\times$  PBS (Corning)洗涤,并在无血清培养基(具有1%青霉素-链霉素、1%L-谷氨酰胺和1%NEAA的 $\alpha$  MEM)中培养48小时。收集上清液,以800x g离心5分钟,然后以2,000x g离心10分钟,并用0.2 $\mu$ m过滤器(Thermo Fisher)过滤。将经过滤的上清液在SW 32Ti转子(Beckman)中以100,000x g在4 $^{\circ}$ C下离心3小时。吸出上清液,并将沉淀物重悬在100 $\mu$ L的1 $\times$  PBS中。通过纳米粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA, NanoSight LM10, Malvern)确定外排体浓度和尺寸。将100亿个外排体的等分试样储存在-80 $^{\circ}$ C下直至使用。低剂量混合物包含100  $\mu$ l PlasmaLyte (Mediatech, BHL2B2544XH)中的10亿个总外排体(根据NTA)和1 $\mu$ g siRNA或反义寡聚物(ASO),而高剂量混合物包含100 $\mu$ l PlasmaLyte中的20亿个总外排体和5 $\mu$ g siRNA或ASO。将400 $\mu$ l的RNAi-外排体混合物装载到小池中,并随后在400V、125 $\mu$ F和 $\infty$ 欧姆下进行电穿孔。将小池立即转移至冰。siSTAT3序列:正义链5'-GUUGAAUUAUCAGCUUAAA-3' (SEQ ID NO:1),反义链5'-UUUAAGCUGAUAAUUAAC-3' (SEQ ID NO:2) (Sigma-Aldrich)。mASO Scrbl序列是5'-mG\*mG\*mC\*mU\*mA\*mC\*U\*A\*C\*G\*C\*mC\*mG\*mU\*mC\*mA-3' (SEQ ID NO:3)。umASO STAT3序列是5'-CTATTGGATGTCAGC-3' (SEQ ID NO:4)。mASO STAT3序列是5'-mC\*mU\*mA\*mU\*mU\*U\*G\*G\*A\*U\*G\*mU\*mC\*mA\*mG\*mC-3' (SEQ ID NO:5)。<sup>\*</sup>表示2'-O-甲氧基-乙基碱基,<sup>\*</sup>表示硫代磷酸酯键。siCntrl获自Sigma-Aldrich(SIC001, Sigma-Aldrich)。ASO由Integrated DNA Technologies, Inc合成。siRNA被设计为具有靶向小鼠STAT3和人STAT3的同等潜在效率。ASO也被设计为靶向小鼠和人STAT3,但由于与小鼠序列有3个核苷酸错配,因此ASO具有针对小鼠STAT3的潜在较低效力。

[0154] 外排体体内生物分布的可视化。

[0155] 用CCl<sub>4</sub>处理小鼠以诱导肝纤维化(如下详述)。对于MSC来源外排体的生物分布,如前所述将8 $\times$ 10<sup>9</sup>个纯化的、用XenoLight DiR(1,1'-二十八烷基四甲基吡啶三碳菁碘化物, Perkin Elmer, 目录125964)标记的外排体i.p注射(100 $\mu$ l)到健康(假)和纤维化Balb/c小鼠中(Mendt et al., 2018)。注射稀释的DiR(100 $\mu$ l)作为对照。注射6小时之后,对小鼠实施安乐死,并立即收获多种组织(肾、脾、肝、胰腺和肠)并成像。简言之,将每5 $\times$ 10<sup>9</sup>个MSC来源外排体用1 $\mu$ M DiR标记,并随后在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,并在4 $^{\circ}$ C下孵育15分钟,随后在10ml的1 $\times$  PBS中通过40,000g超速离心在4 $^{\circ}$ C下洗涤3小时(Mendt et al., 2018)。将经标记的外排体(8 $\times$ 10<sup>9</sup>)重悬在100 $\mu$ l的1 $\times$  PBS中。对于对照组,根据与上述相同的程序,通过超速离心3小时将1 $\mu$ l的DiR在11ml 1 $\times$  PBS中稀释。将对照样品(仅DiR)重悬于100 $\mu$ l的1 $\times$  PBS中。通过使用具有在780nm下的Em过滤器和在710nm下的Ex过滤器的IVIS 200小动物成像系统(PerkinElmer)来对不同器官的荧光强度进行成像和量化。

[0156] 肝组织中经标记的siSTAT3和mASO STAT3定位的可视化

[0157] 用CCl<sub>4</sub>处理小鼠以诱导肝纤维化(如下详述)。将MSC来源的外排体用经AF647标记

的siRNA和mASO进行电穿孔,然后注射。然后将这些经AF647标记的iExosomes和经AF647标记的裸siRNA或mASO i.p.注射到WT Balb/c和纤维化小鼠中。将切片的肝标本用DAPI染色,并随后封片。通过共聚焦激光扫描显微镜 (Zeiss LSM800) 获得图像,并随后通过对AF647阳性细胞的细胞核数进行计数并将其除以细胞核总数来量化。对于每个器官,捕获三个随机视野 (200×)。

#### [0158] 小鼠

[0159] 在Balb/c小鼠 (8周龄雌性,购自Jackson实验室) 中诱导肝纤维化。用在100μl橄榄油中10%的剂量i.p.注射CCl<sub>4</sub> (Sigma, 56-23-5) (每周两次,持续37天) 来诱导肝损伤。向对照小鼠施用不含CCl<sub>4</sub>的橄榄油 (图5D)。9天之后,将小鼠随机分为13组。每隔一天,还向小鼠i.p.施用100μl体积的PlasmaLyte (Medline) 中的10亿个经改造外排体的1μg siRNA/ASO或20亿个经改造外排体的5μg siRNA/ASO;或者施用单独的siRNA-STAT3/mASO-STAT3。在最后一次iExosomes注射之后的24小时内,对小鼠实施安乐死。所有方案和程序均由MDACC的动物护理和使用研究所委员会批准。

#### [0160] 天狼星红染色和量化

[0161] 将肝在10%中性缓冲的福尔马林中固定并包埋在石蜡中。使用5μm厚的石蜡切片用于天狼星红染色。在冲洗3次并用Weigert苏木精染色8分钟之后,将载片用苦味酸天狼星红 (picrosirius red) 复染1小时。为了量化肝纤维化,使用计数网格对来自每只小鼠的三个独立的天狼星红染色切片进行分析。如之前所述计算肝纤维化区域的百分比 (Whittaker et al., 1994)。

#### [0162] 免疫组织化学

[0163] 将组织在10%福尔马林中固定过夜,脱水并包埋在石蜡中。然后对5μm切片进行处理以用于分析。在1mM EDTA-TE (pH 9.0) 中进行1小时的热介导抗原修复。在与一抗孵育过夜之前1小时,将用于胶原I (Southern Biotech, 1310-01, 1:200) 染色的切片用TBS中的4% CWFS明胶 (Aurion) 封闭。在孵育生物素化的抗山羊 (Vector Laboratories, BA9500, 1:400) 之后,使切片与ABC反应半小时,并随后通过DAB根据制造商的方案进行显影。

#### [0164] 肝功能评价

[0165] 从眶后丛收集小鼠血液。然后立即通过在4℃下以6,000rpm离心10分钟来分离血清,并将其在-80℃下储存直至使用。血清中ALT和AST含量的测量由MDACC的兽医病理学部门进行。

#### [0166] 苏木精和伊红染色

[0167] 将肝组织样品在10%缓冲的福尔马林中固定并包埋在石蜡中。将厚度为5μm的组织切片用苏木精和伊红 (H&E) 染色。对于每张载片,随机选择五个不同的200×视野,并使用Adobe Photoshop 7.0的计数工具手动对坏死的和变性的肝细胞的数量进行计数。根据细胞质的浓缩和深色染色以及细胞核的缺失将肝细胞定义为坏死 (Krishna et al., 2017)。肝细胞变性是通过细胞肿胀和增大而确定的,特别是如之前所报道的 (Lackner et al., 2008)。

#### [0168] RNA测序

[0169] 使用TRIzol™ (Invitrogen, 15596018) 从肝中提取总RNA,并根据制造商的说明进行纯化。RNA完整性通过MDACC测序和ncRNA程序核心使用RNA6000Nano测定来确定。肝RNA测

序使用Illumina TrueSeq链式mRNAseq MDACC测序和ncRNA程序核心来进行。基因组作图使用TopHat软件(v2.0.9;可在万维网在ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml上获得)来进行。本发明人使用Cufflinks算法以用于从RNA-Seq数据中识别转录物,并使用DESeq2(可在万维网在bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html上获得)来确定差异表达的基因以用于基因表达谱分析。进行错误发现率(False-discovery rate,FDR)以确定用于多个检验的p值的显著性阈值。显著表达的基因通过小于0.05的FDR确定。基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)和基因注释通过WebGestalt 2019(可在万维网在webgestalt.org/上获得)来进行(He et al.,2019)。使用NetworkAnalyst 3.0(可在万维网在networkanalyst.ca/上获得)构建STAT-ECM基因相互作用调控网络(Zhou et al.,2019)。

#### [0170] 统计学分析

[0171] 所用的统计学分析在附图说明中详述。数据表示为平均值±平均值的标准误差。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。使用GraphPad Prism(GraphPad软件)使用单因素ANOVA或未配对双尾Student t检验和Welch校正来建立统计学显著性。统计学检验的显著性如下在图中报道:\*\*\*\*( $p < 0.0001$ ),\*\*\*( $p < 0.001$ ),\*\*( $p < 0.01$ ),\*( $p < 0.05$ ),n.s. ( $p > 0.05$ )。

#### [0172] 实施例5-肝星形细胞中的Col1a1敲除

[0173] 产生在活化的肝星形细胞或 $\alpha$ SMA<sup>+</sup>肌成纤维细胞中具有Col1a1基因的敲除突变的小鼠(Col1a1<sup>CKO</sup>)。在i.p.注射CCl<sub>4</sub>的一组小鼠中诱导肝纤维化,而对照组不接受CCl<sub>4</sub>。将纤维化组和对照(“健康”)组二者处死并进行分析。与野生型(WT)相比,在Col1a1<sup>CKO</sup>小鼠中观察到胶原I和肝纤维化的显著降低(图10A至10F)。与WT相比,具有肝纤维化的Col1a1<sup>CKO</sup>小鼠中与肝纤维化相关的许多全表达模式均显著改善(图10G和10H)。

#### [0174] \*\*\*

[0175] 根据本公开内容,本文中公开和要求保护的所有方法无需过度实验就可进行和实施。尽管已经以某些实施方案的方式描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员来说将明显的是可在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,将改变应用于本文中所述的方法以及所述方法的步骤或步骤顺序。例如,将明显的是,可用化学和生理学二者相关的某些试剂替代本文中描述的试剂,同时将获得相同或类似的结果。对于本领域技术人员明显的所有这样的类似替代和改变被视为在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

#### [0176] 参考文献

[0177] 以下参考文献通过引用特定地并入本文,在某种程度上,其提供了补充本文中所示出的那些的示例性过程或其他细节。

[0178] Arriazu E,Ge X,Leung TM,Magdalenos F,Lopategi A,Lu Y,et al.Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury.Gut.2017;66(6):1123-37.

[0179] Bartneck M,Warzecha KT,and Tacke F.Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine.Hepatobiliary Surg Nutr.2014;3(6):364-76.

[0180] Bataller R,and Brenner DA.Liver fibrosis.J Clin Invest.2005;115(2):

209-18.

[0181] Beebe JD,Liu JY,and Zhang JT.Two decades of research in discovery of anticancer drugs targeting STAT3,how close are we?Pharmacol Ther.2018;191:74-91.

[0182] Breitkopf K,Sawitza I,Westhoff JH,Wickert L,Dooley S,and Gressner AM.Thrombospondin lacts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells.Gut.2005; 54 (5) :673-81.

[0183] Chakraborty D,Sumova B,Mallano T,Chen CW,Distler A,Bergmann C,et al.Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis.Nat Commun.2017;8(1):1130.

[0184] Choi S,Jung HJ,Kim MW,Kang JH,Shin D,Jang YS,et al.A novel STAT3 inhibitor,STX-0119,attenuates liver fibrosis by inactivating hepatic stellate cells in mice.Biochem Biophys Res Commun.2019;513(1):49-55.

[0185] Gong XH,Chen C,Hou P,Zhu SC,Wu CQ,Song CL,et al.Overexpression of miR-126 inhibits the activation and migration of HSCs through targeting CRK.Cell Physiol Biochem.2014;33(1):97-106.

[0186] He W,Fu L,Yan Q,Zhou Q,Yuan K,Chen L,et al.Gene set enrichment analysis and meta-analysis identified 12 key genes regulating and controlling the prognosis of lung adenocarcinoma.Oncol Lett.2019;17(6):5608-18.

[0187] Hernandez-Gea V,and Friedman SL.Pathogenesis of liver fibrosis.Annu Rev Pathol.2011;6:425-56.

[0188] Jung KH,Yoo W,Stevenson HL,Deshpande D,Shen H,Gagea M,et al.Multifunctional Effects of a Small-Molecule STAT3 Inhibitor on NASH and Hepatocellular Carcinoma in Mice.Clin Cancer Res.2017;23(18):5537-46.

[0189] Kamerkar S,LeBleu VS,Sugimoto H,Yang S,Ruivo CF,Melo SA,et al.Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer.Nature.2017;546(7659):498-503.

[0190] Krishna M.Patterns of necrosis in liver disease.Clin Liver Dis (Hoboken) .2017;10(2):53-6.

[0191] Lackner C,Gogg-Kamerer M,Zatloukal K,Stumptner C,Brunt EM,and Denk H.Ballooned hepatocytes in steatohepatitis:the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis.J Hepatol.2008;48(5):821-8.

[0192] Lou G,Chen L,Xia C,Wang W,Qi J,Li A,et al.MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway.J Exp Clin Cancer Res.2020;39(1):4.

[0193] Lu Y,Lv F,Kong M,Chen X,Duan Y,Chen X,et al.A cAbl-MRTF-A Feedback Loop Contributes to Hepatic Stellate Cell Activation.Front Cell Dev

Biol.2019;7:243.

[0194] Mederacke I,Hsu CC,Troeger JS,Huebener P,Mu X,Dapito DH,et al.Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology.Nat Commun.2013;4:2823.

[0195] Mendt M,Kamerkar S,Sugimoto H,McAndrews KM,Wu CC,Gagea M,et al.Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer.JCI Insight.2018;3(8).

[0196] Meng XM,Nikolic-Paterson DJ,and Lan HY.TGF-beta:the master regulator of fibrosis.Nat Rev Nephrol.2016;12(6):325-38.

[0197] Pechkovsky DV,Prele CM,Wong J,Hogaboam CM,McAnulty RJ,Laurent GJ,et al.STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF.Am J Pathol.2012;180(4):1398-412.

[0198] Qu Y,Zhang Q,Cai X,Li F,Ma Z,Xu M,et al.Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation.J Cell Mol Med.2017;21(10):2491-502.

[0199] Su TH,Shiau CW,Jao P,Liu CH,Liu CJ,Tai WT,et al.Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition.Proc Natl Acad Sci U S A.2015;112(23):7243-8.

[0200] Vinas O,Bataller R,Sancho-Bru P,Gines P,Berenguer C,Enrich C,et al.Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation.Hepatology.2003;38(4):919-29.

[0201] Wang H,Lafdil F,Kong X,and Gao B.Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases:a novel therapeutic target,Int J Biol Sci.2011;7(5):536-50.

[0202] Wang H,Lafdil F,Wang L,Park O,Yin S,Niu J,et al.Hepatoprotective versus oncogenic functions of STAT3 in liver tumorigenesis.Am J Pathol.2011;179(2):714-24.

[0203] Whittaker P,Kloner RA,Boughner DR,and Pickering JG.Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light.Basic Res Cardiol.1994;89(5):397-410.

[0204] Xiang DM,Sun W,Ning BF,Zhou TF,Li XF,Zhong W,et al.The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis.Gut.2018;67(9):1704-15.

[0205] Zeybel M,Luli S,Sabater L,Hardy T,Oakley F,Leslie J,et al.A Proof-of-Concept for Epigenetic Therapy of Tissue Fibrosis:Inhibition of Liver Fibrosis Progression by 3-Deazaneplanocin A.Mol Ther.2017;25(1):218-31.

[0206] Zhai X,Wang W,Dou D,Ma Y,Gang D,Jiang Z,et al.A novel technique to prepare a single cell suspension of isolated quiescent human hepatic stellate

cells.Sci Rep.2019;9(1):12757.

[0207] Zhou G,Soufan O,Ewald J,Hancock REW,Basu N,and Xia J.Network Analyst 3.0:a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis.Nucleic Acids Res.2019;47(W1):W234-W41.

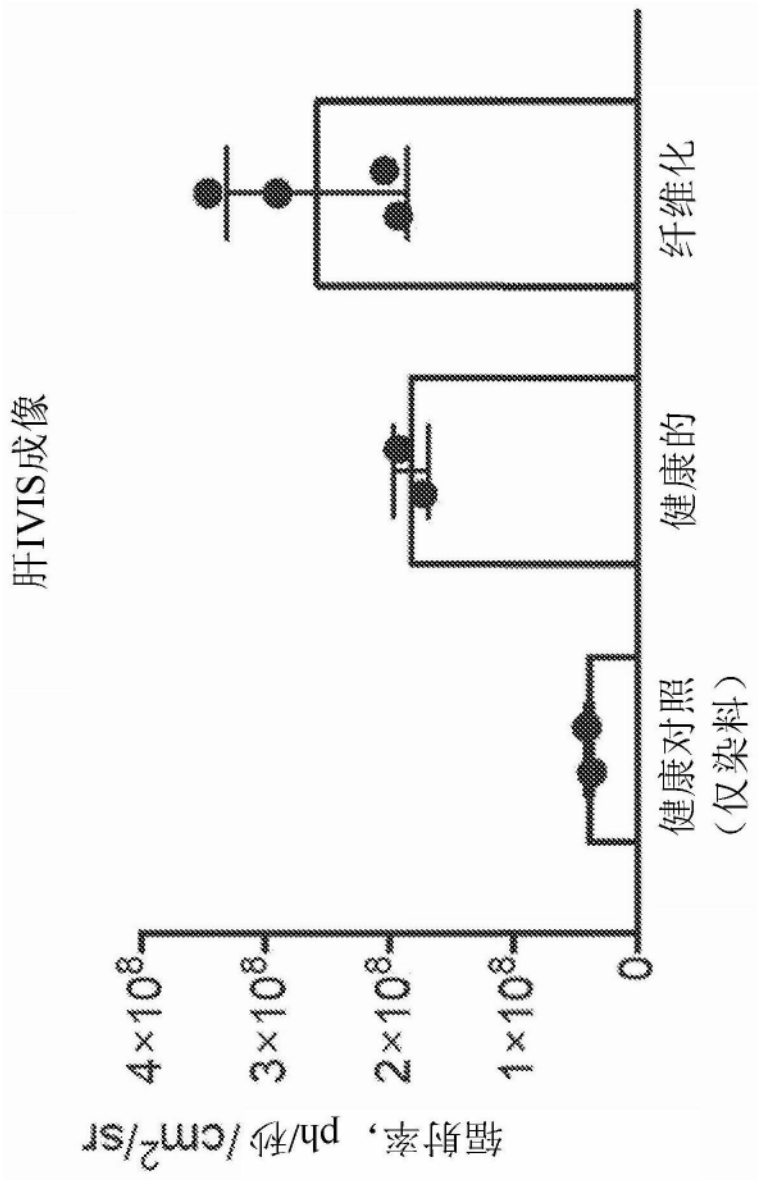


图1

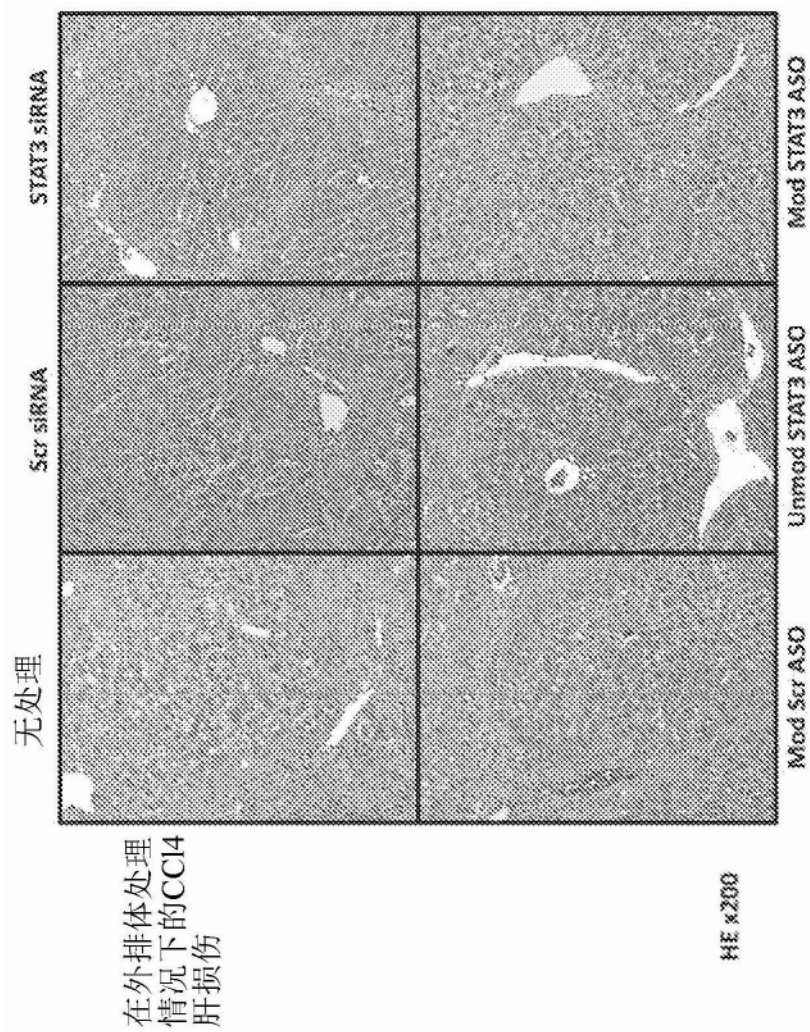


图2A

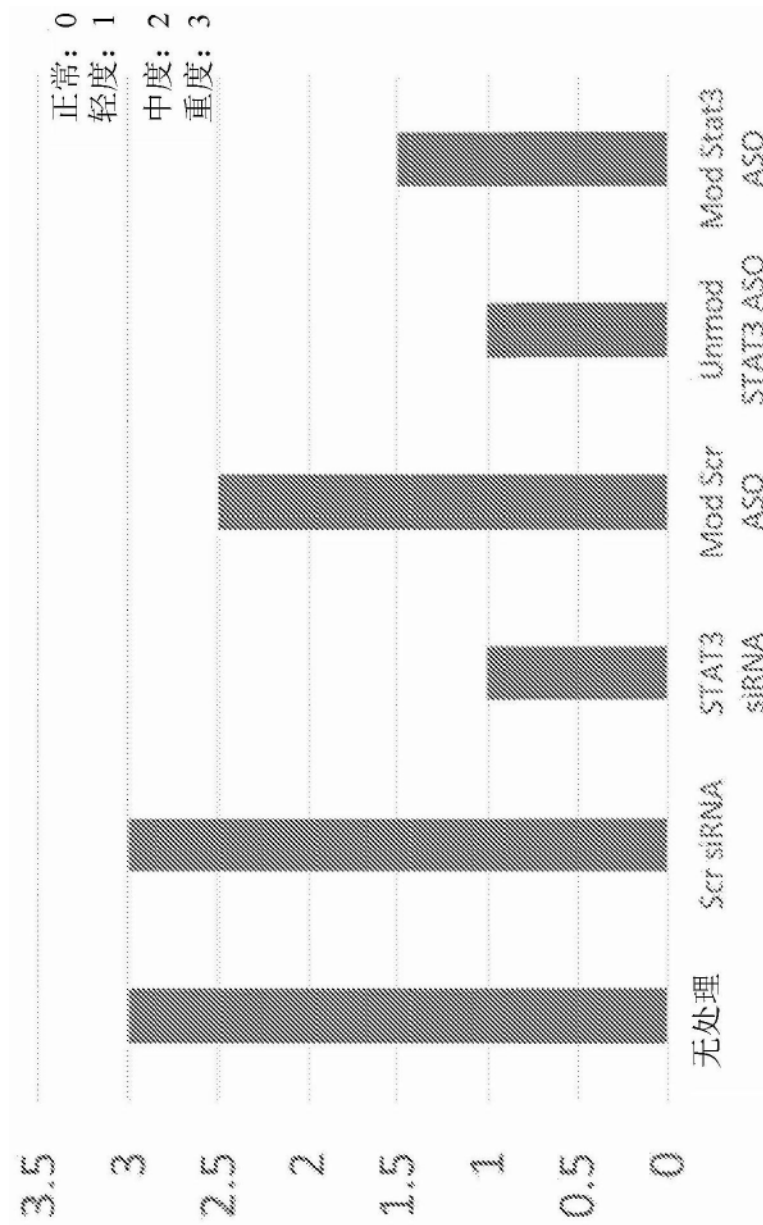


图2B

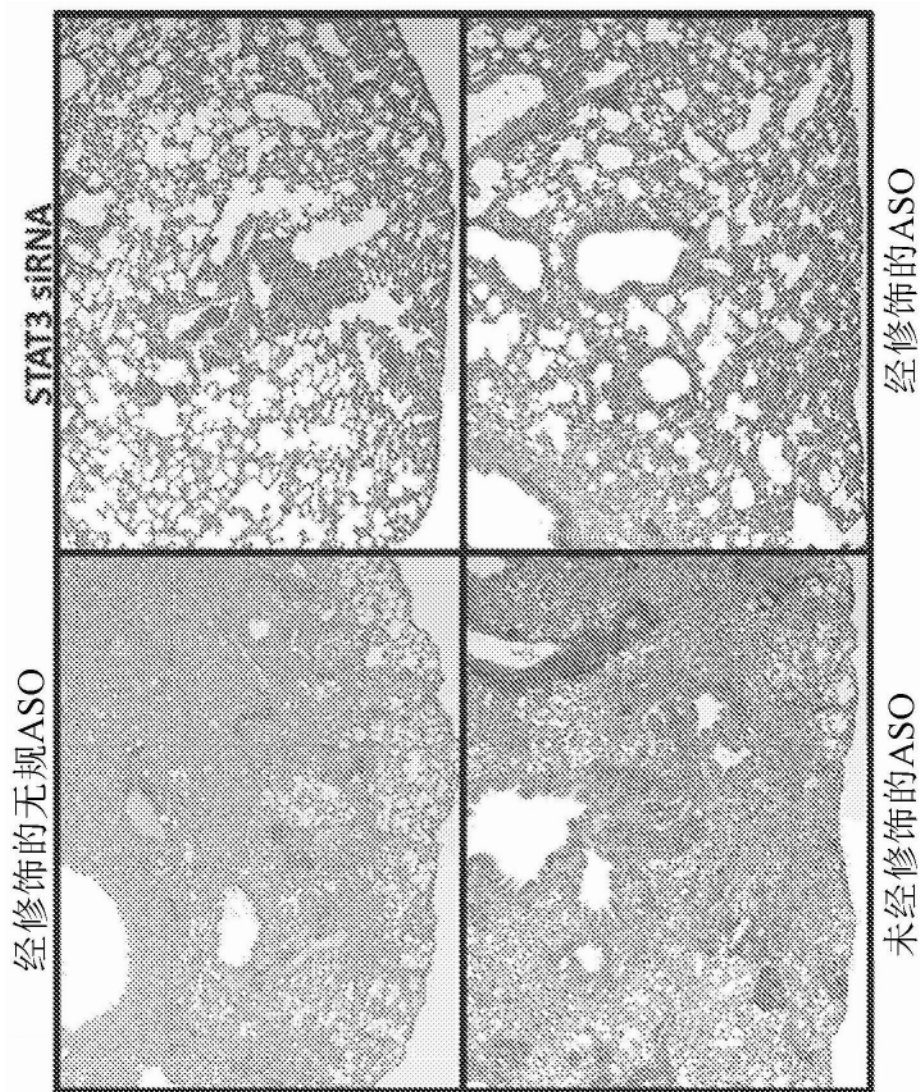


图3A

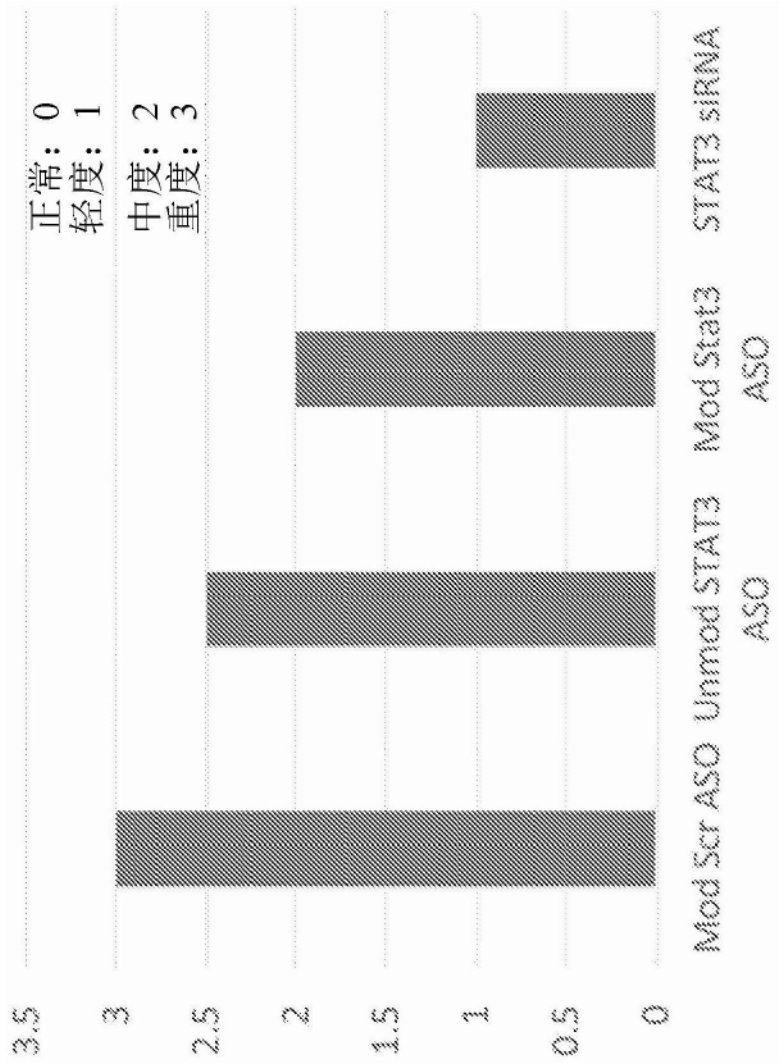


图3B

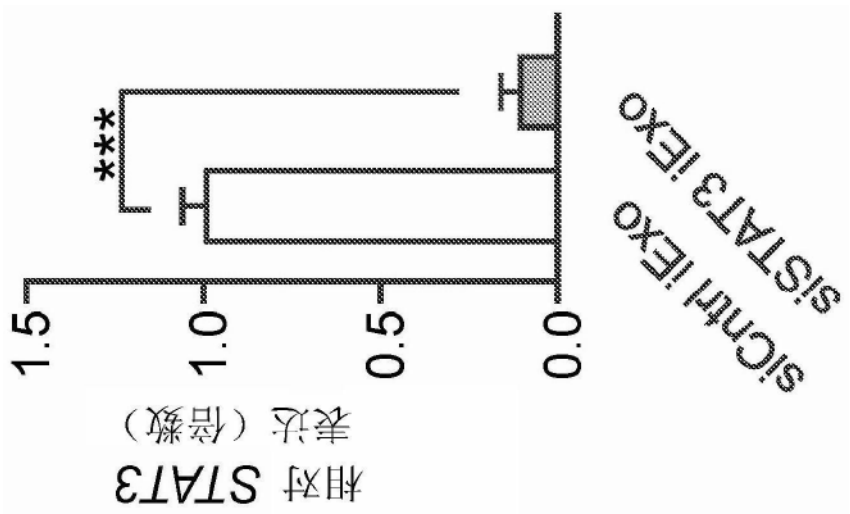


图4A

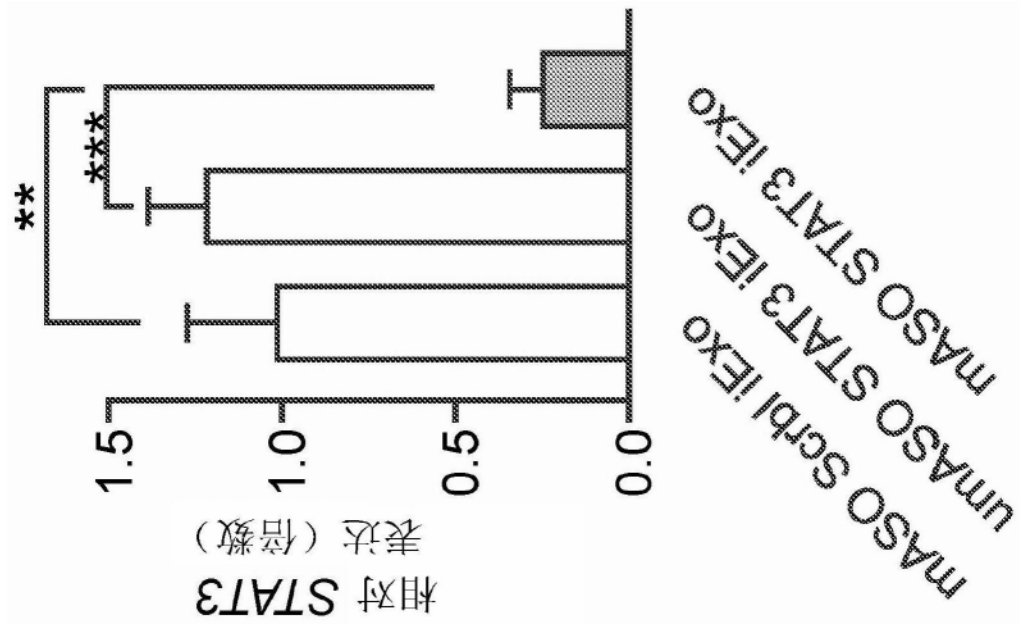


图4B

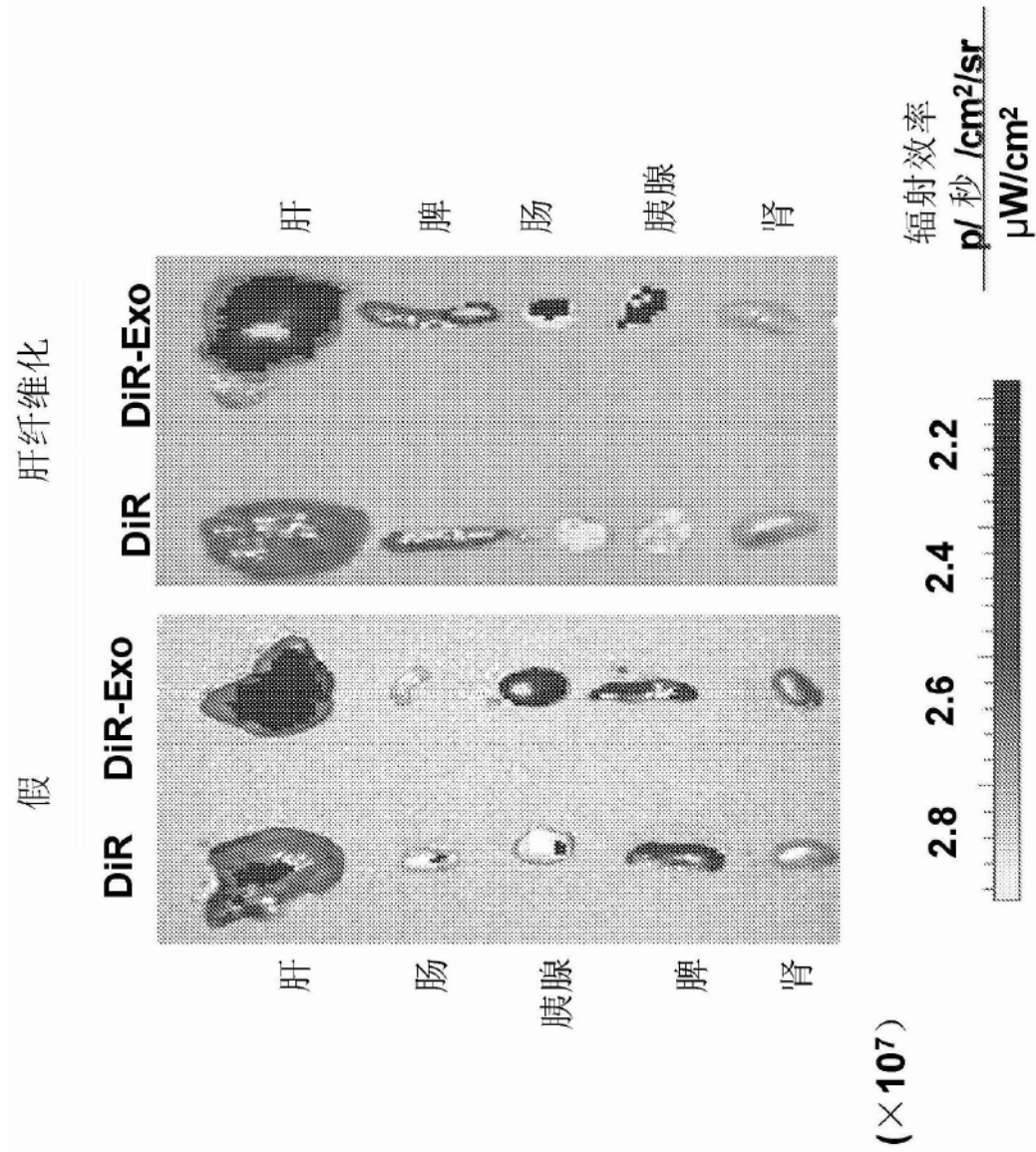


图4C

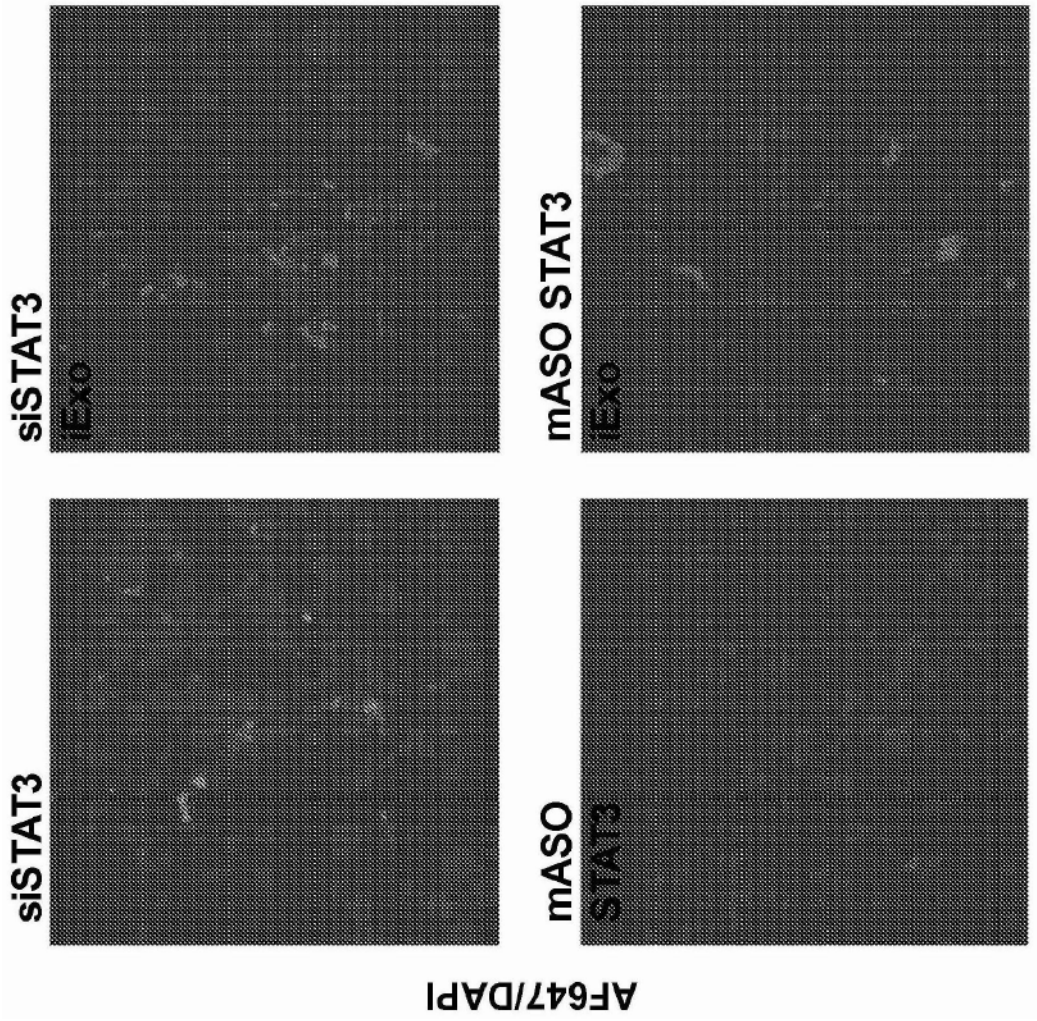


图4D

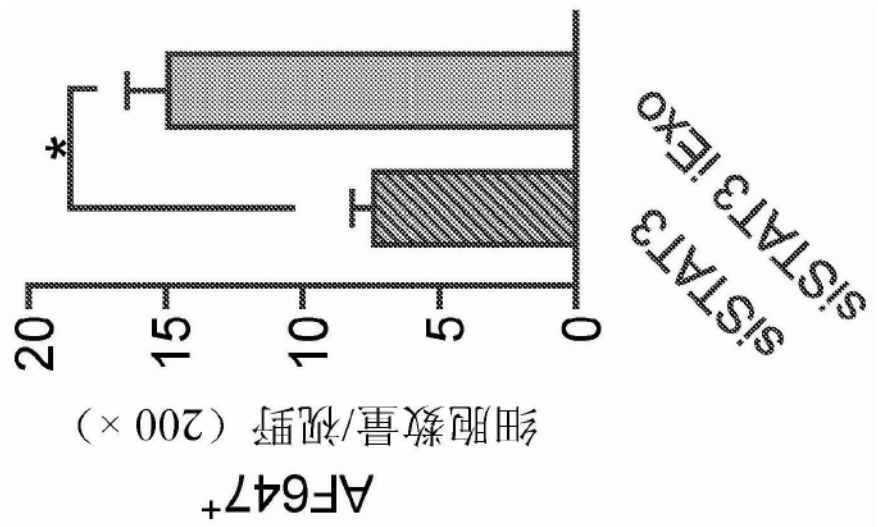


图4E

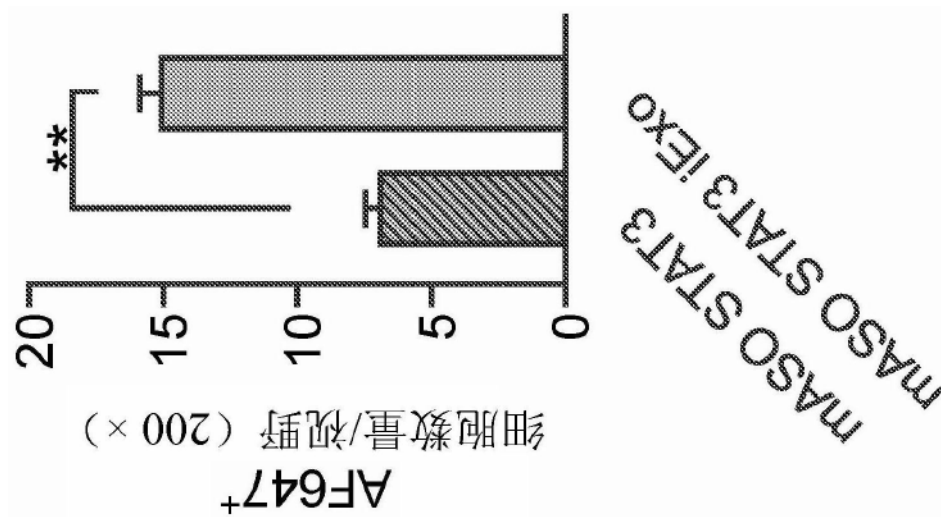


图4F

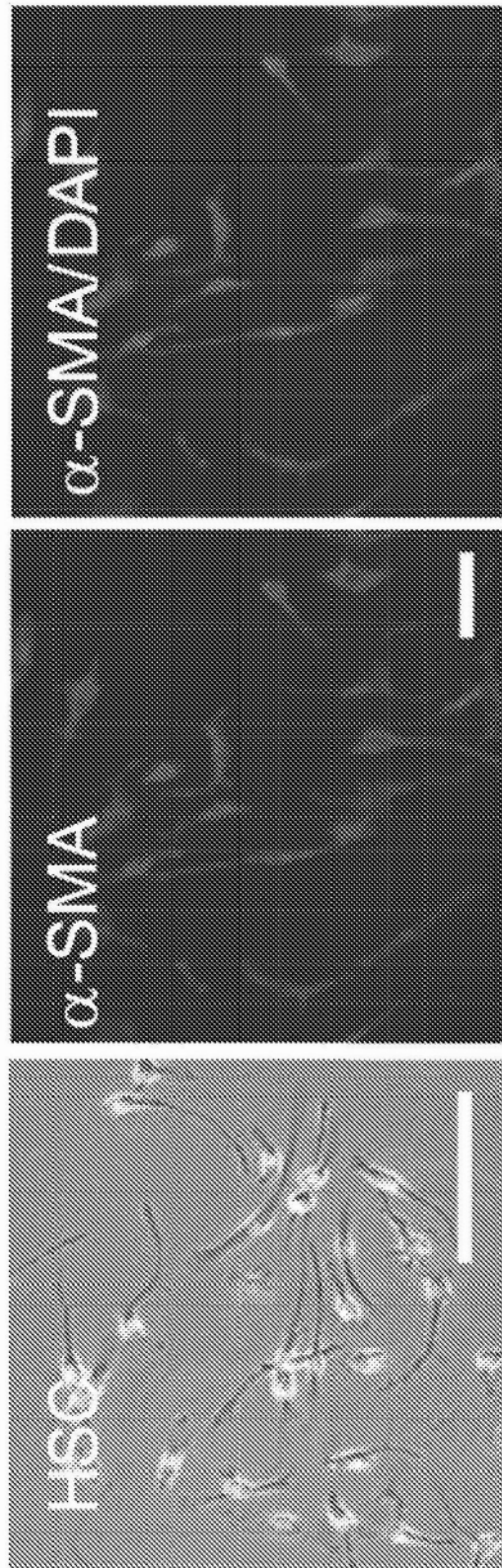


图5A

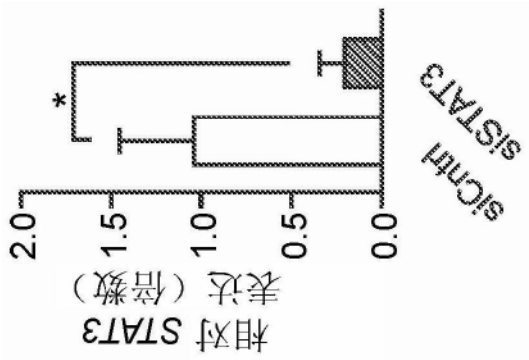


图5B

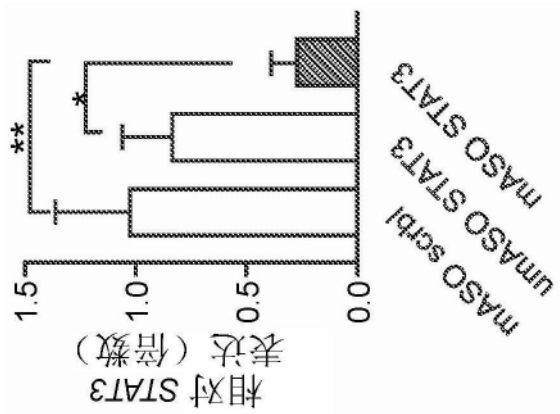


图5C

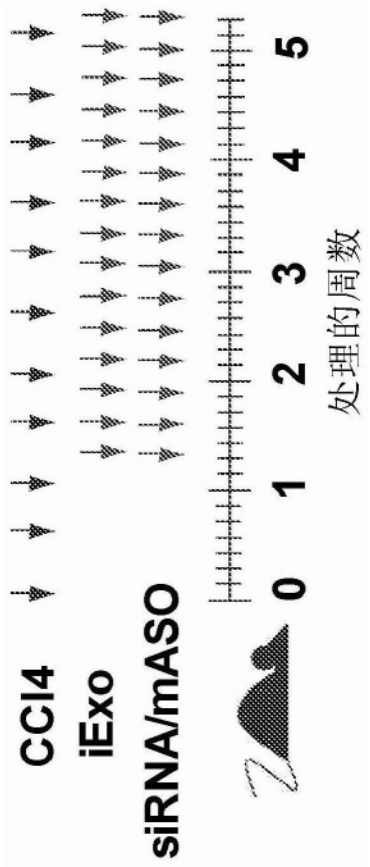


图5D

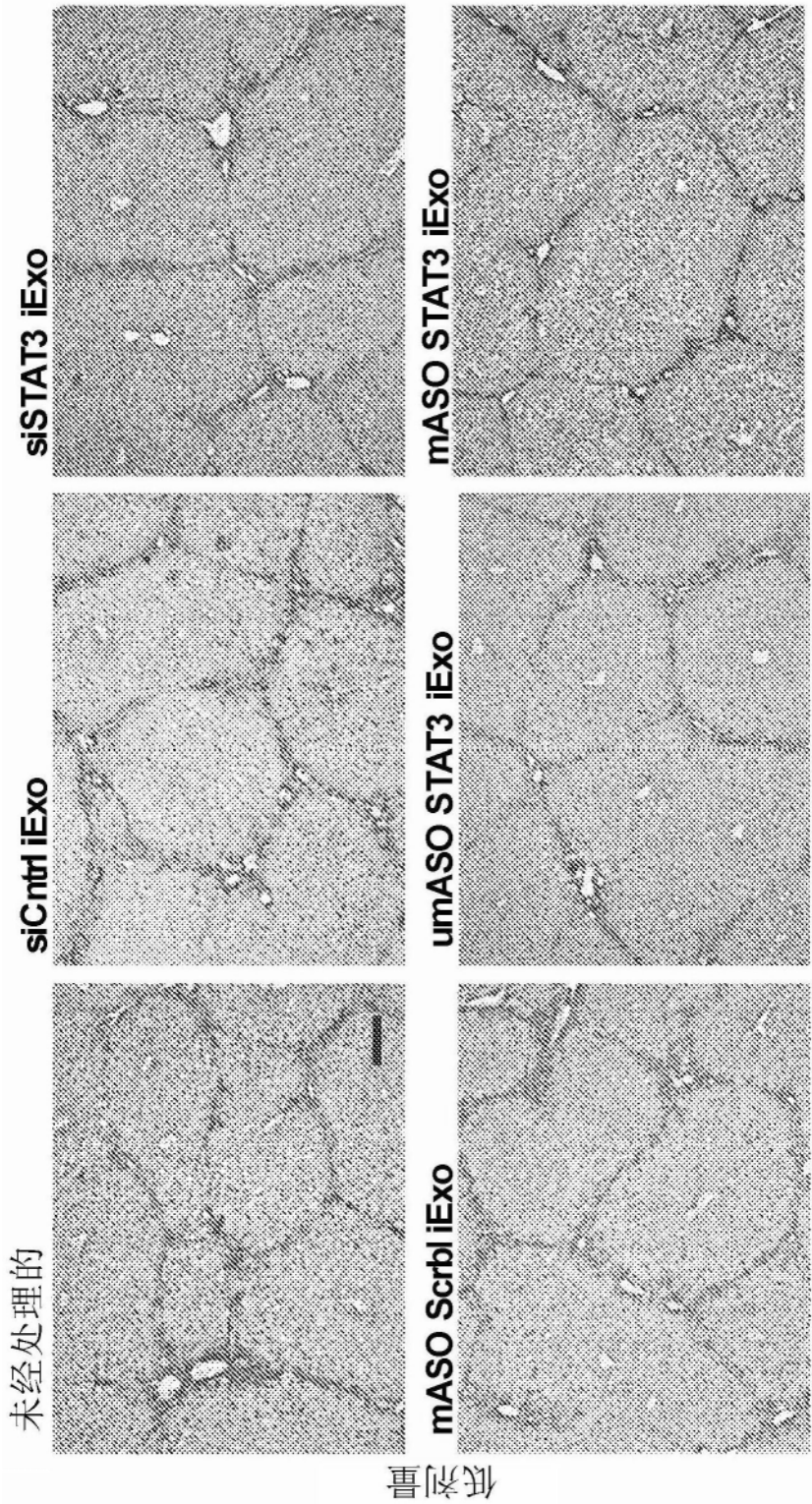


图5E

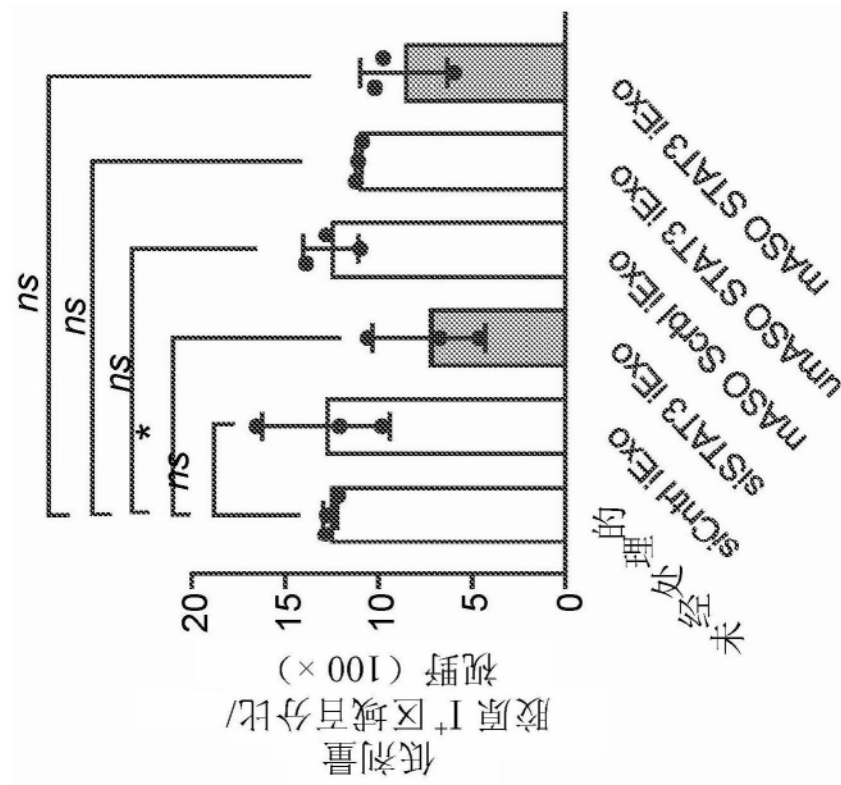


图5F

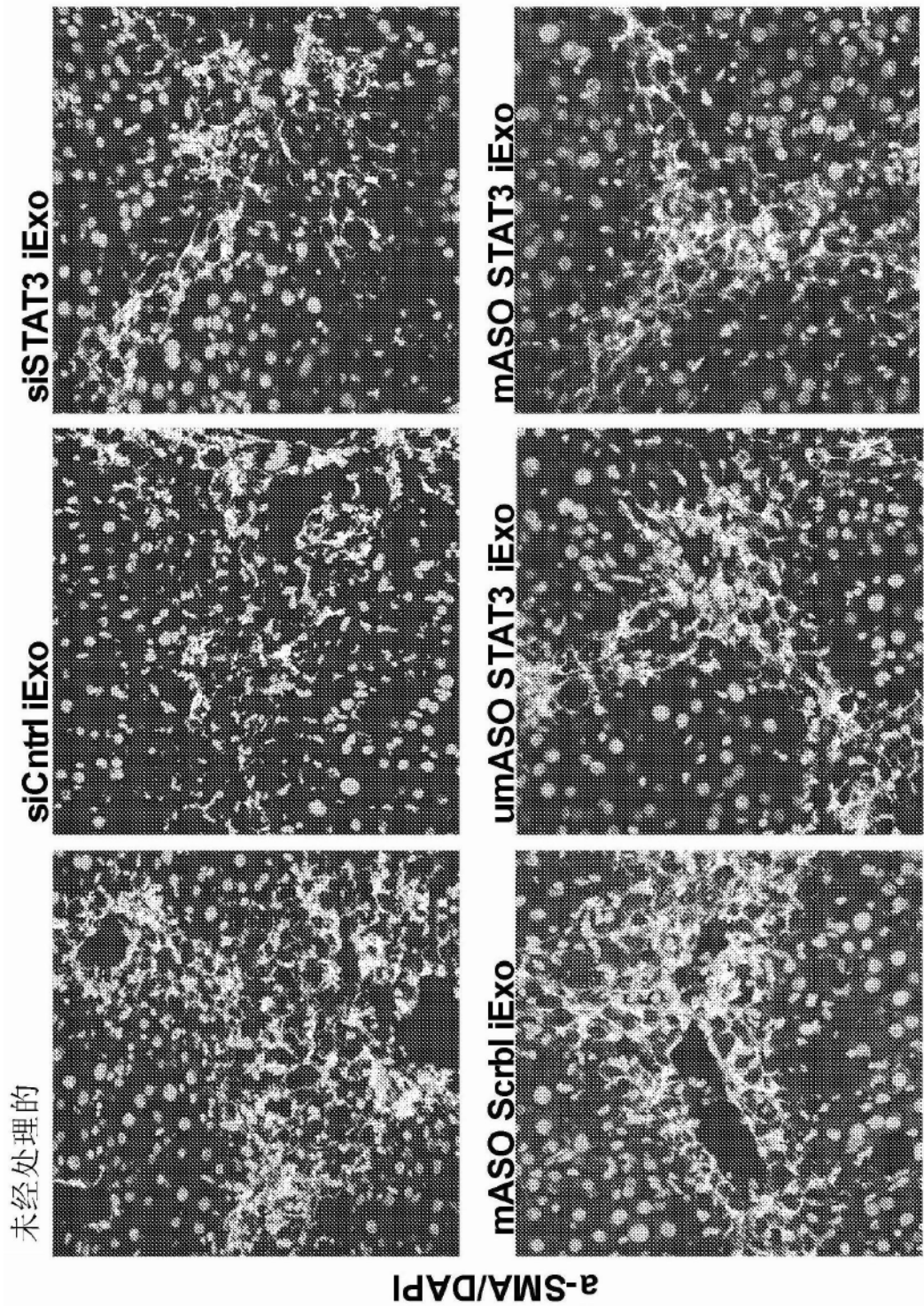


图5G

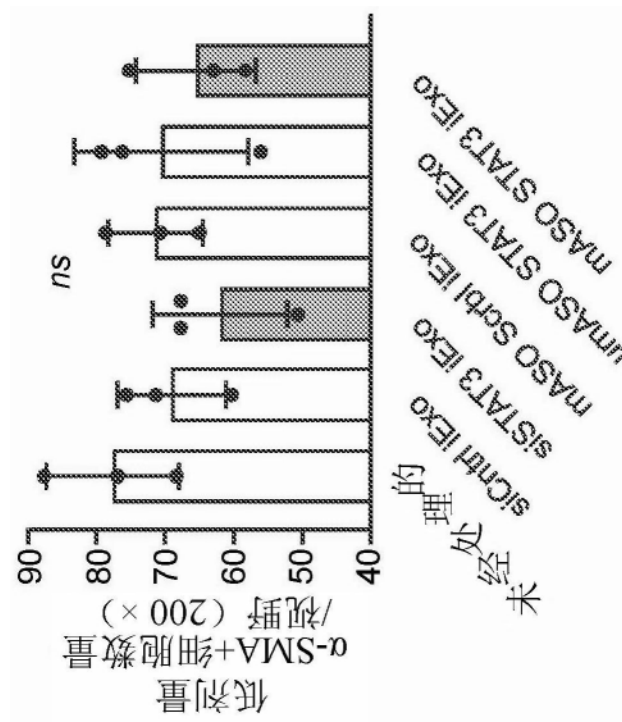


图5H

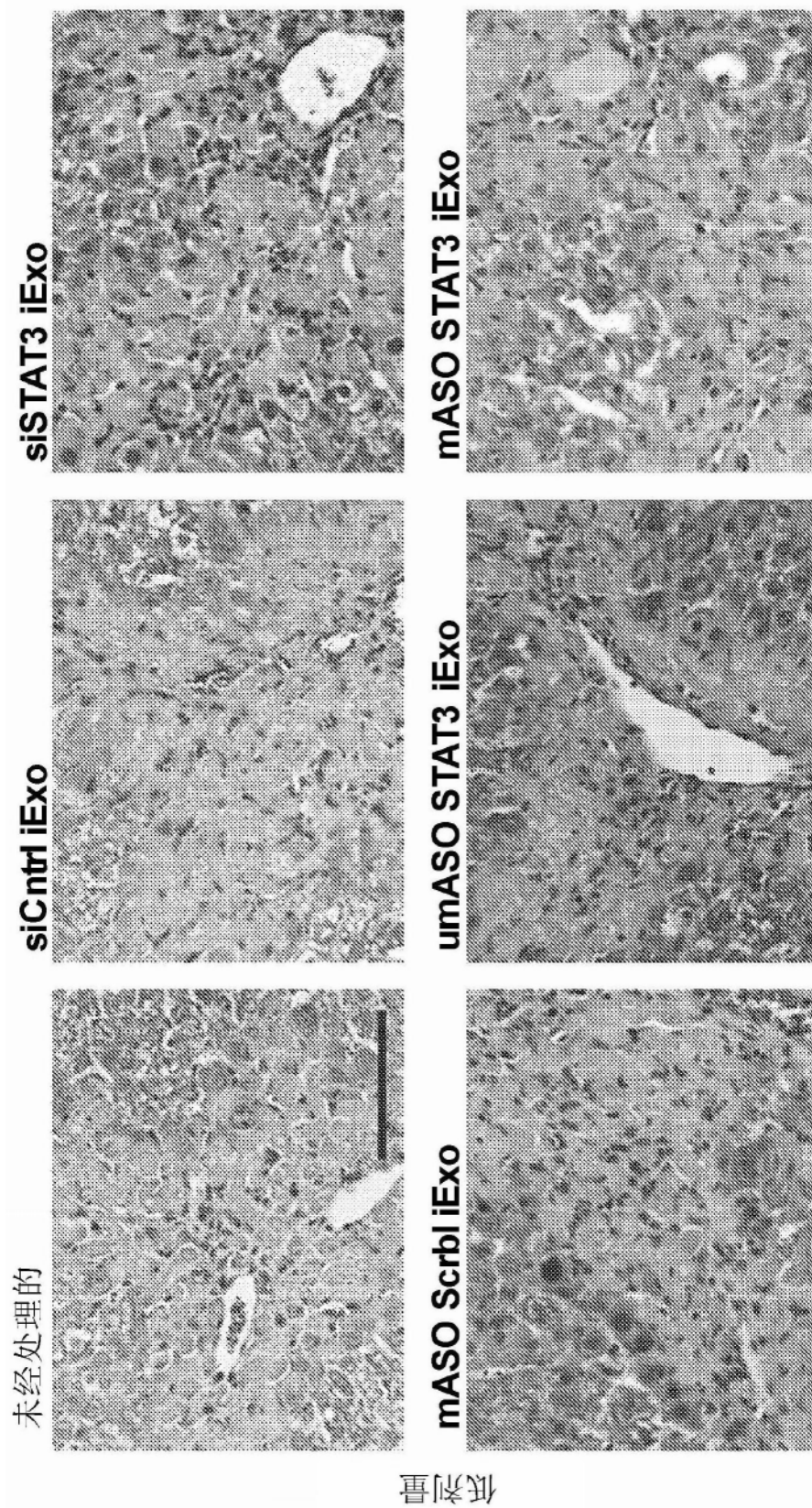


图5I

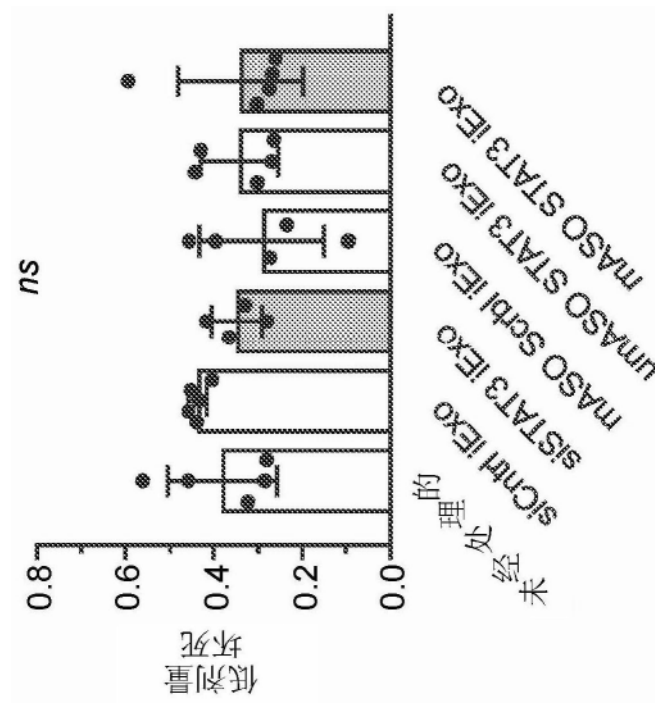


图5J

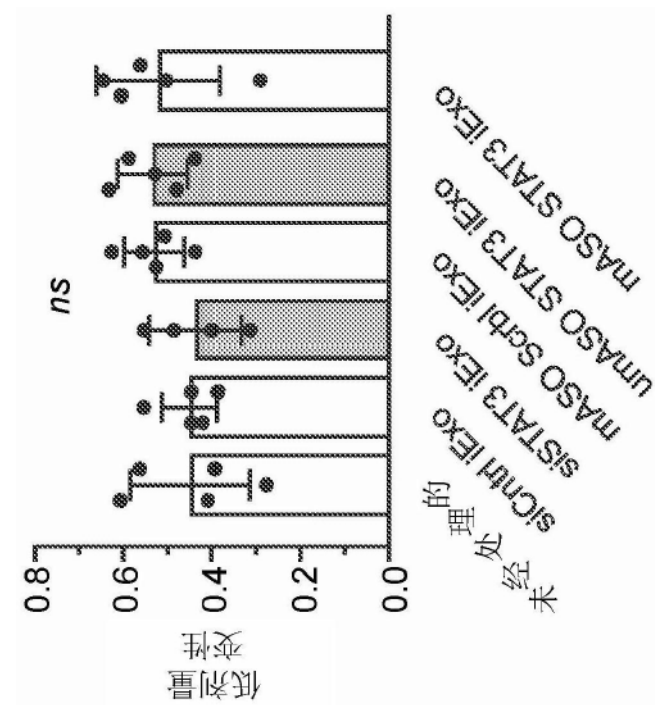


图5K

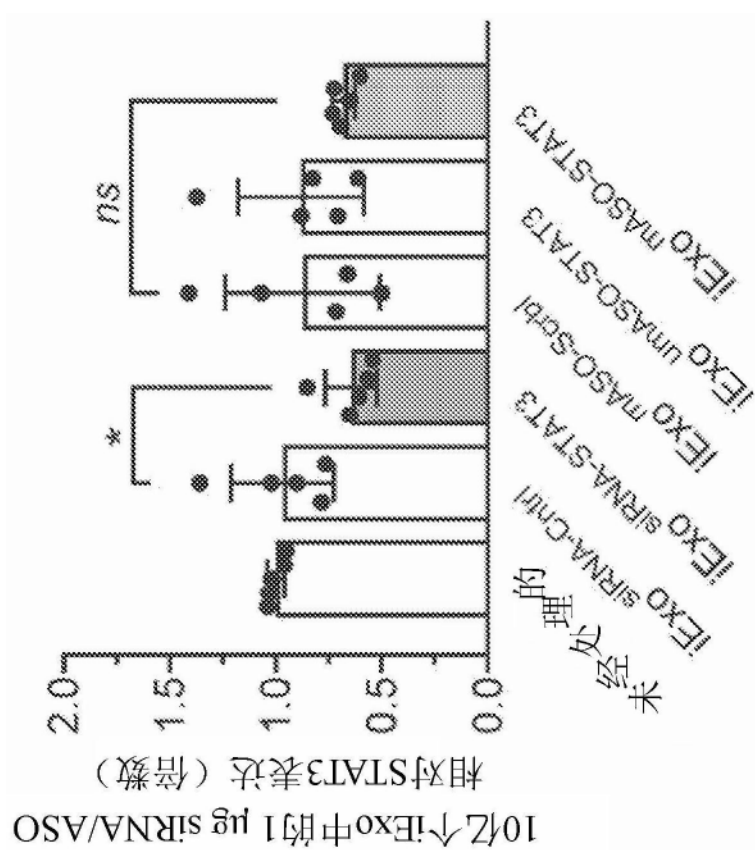


图6A

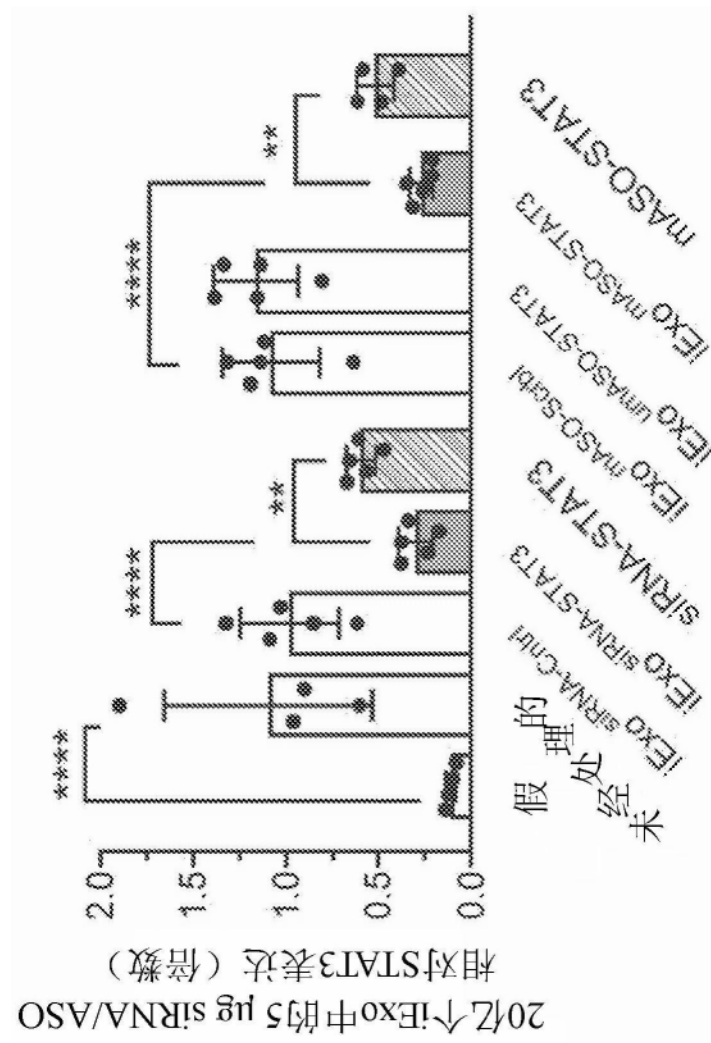


图6B

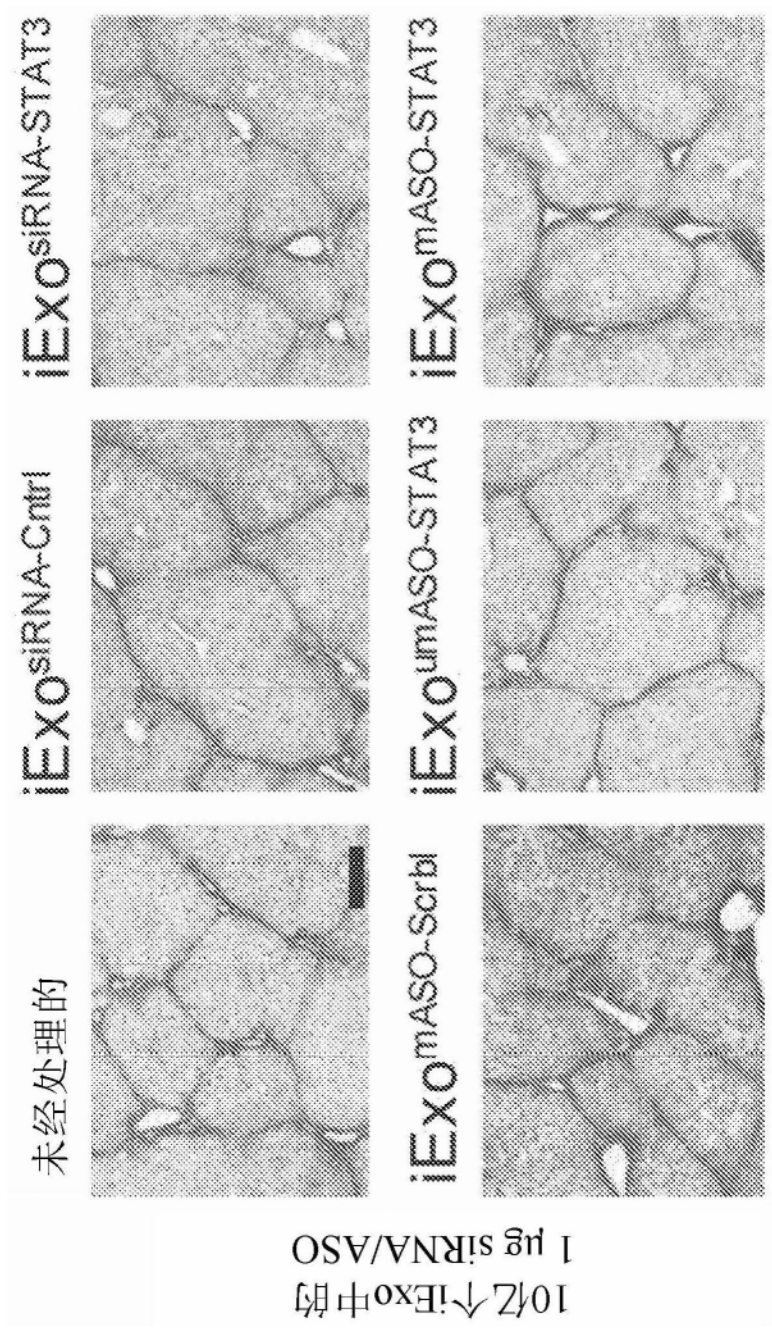


图6C

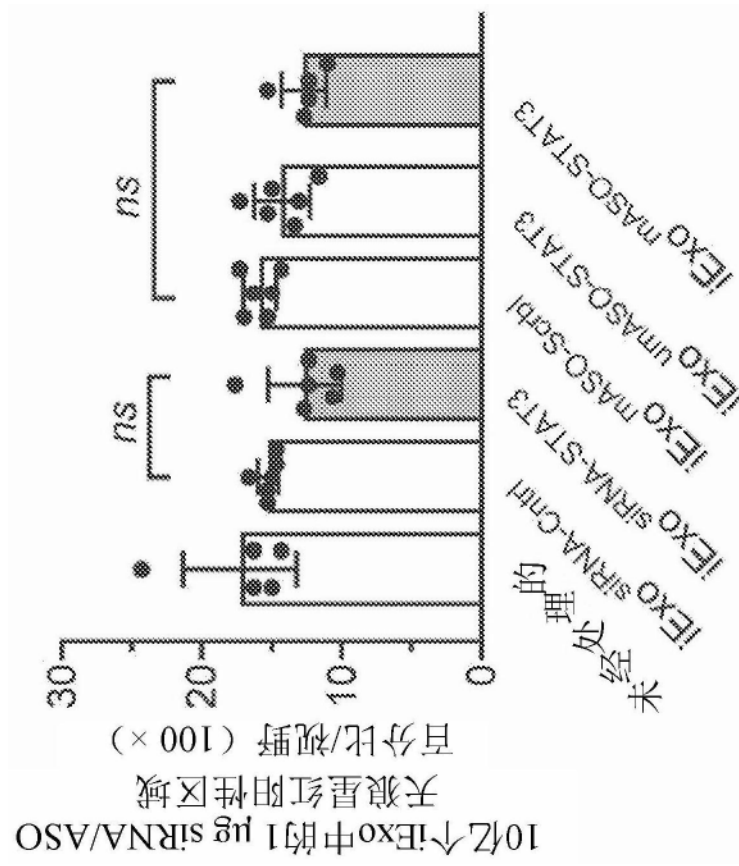


图6D

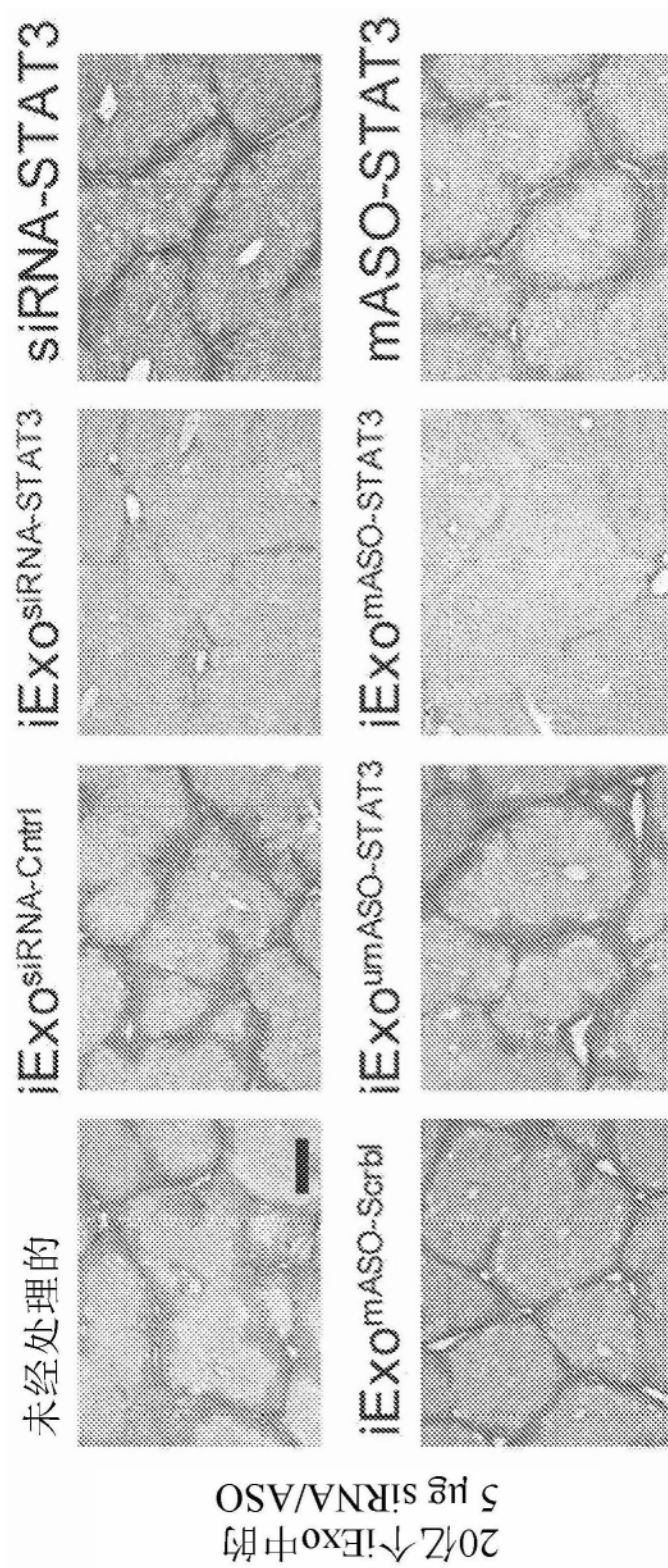


图6E

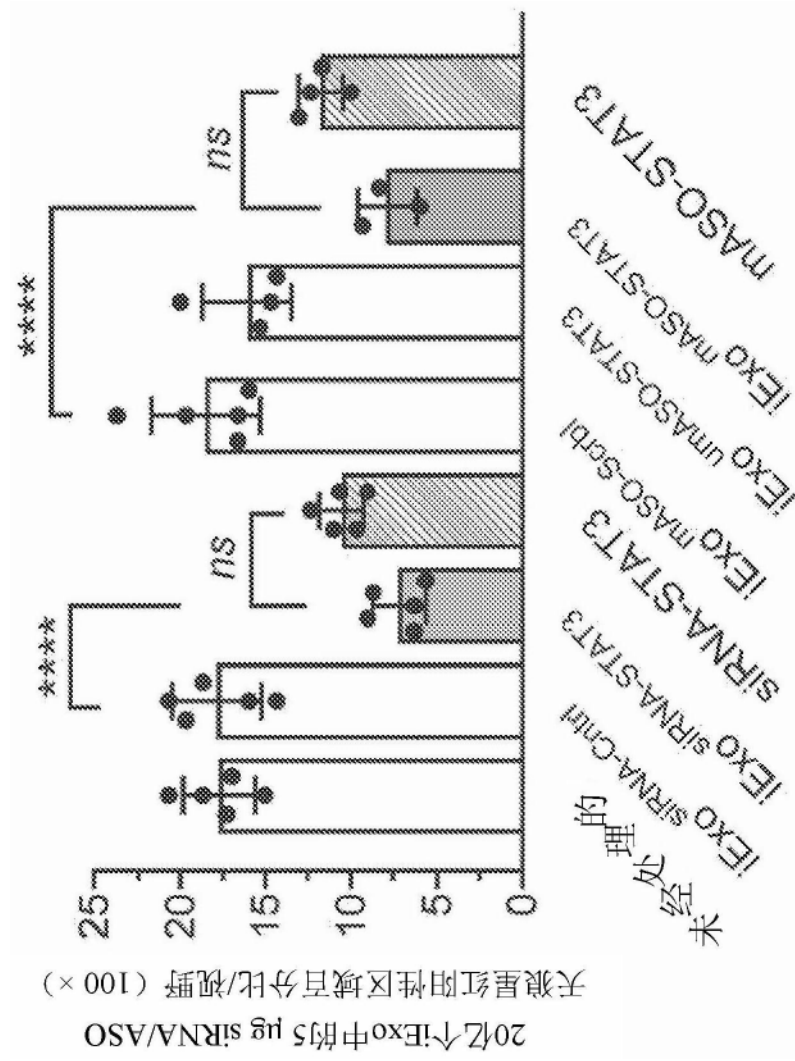


图6F

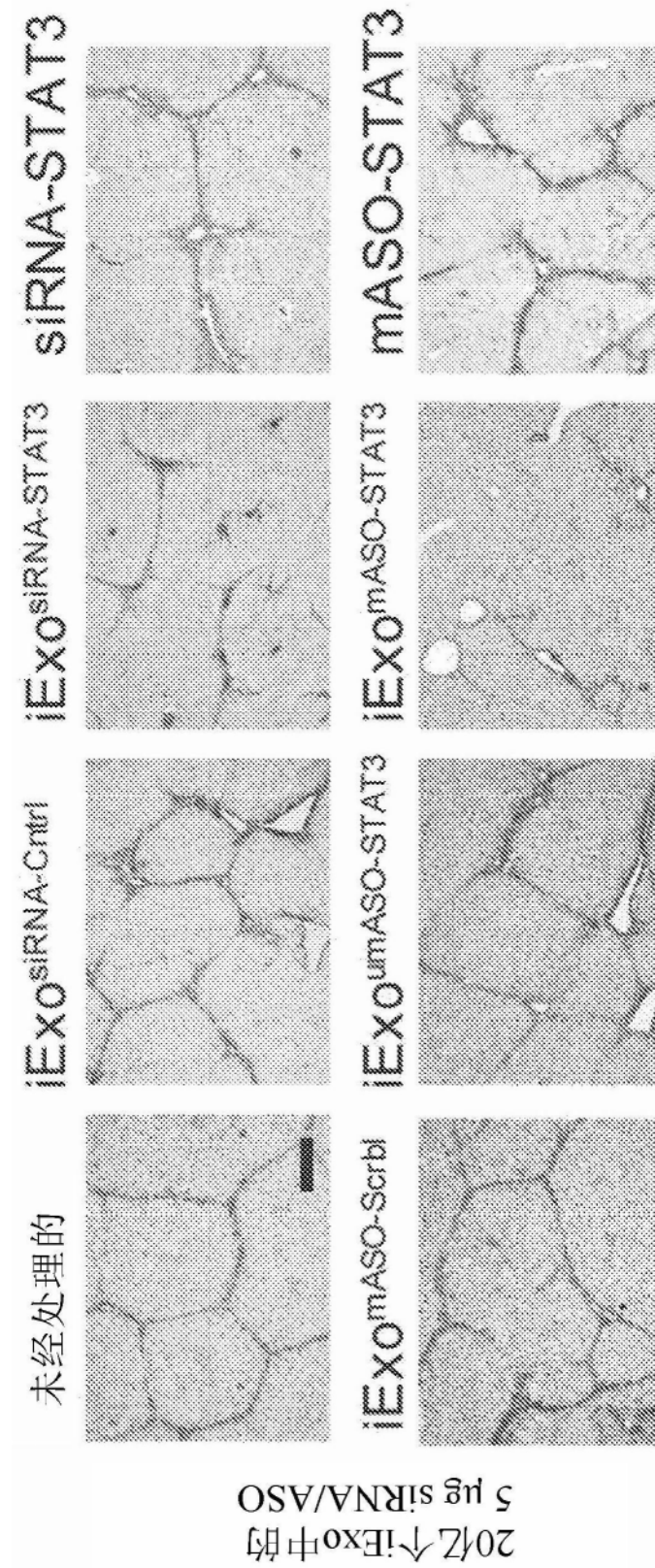


图6G

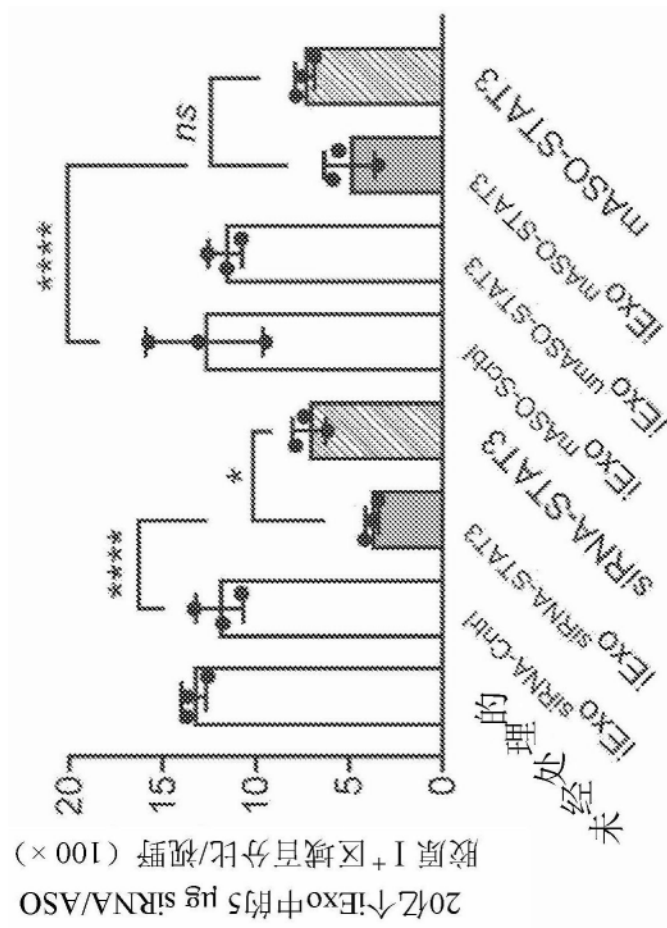


图6H

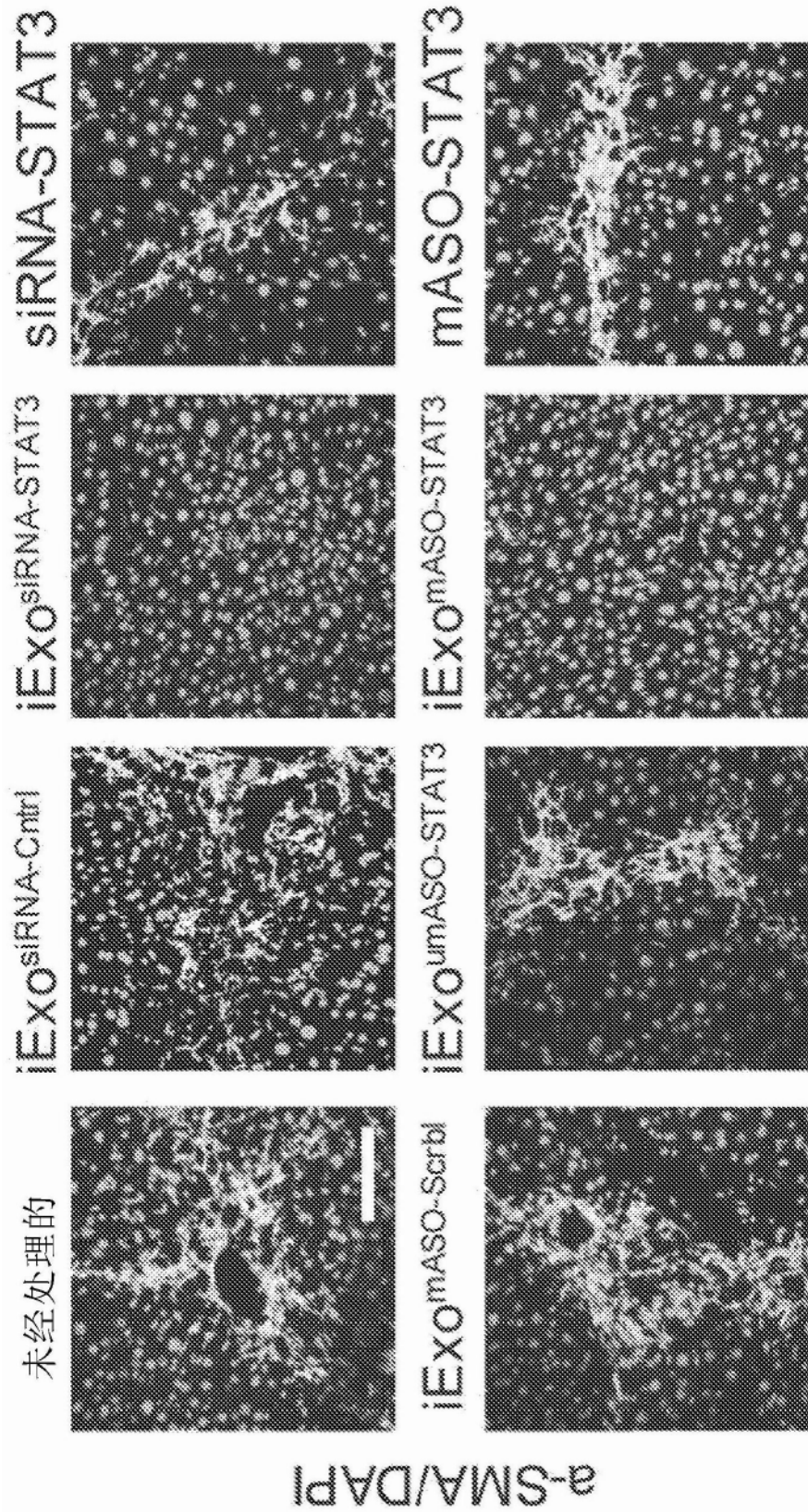


图6I

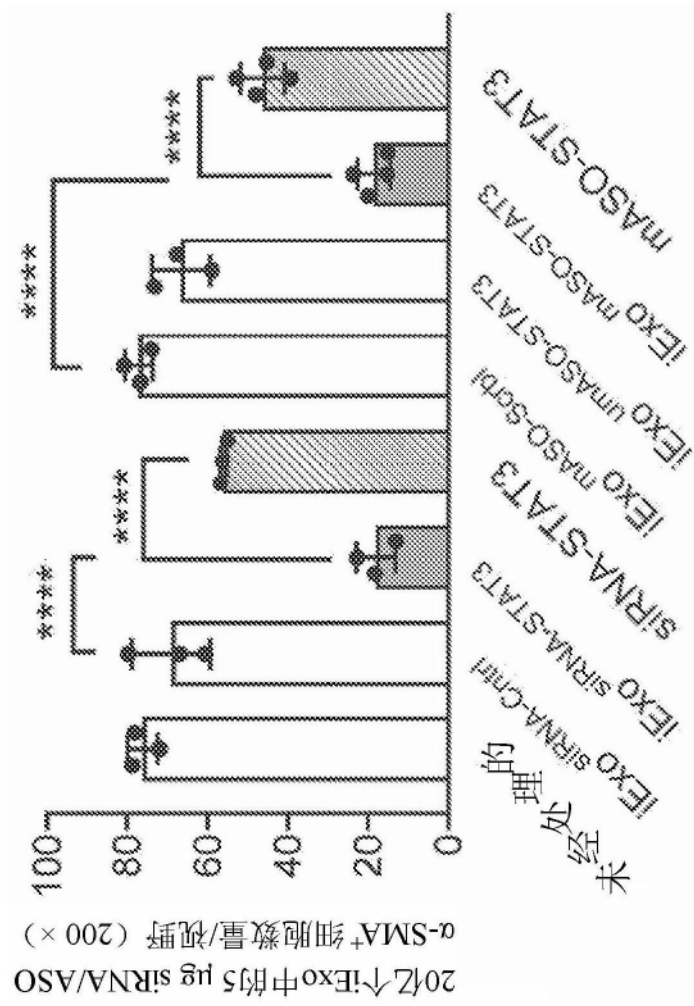


图6J

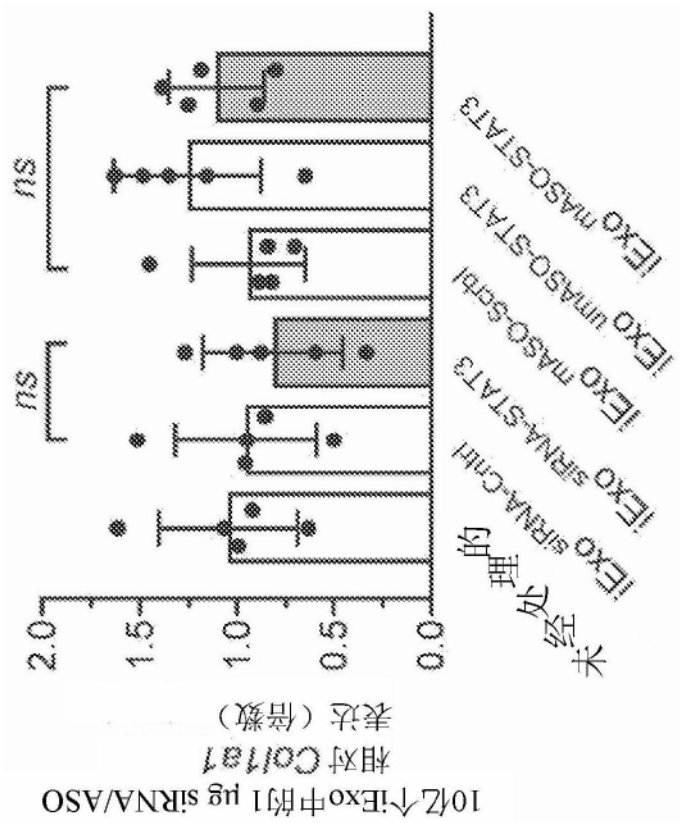


图7A

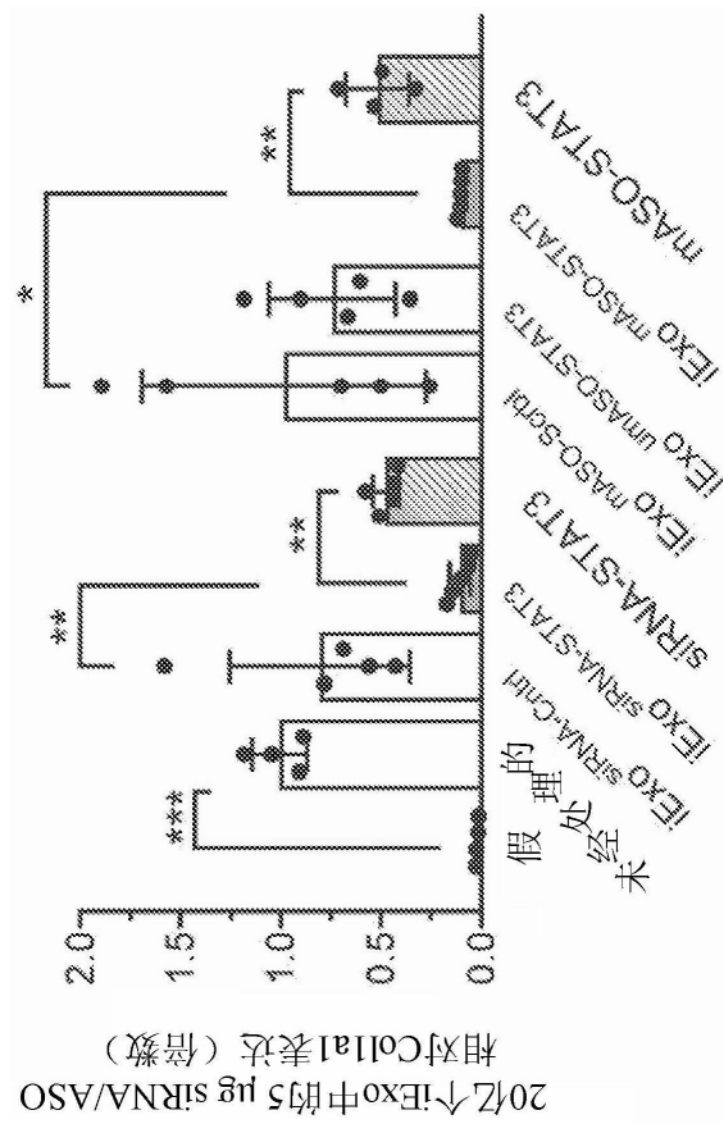


图7B

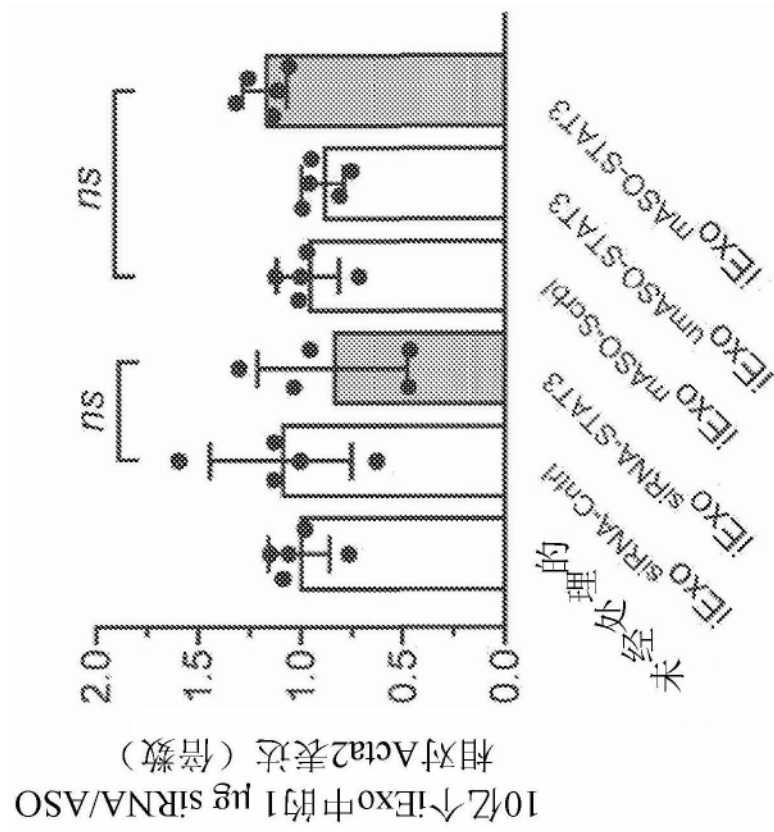


图7C



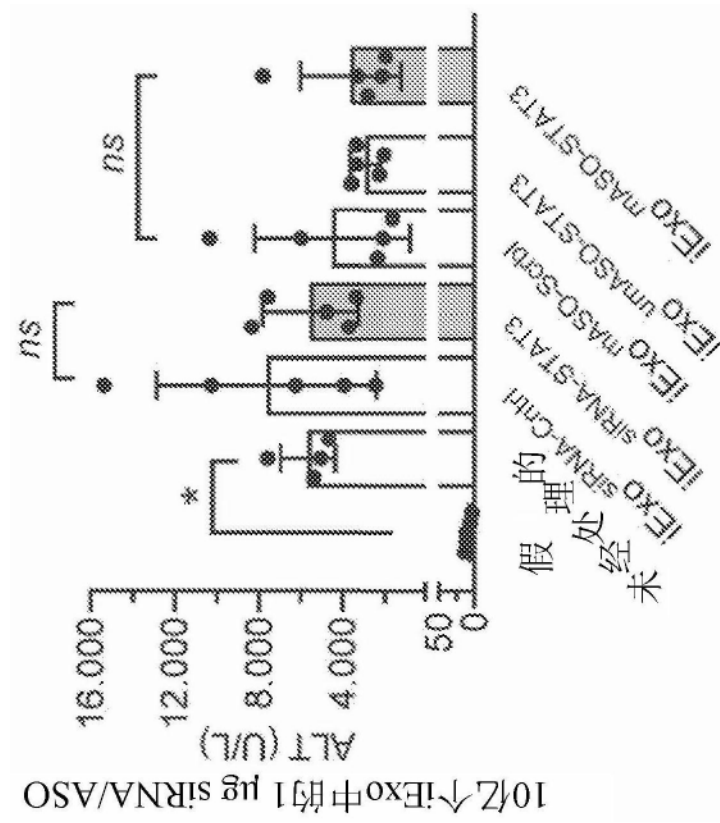


图7E



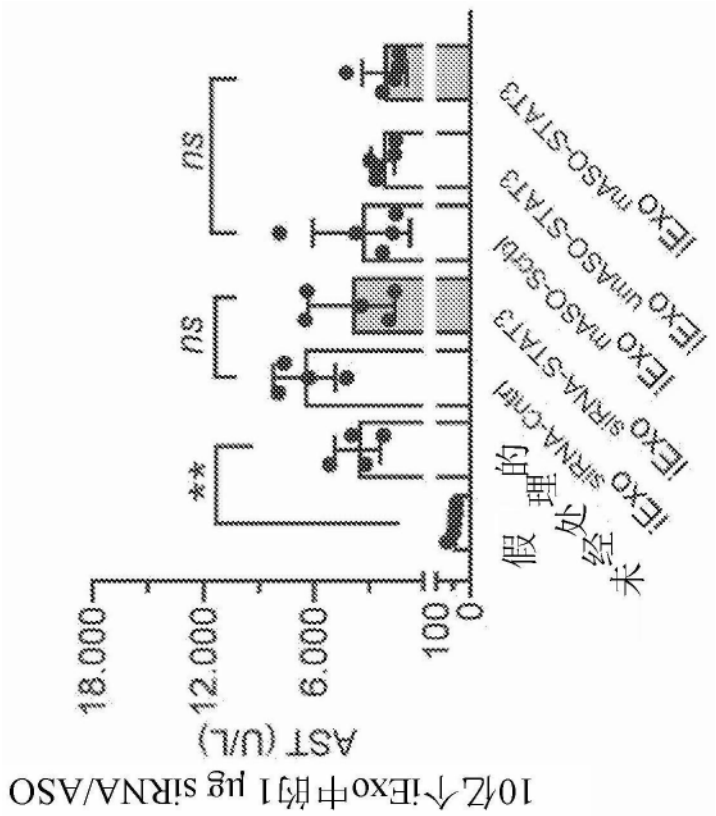


图7G

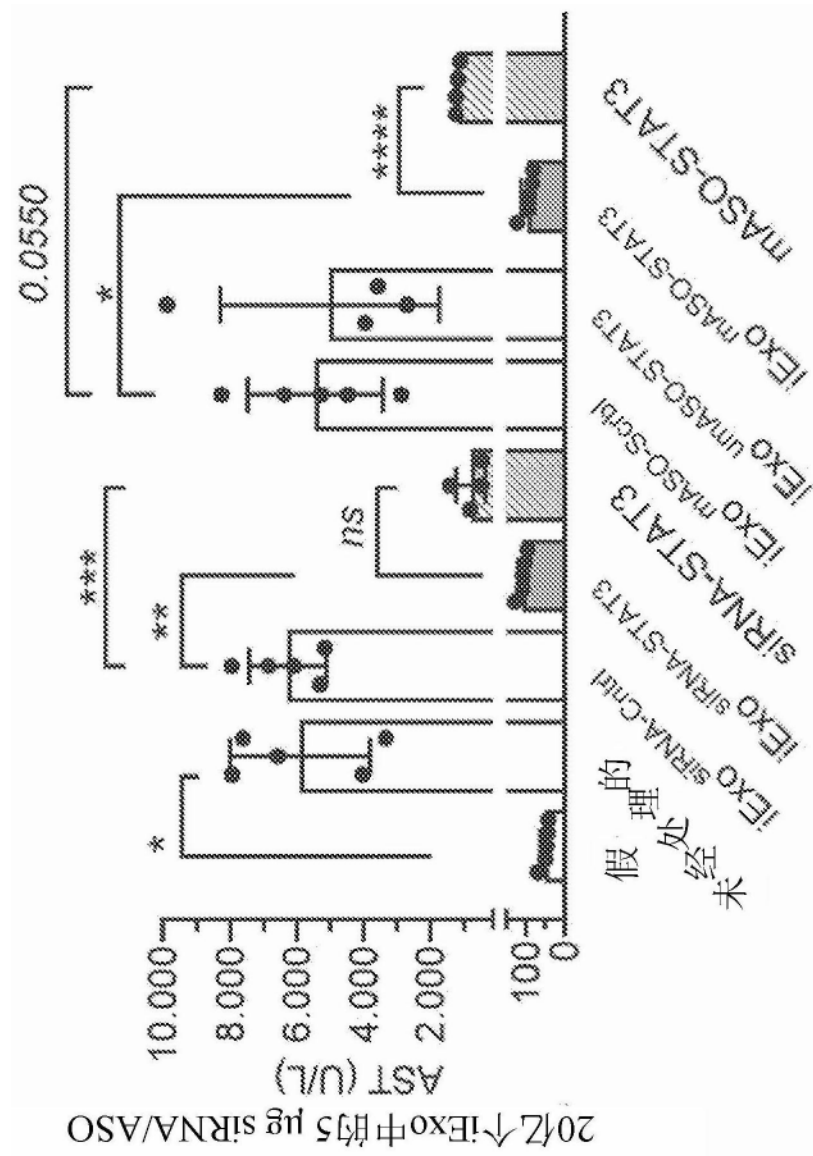


图7H

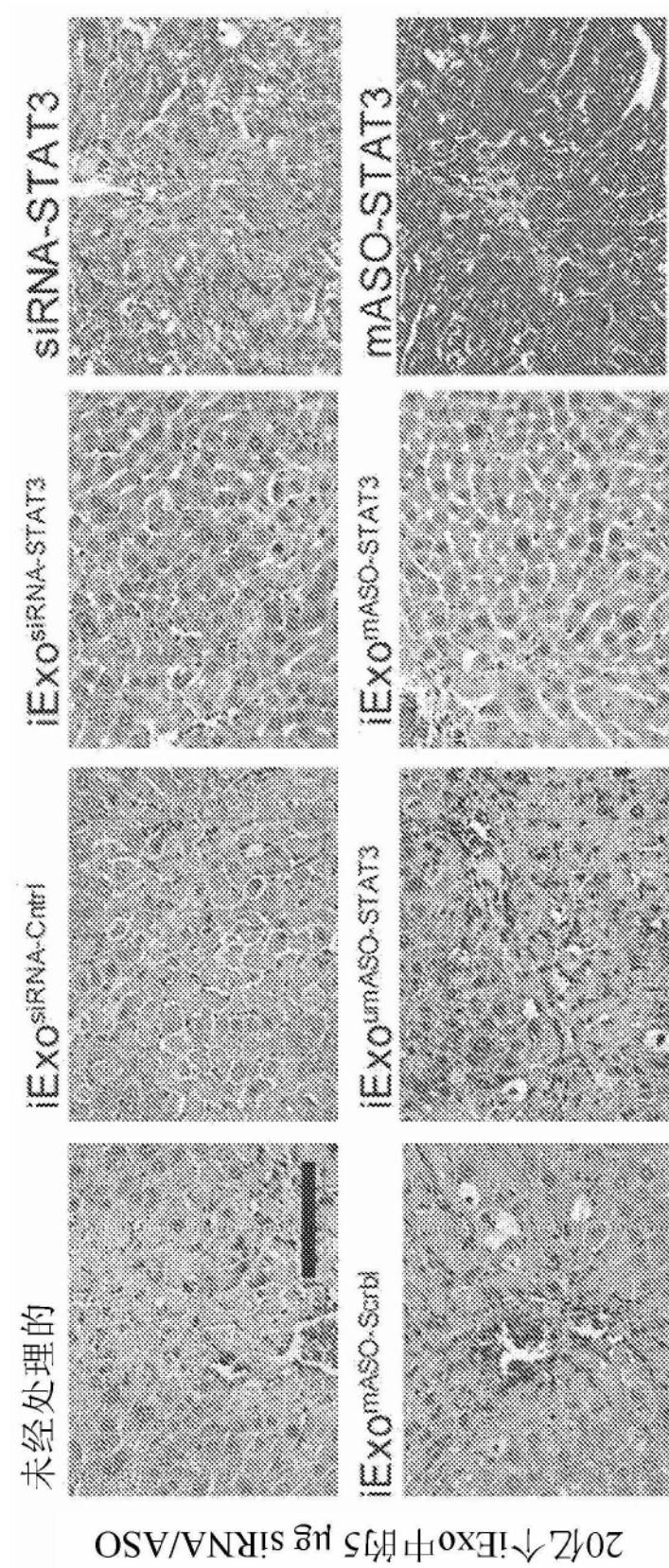


图7I

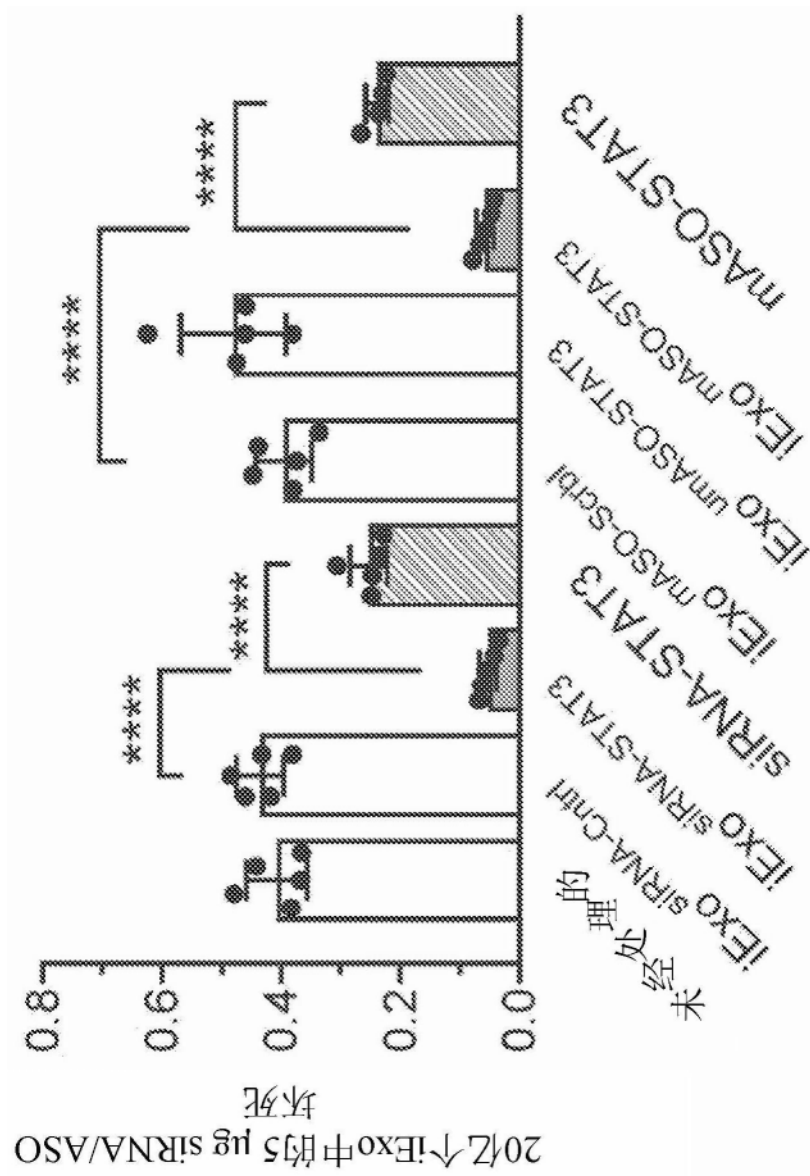


图7J

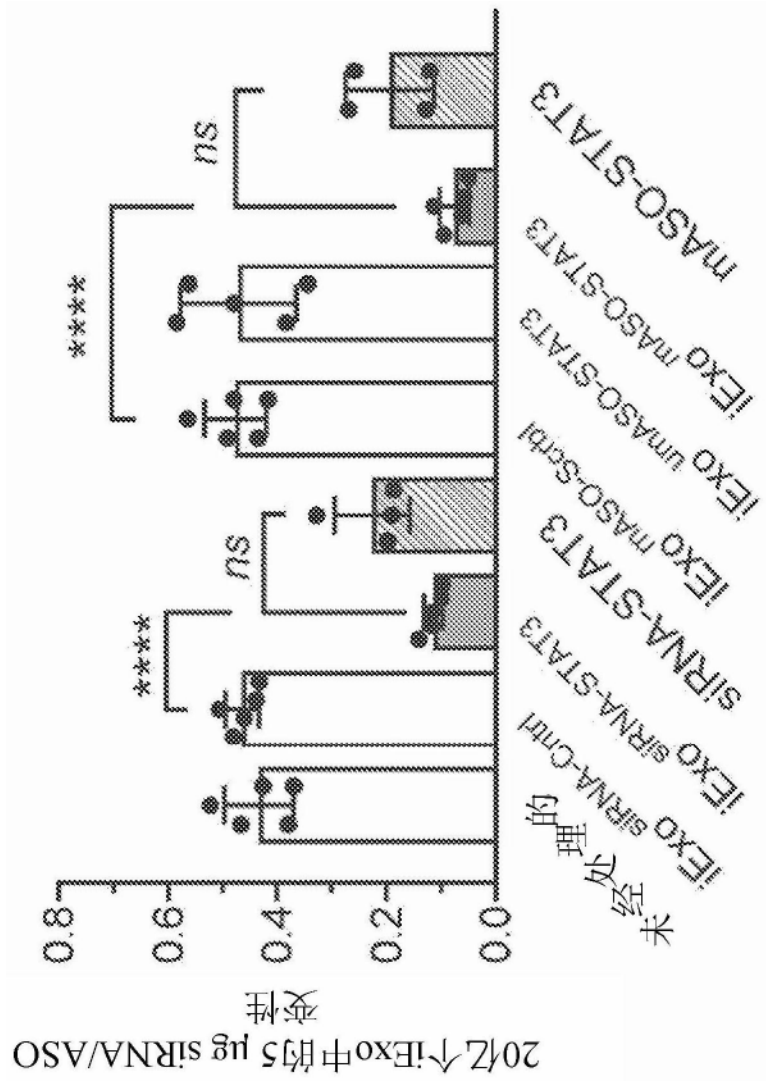


图7K

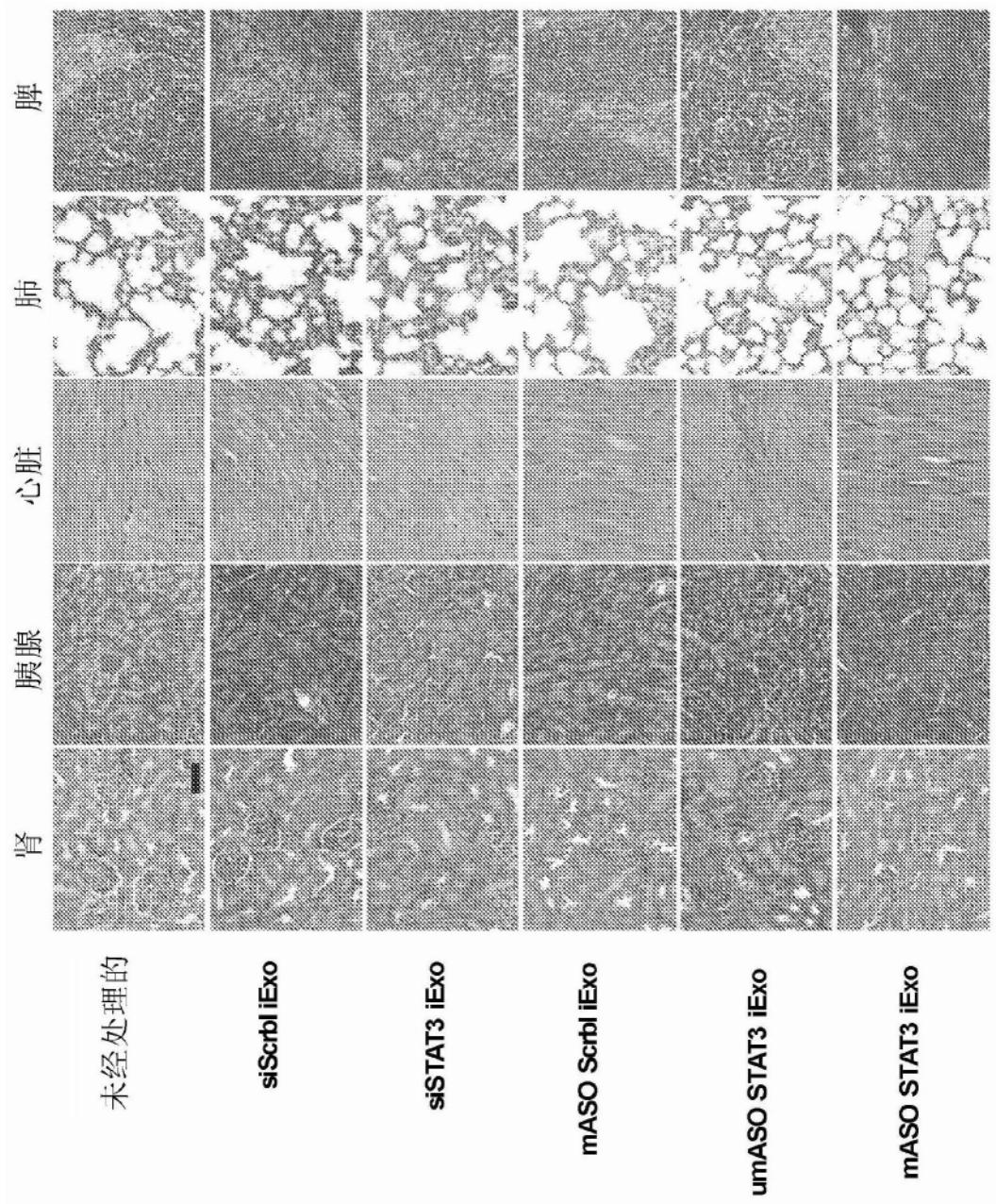


图8A

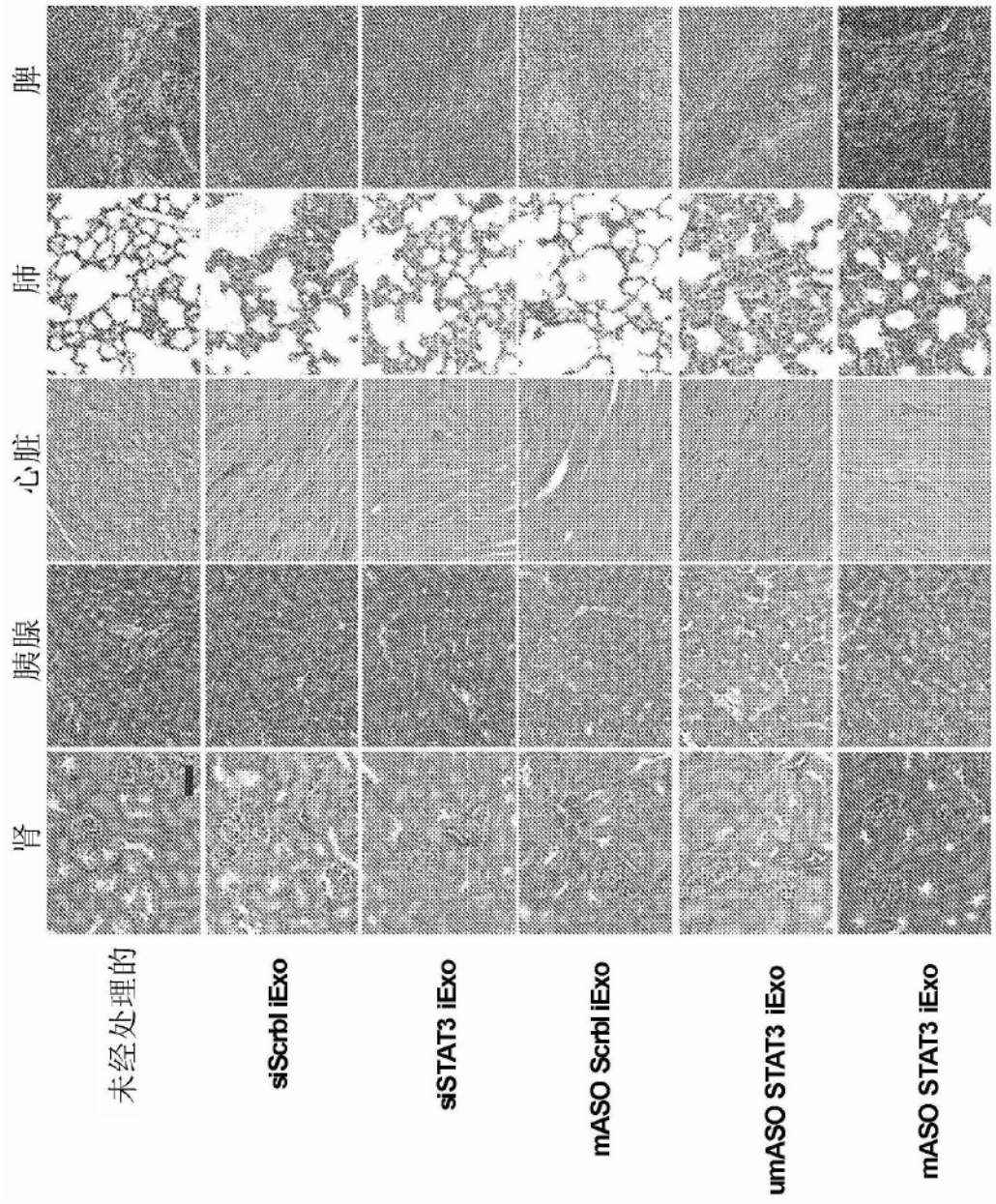


图8B

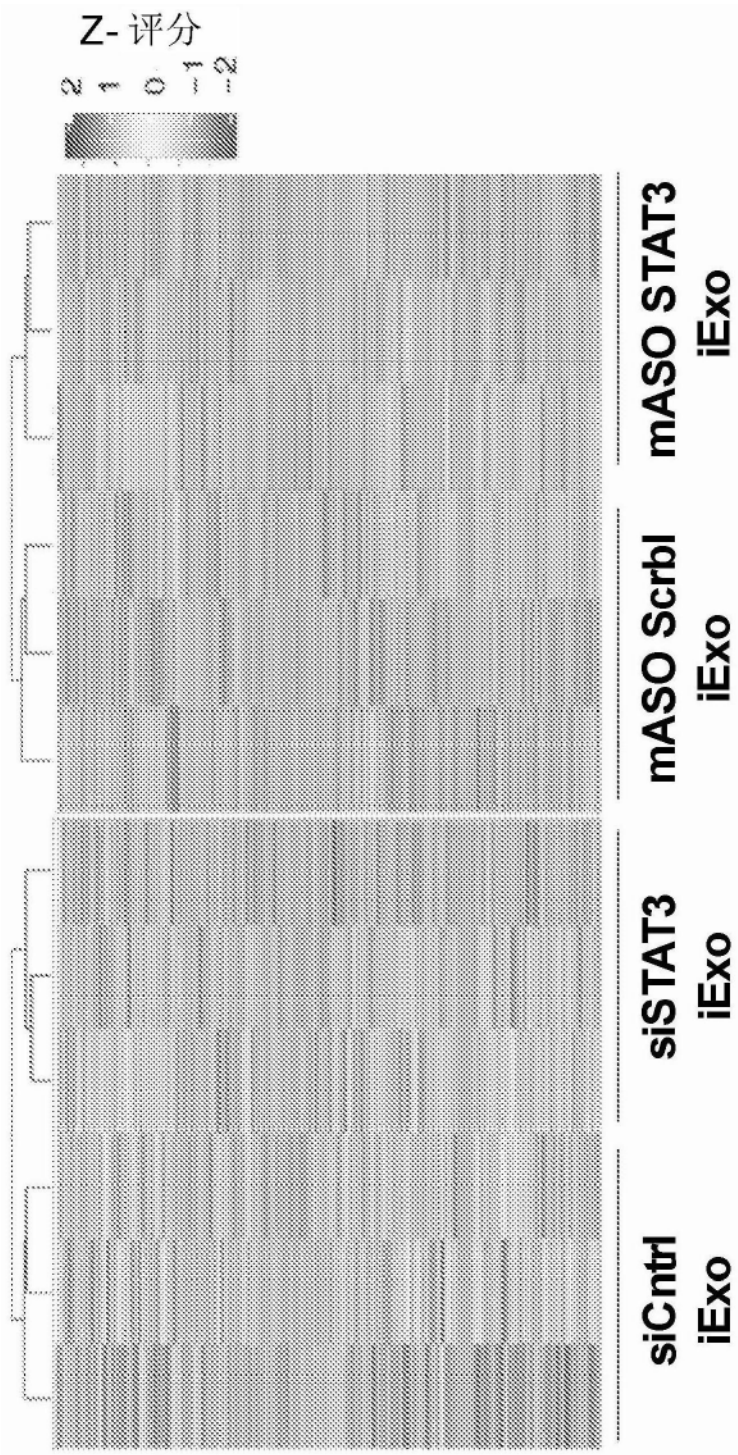


图9A

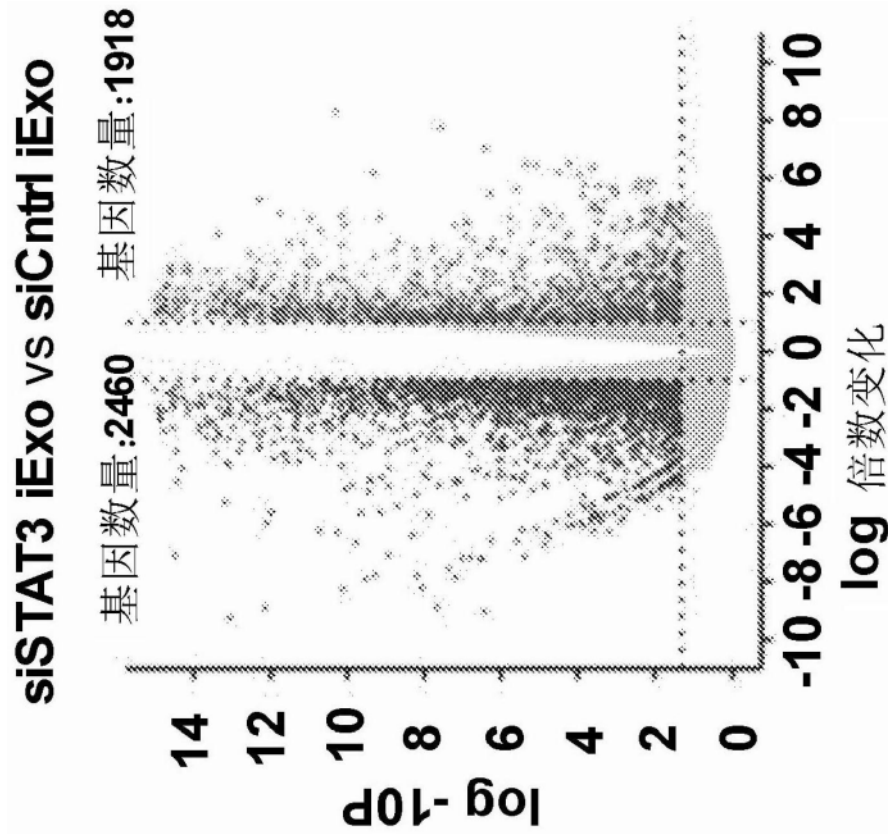


图9B

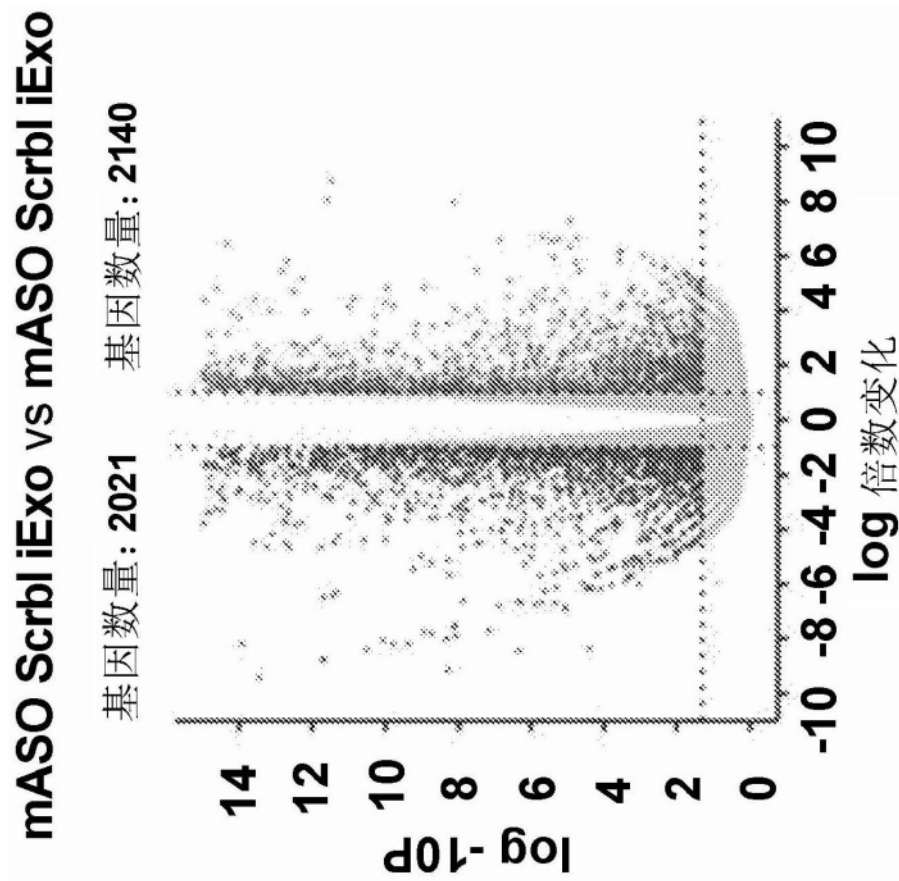


图9C

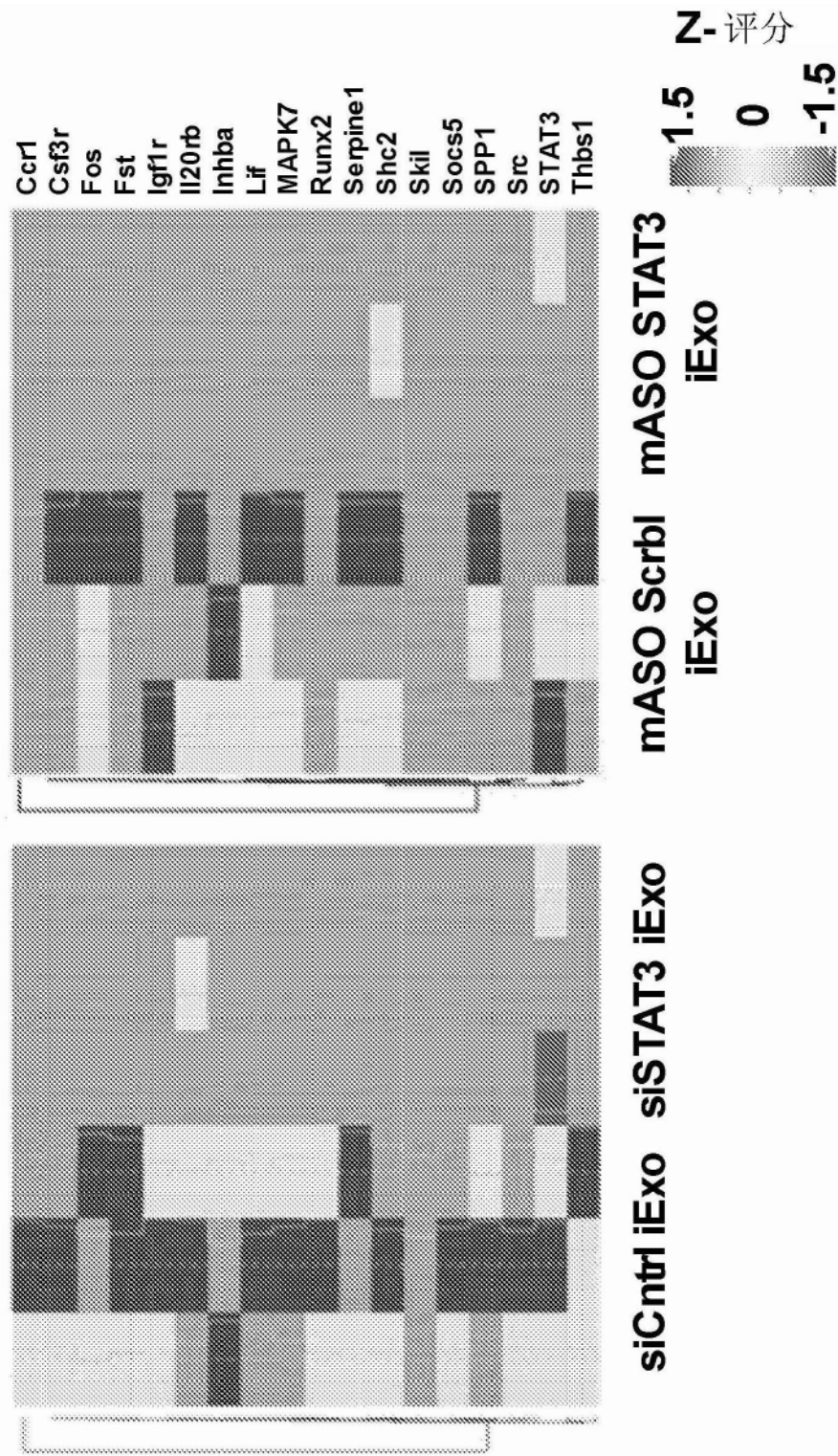


图9D

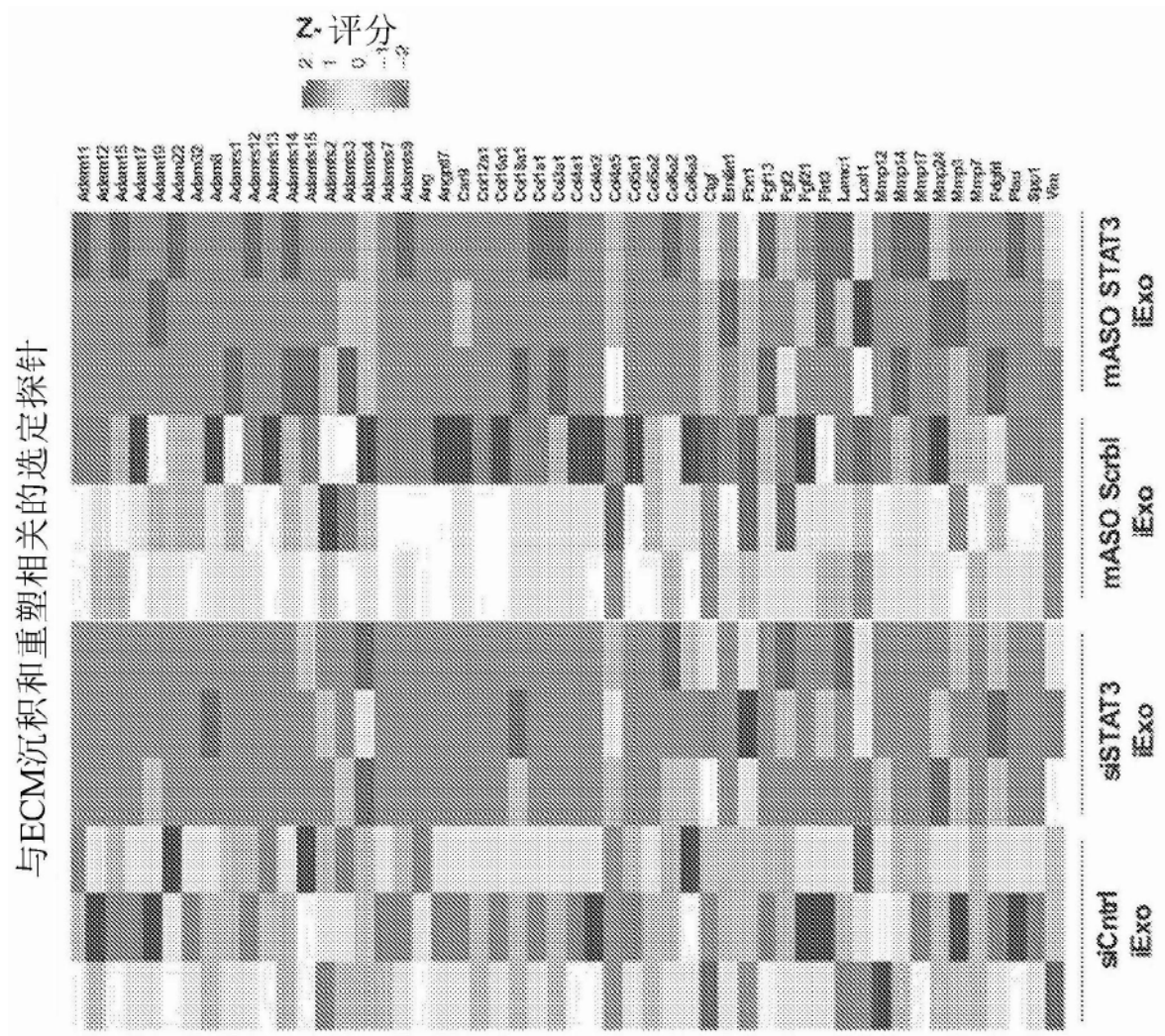


图9E

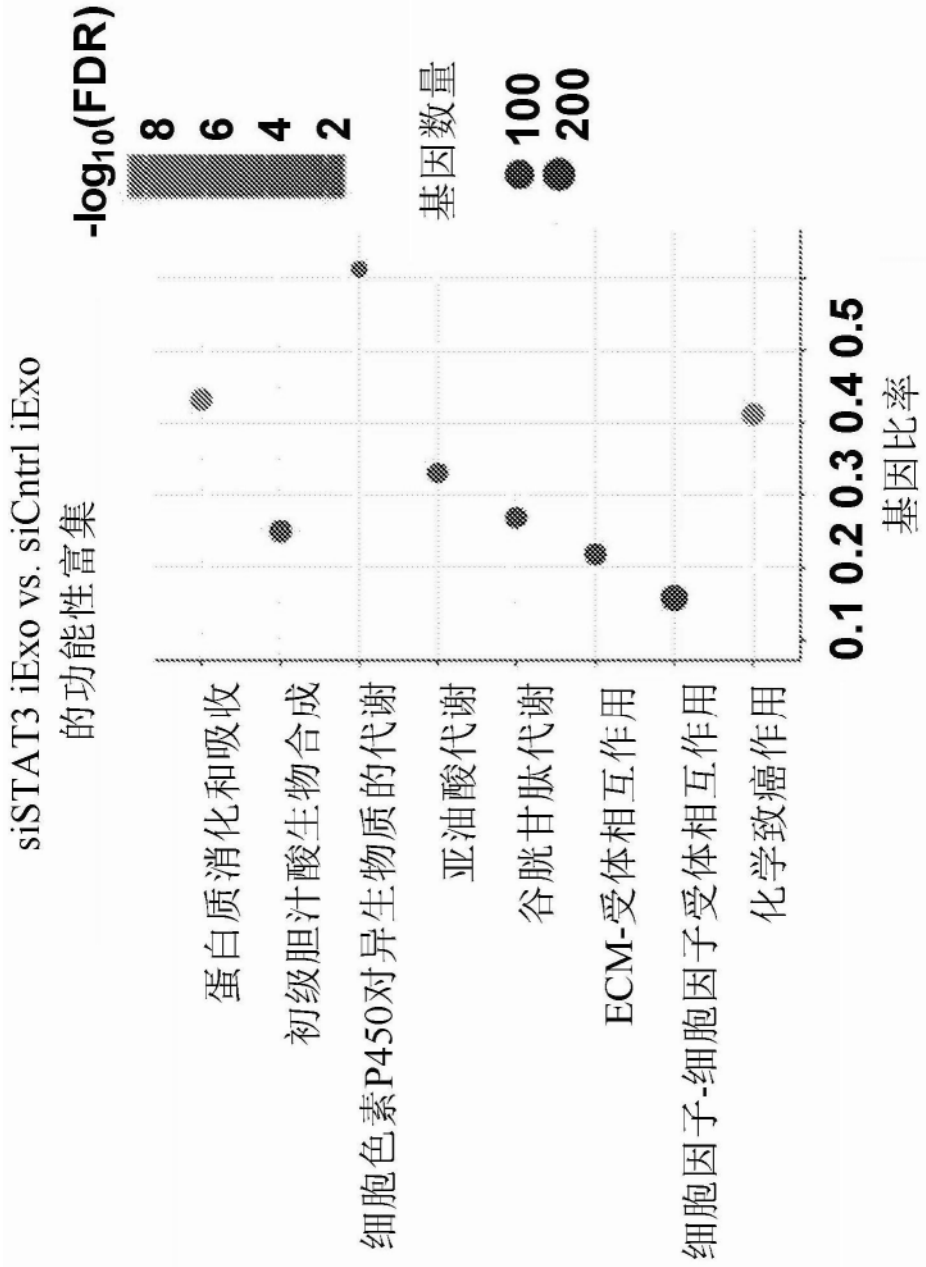


图9F

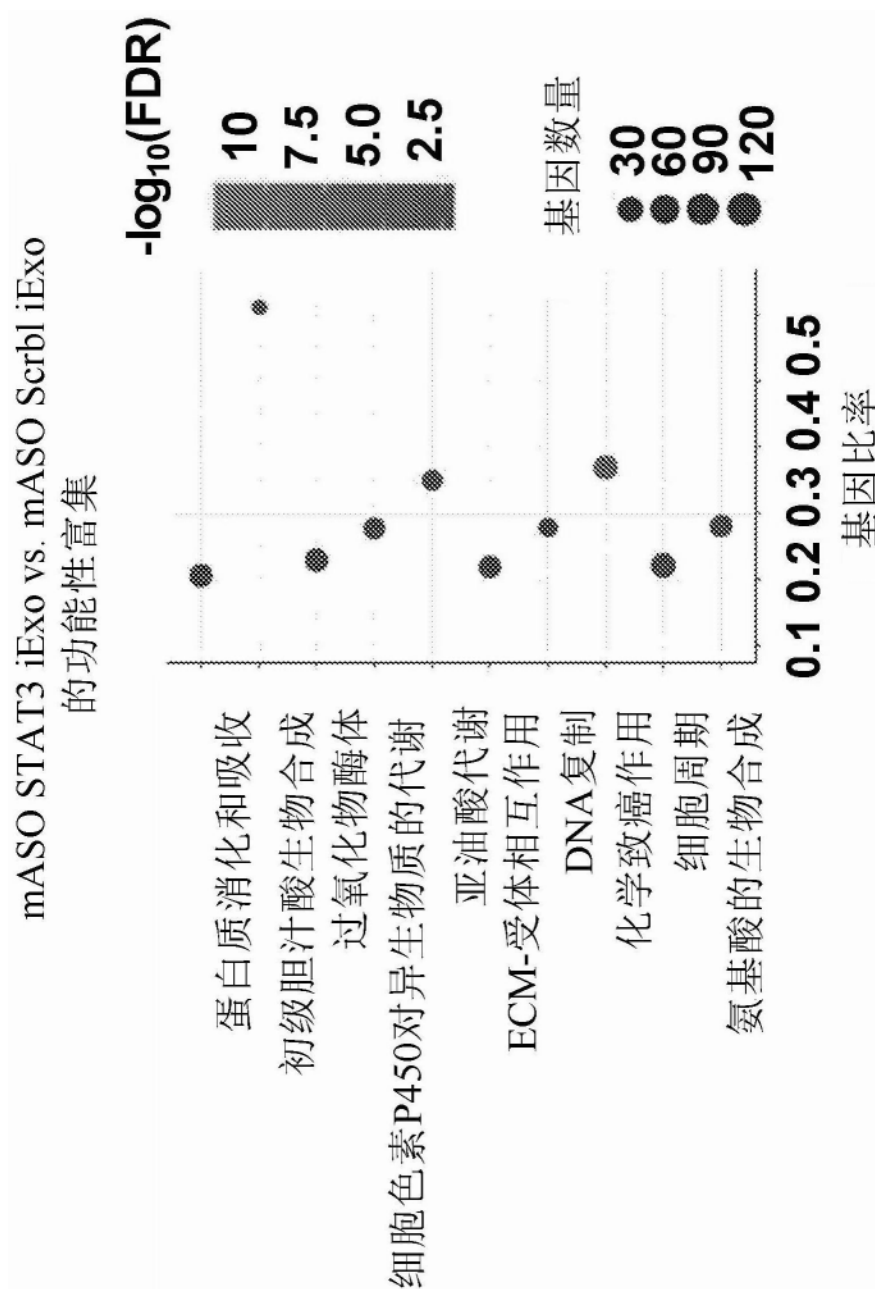


图9G

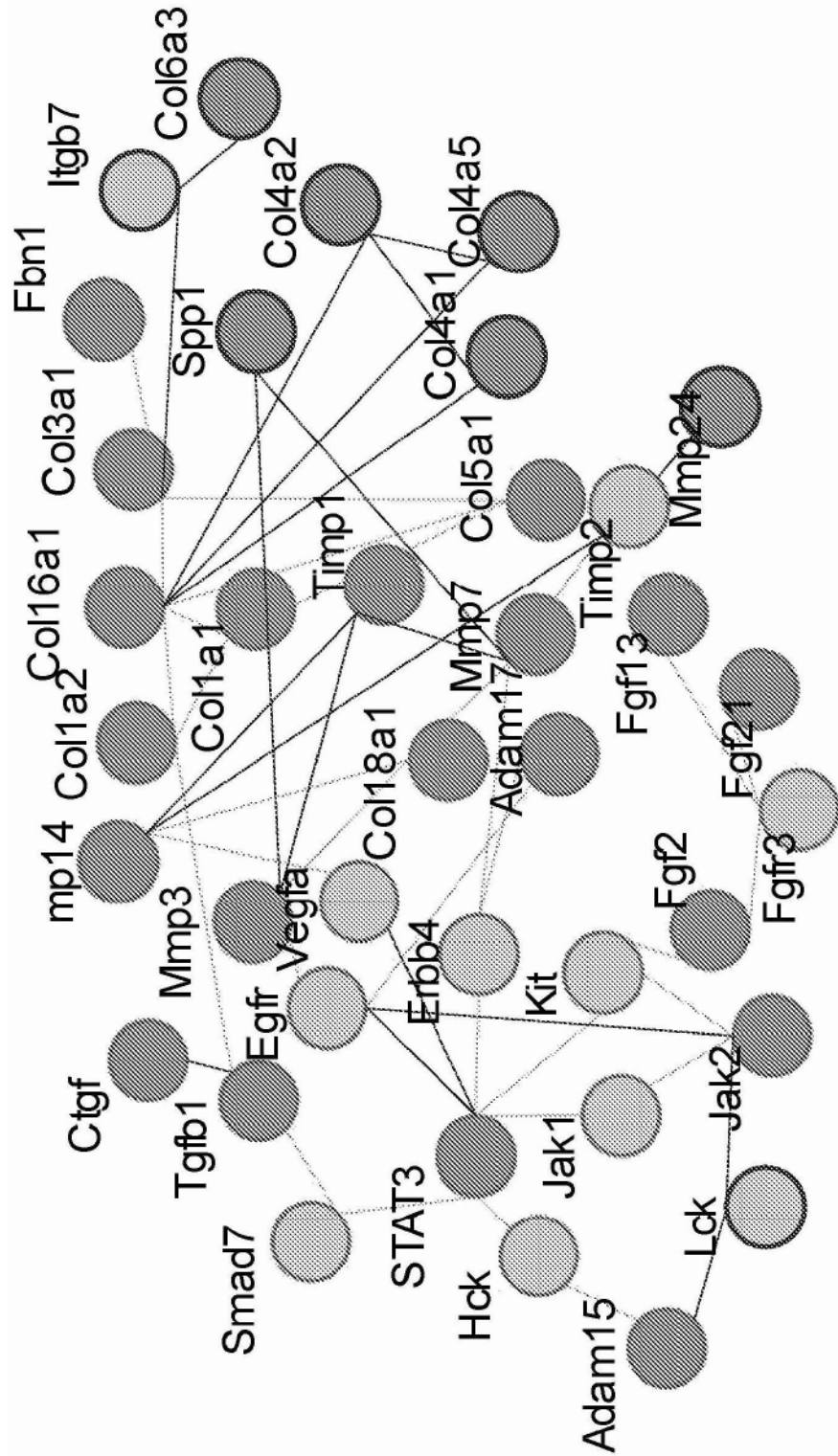


图9H

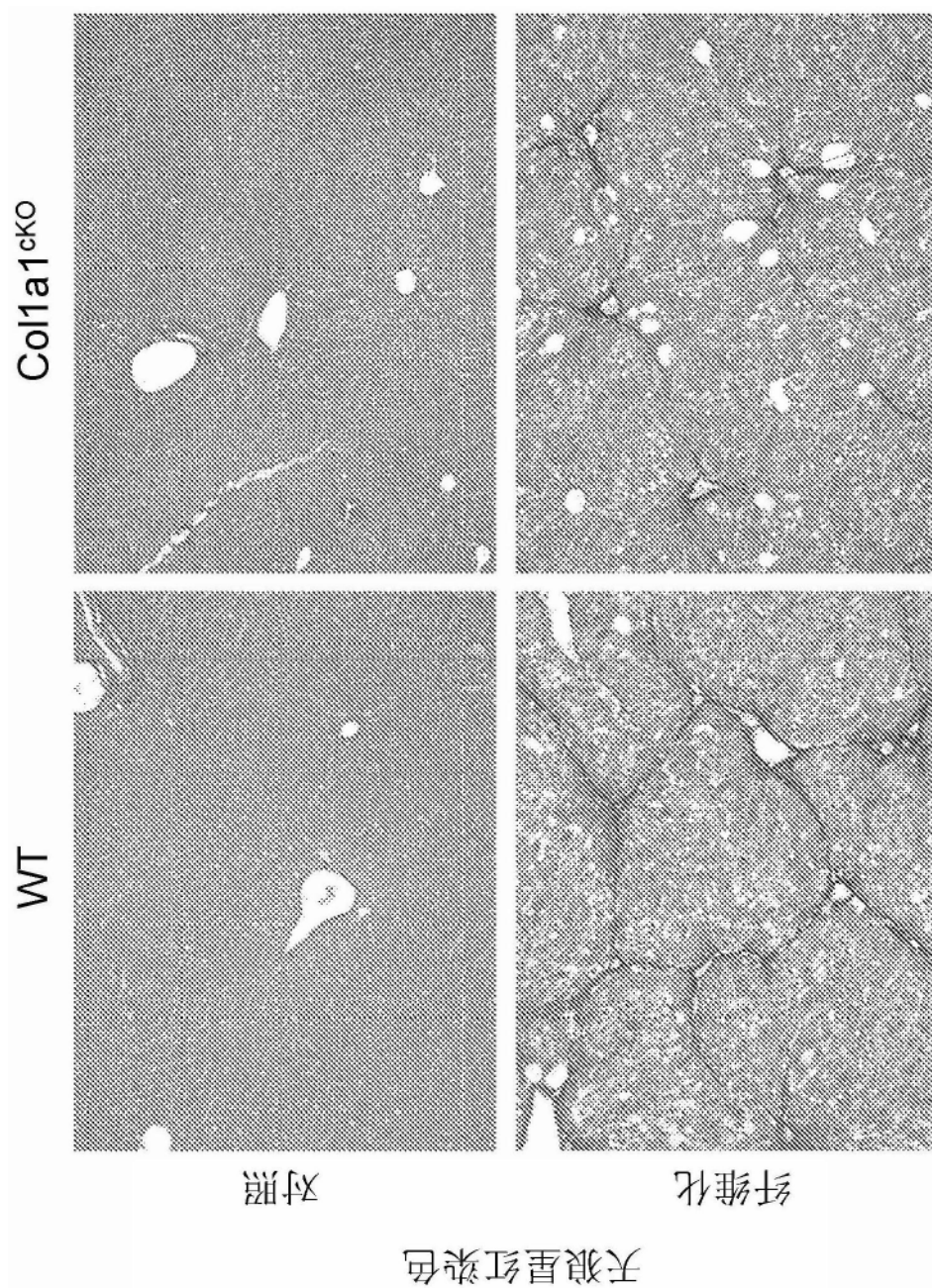


图10A

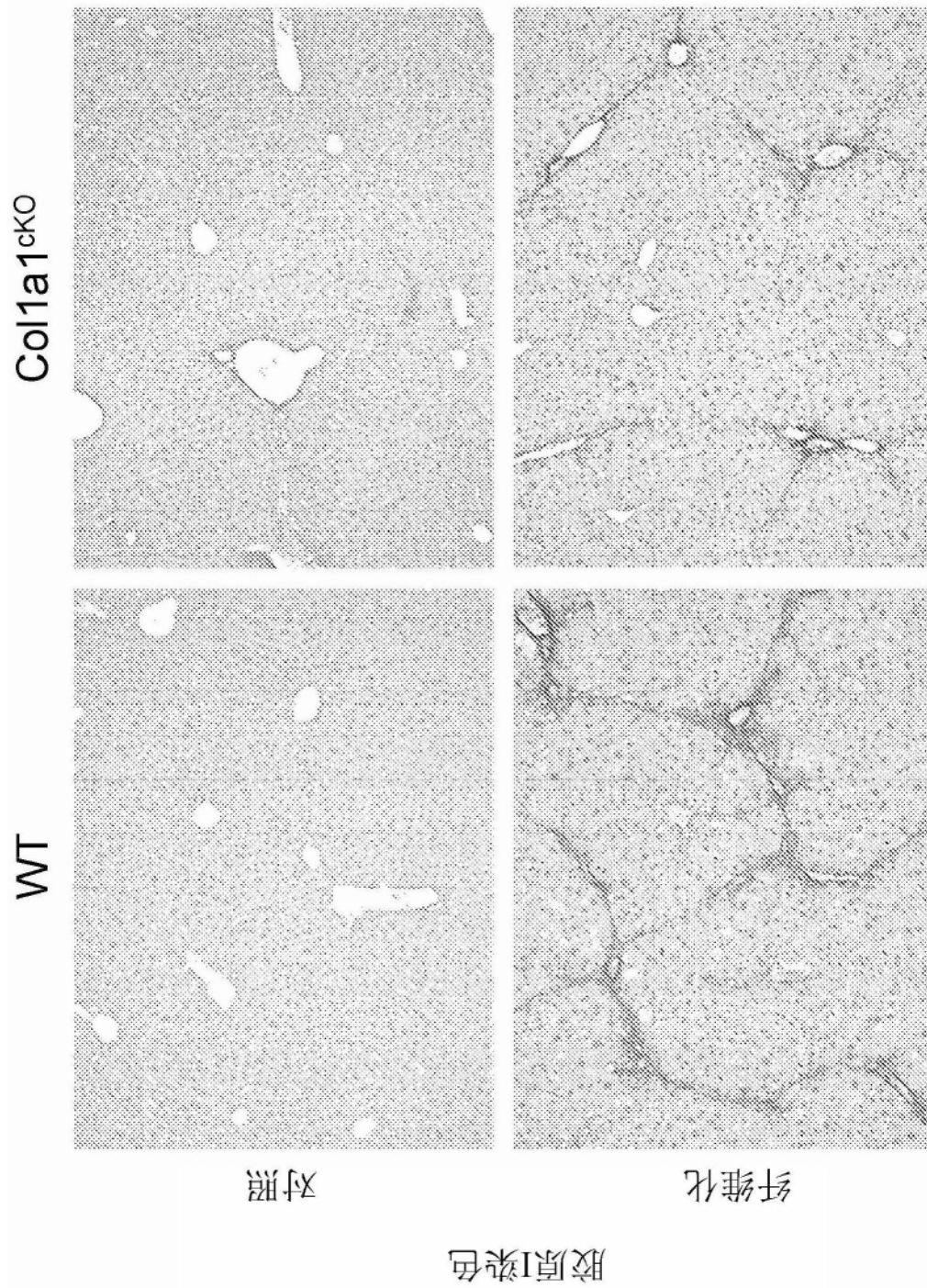


图10B

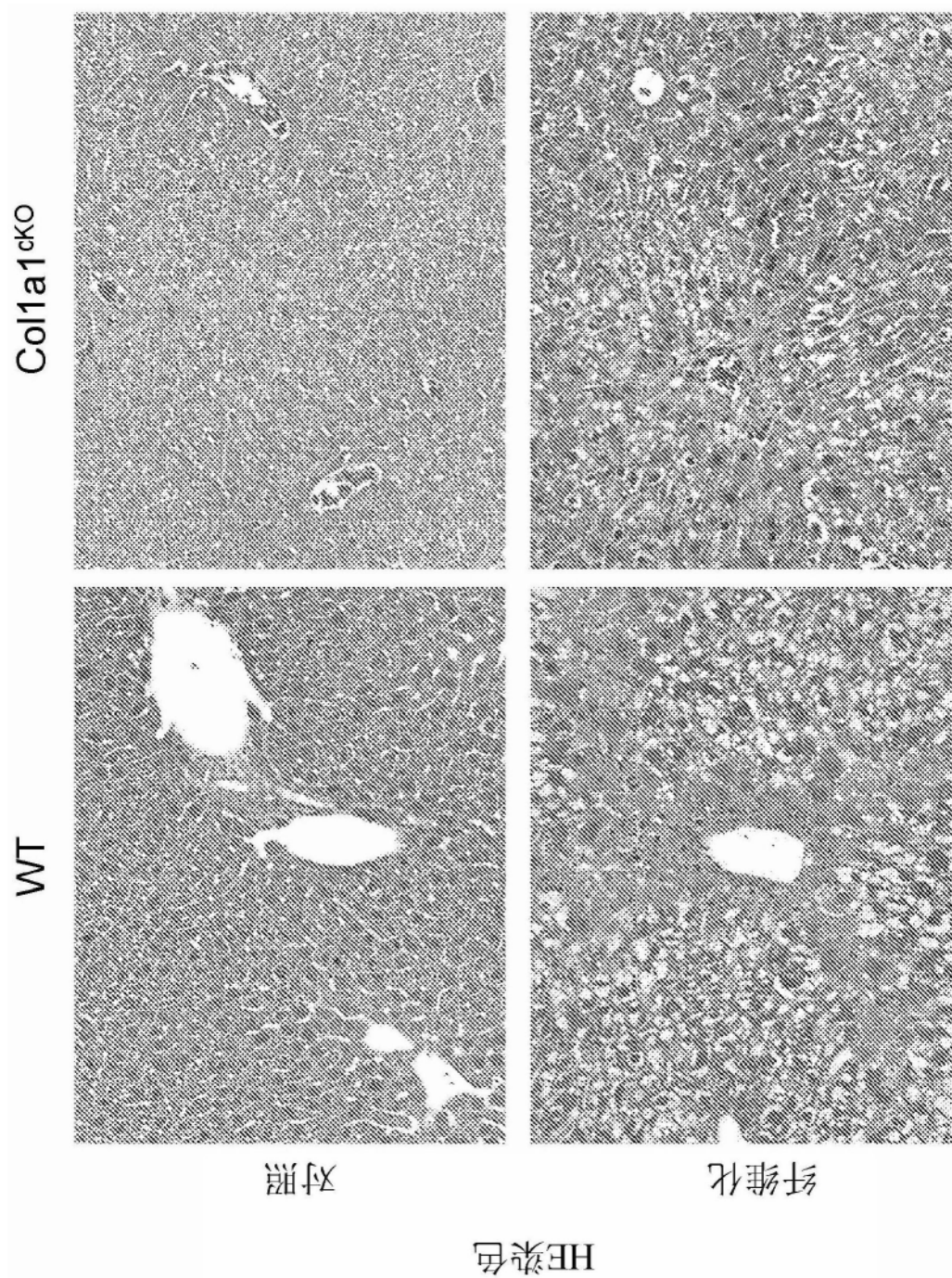


图10C

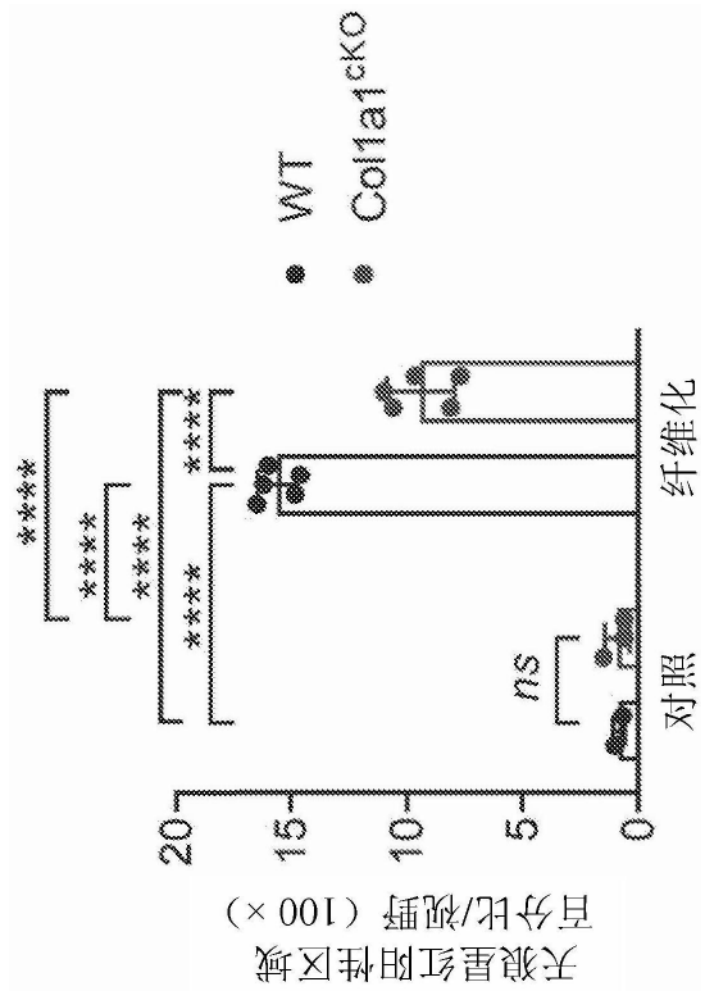


图10D

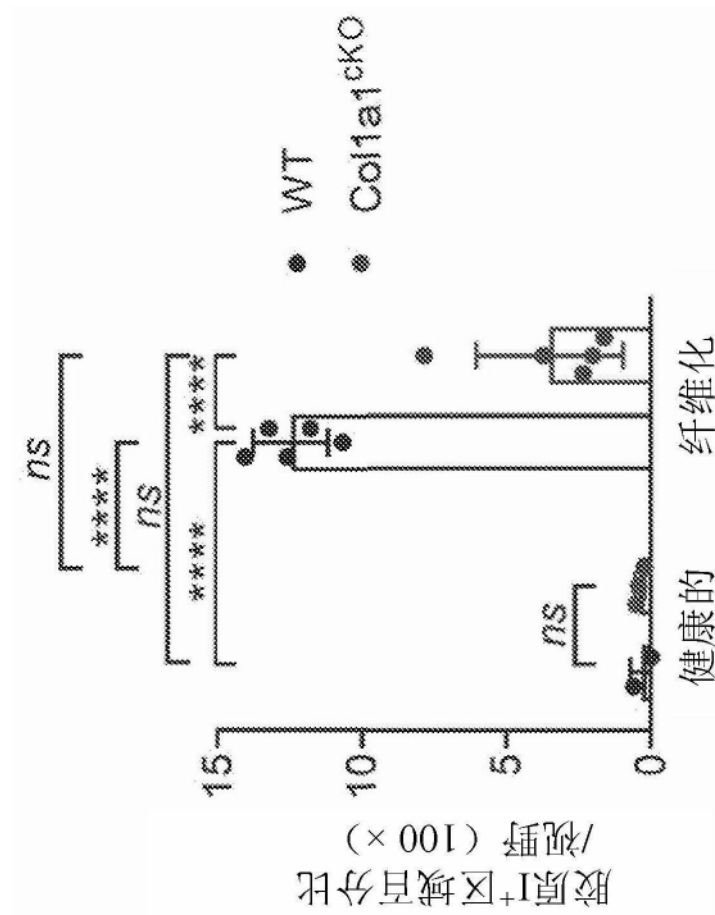


图10E

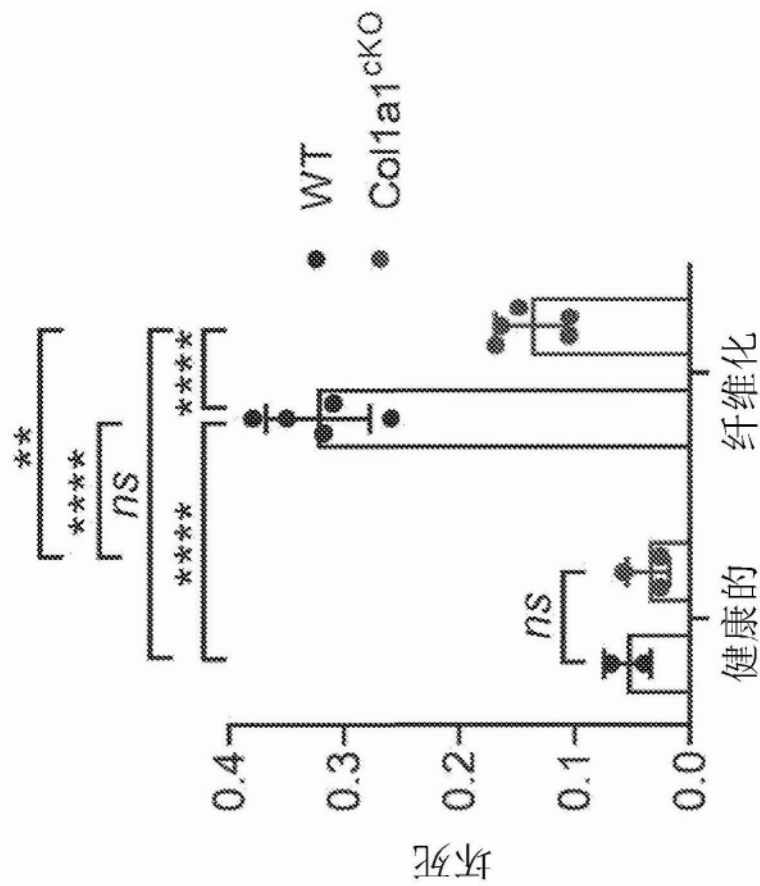


图10F

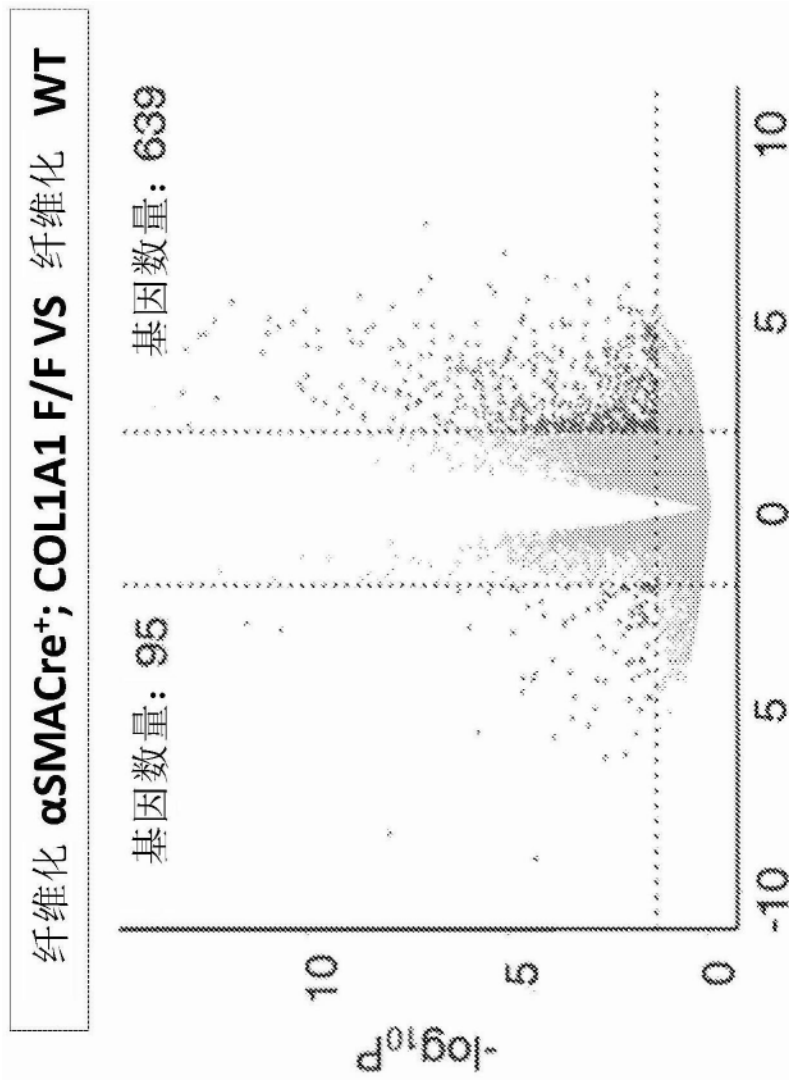


图10G

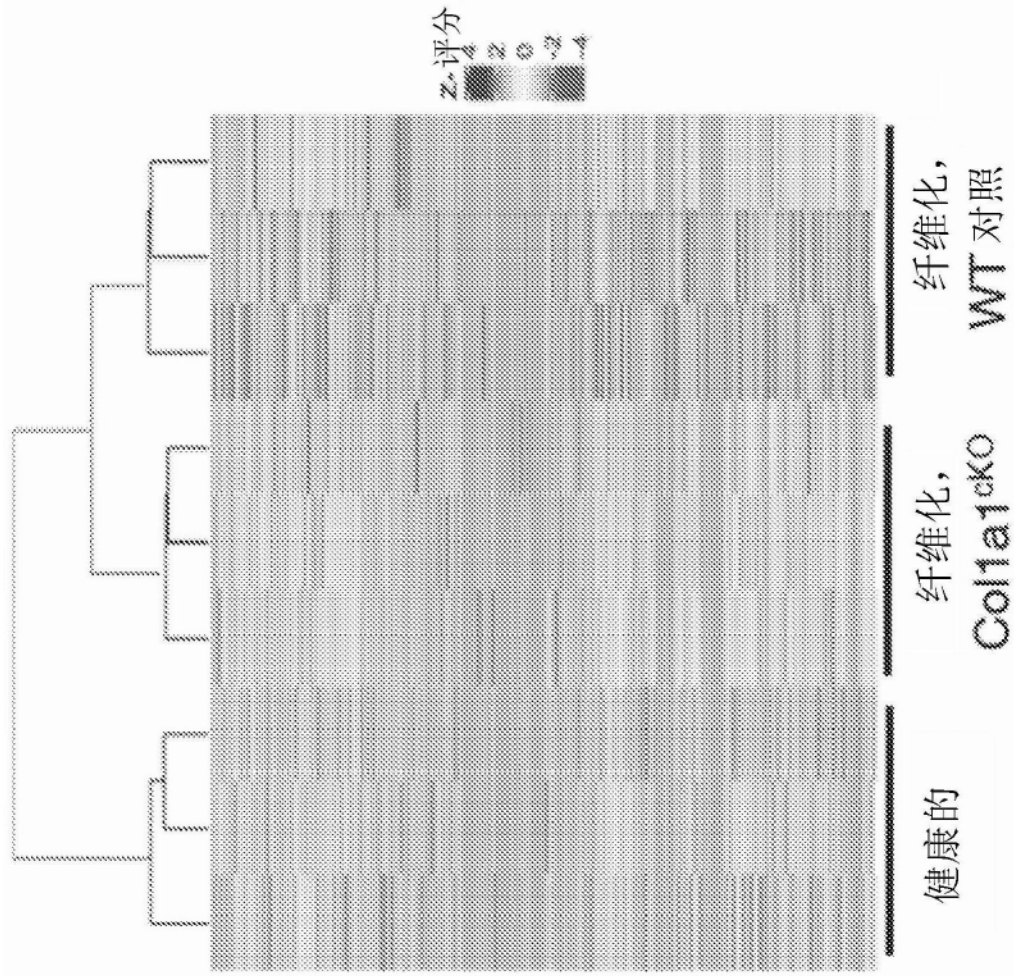


图10H