



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111065733 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201880057602.7

(72)发明人 T·赫米斯顿 M·巴宗

(22)申请日 2018.09.05

C·H·康泰格 J·哈迪
M·卡纳达

(30)优先权数据

62/554,530 2017.09.05 US

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

62/554,533 2017.09.05 US

代理人 王永伟

62/569,411 2017.10.06 US

(51)Int.Cl.

62/569,403 2017.10.06 US

C12N 5/09(2006.01)

62/584,565 2017.11.10 US

C12N 9/74(2006.01)

62/593,014 2017.11.30 US

C12N 9/64(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.05

C07K 14/755(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/049619 2018.09.05

C07K 19/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/050998 EN 2019.03.14

C12N 5/071(2006.01)

(71)申请人 角斗士生物科学公司

C12N 5/0775(2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

C12N 5/0789(2006.01)

C12N 5/073(2006.01)

C07K 14/745(2006.01)

A61K 38/36(2006.01)

权利要求书2页 说明书41页 附图23页

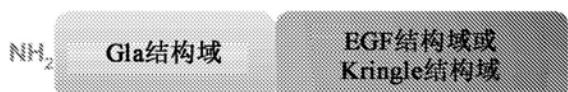
(54)发明名称

靶向外泌体的方法

GLA组分的实施例

(57)摘要

本公开涉及一种靶向胞外囊泡的方法，所述方法采用包括GLA结构域的分子和从本文所公开的方法中获得的或可从其获得的胞外囊泡。



1. 一种用于用表面暴露的磷脂酰丝氨酸靶向胞外囊泡的方法,所述方法包括将包括以下的分子引入到可以包括所述胞外囊泡的流体中的步骤:

γ-羧基谷氨酸组分 (GLA组分),所述GLA组分包括GLA结构域或其活性片段,并且不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胞外囊泡是外泌体。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述外泌体的直径处于30nm到100nm的范围内。

4. 根据权利要求1到3中任一项所述的方法,其中所述囊泡的密度处于1到1.5g/ml的范围内,如1到1.2g/ml,具体地1.13到1.19g/ml。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述囊泡包括独立地选自以下的一种或多种跨膜蛋白:Lamp-1、Lamp-2、CD13、CD86、脂酶结构蛋白、突触融合蛋白-3、CD2、CD36、CD40、CD40L、CD41a、CD44、CD45、ICAM-1、整联蛋白α4、LiCAM、LFA-1、Mac-1α和β、Vti-IA和B、CD3ε和ζ、CD9、CD18、CD37、CD53、CD63、CD81、CD82、CXCR4、FcR、GluR2/3、HLA-DM (MHC II)、免疫球蛋白、MHC-I或MHC-II组分、TCRβ、四次跨膜蛋白以及其中两种或更多种的组合。

6. 根据权利要求1到5中任一项所述的方法,其中所述囊泡释放自不健康的细胞,例如凋亡细胞、坏死细胞、癌细胞、病原体感染细胞(如病毒感染细胞、细菌感染细胞或寄生虫感染细胞)。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述细胞是癌细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述细胞是癌症干细胞。

9. 根据权利要求1到8中任一项所述的方法,其中所述流体包括离体患者样品,例如血液样品、从囊肿或肿瘤抽出的流体、均质化活组织检查或类似物。

10. 根据权利要求1到9中任一项所述的方法,其中GLA结构域或其活性片段独立地选自凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、骨钙蛋白、基质GLA蛋白、GAS6、转甲状腺素蛋白、骨膜蛋白、富含脯氨酸的GLA 1、富含脯氨酸的GLA 2、富含脯氨酸的GLA 3和富含脯氨酸的GLA 4。

11. 根据权利要求1到10中任一项所述的方法,其中GLA结构域或其活性片段来自蛋白S,例如包括SEQ ID NO:1中所示的序列。

12. 根据权利要求1到12中任一项所述的方法,其中GLA结构域组分进一步包括EGF结构域,例如钙结合EGF结构域。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中构建体包括选自以下的EGF结构域:凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、骨钙蛋白、基质GLA蛋白、GAS6、转甲状腺素蛋白、骨膜蛋白、富含脯氨酸的GLA 1、富含脯氨酸的GLA 2、富含脯氨酸的GLA 3和富含脯氨酸的GLA 4。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述构建体包括选自蛋白S的EGF结构域。

15. 根据权利要求1到14中任一项所述的方法,其中所述GLA组分包括SEQ ID NO:6中所示的序列或其衍生物,其中His标签不存在,具体地SEQ ID NO:6。

16. 根据权利要求1到15中任一项所述的方法,其中所述GLA结构域组分进一步包括Kringle结构域。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述Kringle结构域来自选自包括以下的组的蛋白质:激活转录因子2(ATF);因子XII(F12);凝血酶(F2);透明质酸结合蛋白2(HABP2);肝细

胞生长因子 (HGF) ;肝细胞生长因子激活剂 (HGFAC) ;Kremen蛋白1 (KREMEN1) ;KREMEN2;脂蛋白 (a) (LPA) ;LPAL2;巨噬细胞刺激蛋白 (MSP或MST1) ;磷酸肌醇-3-激酶-相互作用蛋白1 (PIK3IP1) ;组织型纤溶酶原激活剂 (PLAT) ;尿激酶 (PLAU) ;血纤维蛋白溶酶 (PLG) ;PRSS12;蛋白酪氨酸激酶跨膜受体ROR1 (ROR1) ;以及蛋白酪氨酸激酶跨膜受体ROR2 (ROR2) 。

18. 根据权利要求1到17中任一项所述的方法,其中所述GLA组分与有效负载连接。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述GLA组分与所述有效负载缀合。
20. 根据权利要求1到19中任一项所述的方法,其中所述GLA组分是融合蛋白的一部分。
21. 根据权利要求19所述的方法,其中有效负载包括可检测标记。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述标记选自荧光蛋白(包含荧光探针(如罗丹明染料、FITC、FAM、CY5))、生物素、酶、标签(例如,HIS-标签、FLAG-标签、myc-标签)、放射性核素(具体地放射性碘化物、放射性同位素,如^{99m}Tc)、发光标记或可以通过NMR或ESR光谱法检测的化合物,其中可检测标记处于分子信标中。
23. 根据权利要求1到22中任一项所述的方法,其中所述有效负载是珠、板或标签,例如可分离的珠,如磁珠。
24. 根据权利要求18到23所述的方法,其中所述有效负载通过接头与所述GLA组分连接。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述接头是可裂解的。
26. 根据权利要求1到25中任一项所述的方法,其中所述方法包括提供富集的囊泡群的另外的步骤。
27. 根据权利要求1到26中任一项所述的方法,其中所述方法包括分离所述囊泡的步骤。
28. 根据权利要求1到21中任一项所述的方法,其中包括所述GLA组分的分子是治疗剂。
29. 根据权利要求17到21和29中任一项所述的方法,其中所述有效负载包括药物、化疗剂、肽(包含钉合肽)或生物治疗剂,例如抗病毒药、抗细菌药、抗寄生虫药剂、抗癌药、抗癌疗法或溶瘤病毒或病毒载体。
30. 根据权利要求1到21、29和30中任一项所述的方法,其中所述有效负载包括毒素、聚合物(例如,合成的或天然存在的聚合物)、生物活性蛋白(例如,酶、其它抗体或抗体片段)、药物(小分子(化学实体))、c、核酸和其片段(例如,DNA、RNA和其片段)、金属螯合剂、纳米颗粒或其中两种或更多种的组合。
31. 根据权利要求1到22和24到30中任一项所述的方法,其包括向癌症患者施用包括所述GLA组分和有效负载的分子。
32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述癌症是上皮癌,例如结肠直肠癌、睾丸癌、肝癌、胆道癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、胃癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、膀胱癌、脑癌、头颈癌或肺癌,或可替代地,所述癌症可以是血液癌,例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和慢性骨髓增生性疾病,如AML、CML、ALL和CLL。
33. 一种囊泡或囊泡群,其能够从根据权利要求1到32中任一项所述的方法中获得。

靶向外泌体的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年9月5日提交的美国临时申请62/554,530号、于2017年9月5日提交的美国临时申请第62/554,533号、于2017年10月6日提交的美国临时申请第62/569,403号、于2017年10月6日提交的美国临时申请第62/569,411号、于2017年11月10日提交的美国临时申请62/584,565号以及于2017年11月30日提交的美国临时申请第62/593,014号的权益，所述美国临时申请中的每个美国临时申请通过引用以其全文结合在此。

[0003] 序列表的结合

[0004] 本申请包含通过EFS-web以电子方式提交的序列表，所述序列表用作纸质副本和计算机可读形式(CRF)两者，并且由以“ST-CT7-PCT_sequence.tex”命名的文件组成，所述文件创建于2018年9月5日，其大小为9,823字节，并且通过引用以其全文结合在此。

[0005] 本公开涉及一种靶向胞外囊泡的方法，所述方法采用包括GLA结构域的分子和从本文所公开的方法中获得的或可从其获得的胞外囊泡。

背景技术

[0006] 胞外囊泡(也称为微囊泡或微粒)在历史上被认为是用于细胞排出废物的载剂。然而，最近已经证实，事实上胞外囊泡参与至关重要的细胞间通讯。

[0007] 已经证明，胞外囊泡可以源自几乎所有的哺乳动物细胞，包含健康细胞、干细胞和患病细胞，如癌细胞。胞外囊泡极其稳定，并且几乎可以存在于所有体液中，包含：血浆、唾液、尿液、胆汁、滑液、精液和母乳。

[0008] 患病细胞(如癌细胞)被认为采用胞外囊泡(如外泌体)以制备和播种转移位点。病原体感染细胞可以采用胞外囊泡以传播感染。此外，已知细菌细胞释放胞外囊泡。

[0009] 人们对研究、理解和利用这些胞外囊泡非常感兴趣，尤其是那些参与致病过程的胞外囊泡。已经证明，这些囊泡可以作为干细胞的替代物用于治疗。

[0010] 然而，存在某些实际困难，因为囊泡非常小并且在体内以低浓度存在。此外，很少有标记来区分源自疾病细胞的胞外囊泡和源自正常细胞的胞外囊泡。更复杂的是，在体内这些微小的实体处于复杂的环境中，包括生物分子、因子、离子、矿物质等的混杂。因此，即使分离和/或监测这些胞外囊泡也是挑战。

[0011] 分离囊泡可能需要七个或更多个步骤，并且所采用的主要参数通常是大小。由于胞外囊泡的直径可能低于300nm，并且因为其具有低折射率，所以胞外囊泡低于许多目前使用的技术的检测范围。已经开发了许多利用纳米技术和微流体的微型系统来加速胞外囊泡分析。这些新系统包含一个microNMR装置、一个纳米等离子体芯片和一个用于蛋白质谱的磁电化学传感器；以及用于RNA检测的一体化流体盒。流式细胞术是一种用于检测悬浮液中的胞外囊泡的光学方法。然而，由于有限的灵敏度和潜在的测量伪迹，如群检测，因此流式细胞术检测单个胞外囊泡的适用性仍然不足。用于检测单个胞外囊泡的其它方法是原子力显微镜、纳米颗粒跟踪分析法、显微拉曼光谱学、可调电阻脉冲传感和透射电子显微镜法。

[0012] 除了出于研究和/或诊断目的而分离胞外囊泡的机会之外，还认为这些胞外囊泡

可能适合用作天然载剂以加载有效负载,靶向和/或治疗一系列疾病。然而,当前在实现加载货物的潜力和靶向部分方面存在重大挑战:

[0013] • 进入这些胞外囊泡-

[0014] o如蛋白质、核酸-天然和非天然寡核苷酸两者-小分子、酶、探针,以定义胞外囊泡中的含量以用于治疗、诊断/预后目的等;

[0015] • 并且在这些胞外囊泡上-

[0016] o开发、改变或增强靶向性、展示治疗性蛋白质、标记并且例如收集胞外囊泡以用于分析或操纵,

[0017] • 一些微RNA已经被证明能进入囊泡,但迄今为止,尚无稳健的机制可将物质带入囊泡,

[0018] o例如,由于电穿孔而受损、转染试剂的整合可能会损害胞外囊泡的商业用途,

[0019] o病毒载体的低效率转导,通过改变胞外囊泡的方式加载或分离也可能损害诊断或治疗潜力等(在Vader等人,《先进药物递送评论(Adv Drug Delivery Rev)》106:148-156,2016中的评论;Sutaria等人,《药学研究(Pharm Res)》34:1053-1066,2017;Lu等人,《欧洲药物与生物制药杂志(Eur J Pharm and Biopharm)》119:381-395,2017),

[0020] o皂昔也已经被建议作为增加胞外囊泡渗透性的试剂。然而,皂昔具有复杂的生物活性,包含溶血活性。皂昔Quil A和QS-21的部分用作疫苗佐剂,以增加对抗原的免疫反应。因此,皂昔的使用不是简单的。

[0021] 第三,靶向胞外囊泡中的致病物质和信号以减少发病机制的传播可能是有用的。

[0022] 本文的公开内容解决了以上问题。

[0023] 令人惊讶地,从致病细胞(例如,癌细胞、细菌细胞等)释放的那些胞外囊泡具有表面暴露的磷脂酰丝氨酸。暴露的磷脂酰丝氨酸可以例如下调对“致病性”囊泡的免疫反应。尽管不希望受到理论的束缚,但可能的是“致病性胞外囊泡”的特征在于存在暴露的磷脂酰丝氨酸,而不是正常健康的胞外囊泡,所述正常健康的胞外囊泡没有表面暴露的磷脂酰丝氨酸。

[0024] 磷脂酰丝氨酸在没有催化结构域存在的情况下可以被包括GLA结构域的GLA组分靶向。这些分子可以用于靶向源自凋亡细胞,例如异常、患病/感染细胞的囊泡。

[0025] 更令人惊讶的是,本发明人还表明了GLA组分还结合干细胞(例如,健康的干细胞)。尽管不希望受到理论的束缚,但是这些细胞可以在其表面存在磷脂酰丝氨酸,这可能有助于干细胞的免疫抑制作用和炎症作用。

[0026] 源自具有表面暴露的磷脂酰丝氨酸的细胞的胞外囊泡在其外表面上也具有表面暴露的磷脂酰丝氨酸。因此,GLA组分还可以用于靶向干细胞的胞外囊泡。

[0027] GLA结构域可以与有效负载连接或融合,例如标记、珠、诊断分子、靶向基序和/或治疗剂。这允许隔离、鉴定、追踪和/或通过这些胞外囊泡治疗干预。

[0028] 可替代地,或另外地,有效负载可以是治疗剂,例如药物、生物治疗剂、聚合物或毒素,如治疗性病毒、溶瘤病毒、病毒载体、抗病毒药、抗细菌药、抗寄生虫药剂、抗癌药、抗癌疗法或化疗剂、病毒或病毒载体(如溶瘤病毒)。

[0029] 因此,GLA组分可以用于通过GLA结构域结合表面暴露的磷脂酰丝氨酸将有效负载锚定到胞外囊泡的表面。

[0030] 另外,本发明人有数据表明,本公开中采用的GLA组分可能能够在胞外囊泡内转运附着于其上的有效负载。因此,GLA组分可以用于将有效负载递送到胞外囊泡的内部。

[0031] 这对于治疗和/或诊断用途具有重要的意义,因为已知的和现有的技术以及效应子/报道分子可以重新聚焦并用于监测、分离和治疗性干预囊泡。

[0032] 一旦被标记,可以例如在体内监测囊泡,或使用已知技术(如流式细胞术、磁性分选等)分离囊泡。

[0033] 此外,开始出现的是,特定类型囊泡的存在可以用作某些病理的非侵入性诊断。

[0034] 另外,假定癌症利用囊泡播种并促进转移,然后用疗法破坏、去除或靶向这些囊泡可以是预防或减少转移的方法,例如核苷酸,如可以将RNAi转运到胞外囊泡中以敲除囊泡中携带的活性微RNA。

[0035] 从感染的细胞(如病毒感染的细胞)脱落的囊泡含有来自感染的细胞的细胞物质,例如RNA、蛋白质、脂质和碳水化合物,以及病毒来源的核酸。这些囊泡可以在健康细胞的感染中发挥作用。Altan-Bonnet N., 2016. 胞外囊泡是病毒感染的特洛伊木马,《微生物学当前观点(Curr Opin Microbiol)》32:77-81; Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL., 2015, 在宿主-病原体相互作用中的外泌体和其它胞外囊泡;《欧洲分子生物学会报告(EMBO Rep)》16:24-43; Schorey JS, Harding CV., 2016; 和胞外囊泡以及传染病:旧故事的新复杂性,《临床研究杂志(J Clin Invest)》126:1181-9。

[0036] 囊泡(如外泌体)具有多种特性,使其非常理想地将物质递送到细胞中,包含其体积小(例如,能够穿过血脑屏障)、与细胞质膜融合以递送其内容物的天然能力、稳定的内部环境及其将功能分子递送到受体细胞的能力,所述功能分子包含:核酸(DNA、mRNA和miRNA)、脂质和蛋白质。

[0037] 最近的方法旨在工程化胞外囊泡以用于治疗应用。这些方法包含改变囊泡的内容物或操纵其迁移通路。具体地,已经证明胞外囊泡可以通过减少肿瘤细胞的侵袭、迁移和增殖,增加对化学疗法的敏感性而作为治疗癌症的治疗性囊泡发挥作用,并且可以触发增强的免疫反应和细胞死亡。

[0038] 还出现的是,囊泡可能适合用作疫苗。从病毒感染的细胞释放的囊泡代表了正确折叠和加工的病毒物质的独特来源,所述囊泡是理想的疫苗接种中的抗原。但是,疫苗通常需要佐剂的存在以增强对抗原组分的免疫反应。

[0039] 由于转移效率低、有效负载大小有限、膜中残留赋形剂的存在以及对可以使用什么类型的有效负载的限制,以前使用经典的培养、电穿孔和转染方法来操纵胞外囊泡内容物的尝试受到了限制。因此,要实现这些囊泡的潜力仍然存在一些挑战。因此,需要可以有效地将内容物递送到胞外囊泡上并且进入胞外囊泡中的新方法。

[0040] 本公开通过使胞外囊泡能够被分离、用于诊断目的、治疗干预的靶标并使所述胞外囊泡用于例如通过包含分子(如包含RNA和DNA的核苷酸)的附着或遗传融合来将治疗剂递送到细胞,从而促进利用胞外囊泡的潜力。

[0041] 此外,囊泡表面的磷脂酰丝氨酸表达下调了对囊泡的免疫反应。在胞外囊泡表面结合磷脂酰丝氨酸的GLA组分(未附着有效负载)使囊泡脱离免疫系统。因此,本公开的GLA组分可以用于增加胞外囊泡对免疫系统的可见性。

发明内容

[0042] 现在将在以下段落中概述本公开：

[0043] 1a. 一种用表面暴露的磷脂酰丝氨酸靶向胞外囊泡的方法,所述方法包括将包括以下的分子引入到可以包括所述胞外囊泡的流体(例如,微囊泡、凋亡小体和外泌体)中的步骤:

[0044] γ -羧基谷氨酸组分(GLA组分),所述GLA组分包括GLA结构域或其活性片段,并且不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域。

[0045] 1b. 一种包括与 γ -羧基谷氨酸组分(GLA组分)连接的有效负载的方法,

[0046] 其中所述GLA组分包括GLA结构域或其活性片段,并且不包括来自用于胞外囊泡的治疗或诊断的GLA蛋白的活性催化结构域。

[0047] 1c. 一种包括与 γ -羧基谷氨酸组分(GLA组分)连接的有效负载的分子,

[0048] 其中所述GLA组分包括GLA结构域或其活性片段,并且不包括来自用于制造用于胞外囊泡的治疗或诊断的药物的GLA蛋白的活性催化结构域。

[0049] 2. 根据段落1a、1b或1c所述的供使用的方法或分子,其中所述胞外囊泡的直径处于10nm到1000nm的范围内。

[0050] 3. 根据段落1a、1b、1c或2所述的供使用的方法或分子,其中所述胞外囊泡是外泌体。

[0051] 4. 根据段落1到3中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述胞外囊泡(如外泌体)的直径为1000nm或更小,例如1nm到10 μ m,如10nm到5 μ m、具体地10nm到1 μ m、更具体地20nm到100nm、更具体地30、40、50、60、70、80、90或100nm。

[0052] 5. 根据段落1a、1b或1c到4中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述囊泡的密度处于1到1.5g/ml的范围内,如1到1.2g/ml,具体地1.13到1.19g/ml。

[0053] 6. 根据段落1a、1b、1c到5中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述囊泡包括独立地选自以下的一种或多种跨膜蛋白:Lamp-1、Lamp-2、CD13、CD86、脂酶结构蛋白、突触融合蛋白-3、CD2、CD36、CD40、CD40L、CD41a、CD44、CD45、ICAM-1、整联蛋白 α 4、LiCAM、LFA-1、Mac-1 α 和 β 、Vti-1A和B、CD3 ϵ 和 ζ 、CD9、CD18、CD37、CD53、CD63、CD81、CD82、CXCR4、FcR、GluR2/3、HLA-DM(MHC II)、免疫球蛋白、MHC-I或MHC-II组分、TCR β 、四次跨膜蛋白以及其中两种或更多种的组合。

[0054] 7. 根据段落1a、1b、1c到6中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述囊泡释放自不健康的细胞,例如凋亡细胞、坏死细胞、癌细胞、病原体感染细胞(如病毒感染细胞、细菌感染细胞或寄生虫感染细胞)。

[0055] 8. 根据段落7所述的供使用的方法或分子,其中所述细胞是癌细胞。

[0056] 9. 根据段落8所述的供使用的方法或分子,其中所述细胞是癌症干细胞。

[0057] 10. 根据段落1到6中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述胞外囊泡来自健康的干细胞。

[0058] 11. 根据段落1a、1b、1c到10中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述流体包括离体患者样品,例如血液样品、从囊肿或肿瘤抽出的流体、均质化活组织检查或类似物。

[0059] 12. 根据权利要求1到10中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分

被在体内施用。

[0060] 13. 根据段落1a、1b或1c到12中任一项所述的供使用的方法或分子,其中GLA结构域或其活性片段独立地选自凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、骨钙蛋白、基质GLA蛋白、GAS6、转甲状腺素蛋白(Transtethrin)、骨膜蛋白、富含脯氨酸的GLA 1、富含脯氨酸的GLA 2、富含脯氨酸的GLA 3和富含脯氨酸的GLA 4。

[0061] 14. 根据段落1a、1b或1c到13中任一项所述的供使用的方法或分子,其中GLA结构域或其活性片段独立地选自凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z和GAS6,例如蛋白S,具体地包括SEQ ID NO:1中所示的序列。

[0062] 15. 根据段落1到11中任一项所述的供使用的方法或分子,其中GLA结构域组分进一步包括EGF结构域,例如钙结合EGF结构域。

[0063] 16. 根据段落15所述的供使用的方法或分子,其中构建体包括选自以下的EGF结构域:凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、骨钙蛋白、基质GLA蛋白、GAS6、转运蛋白、骨膜蛋白、富含脯氨酸的GLA 1、富含脯氨酸的GLA 2、富含脯氨酸的GLA 3和富含脯氨酸的GLA 4。

[0064] 17. 根据段落16所述的供使用的方法或分子,其中所述构建体包括独立地选自以下的EGF结构域:凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S、蛋白Z和GAS6,例如来自蛋白S的EGF结构域。

[0065] 18. 根据段落1a、1b或1c到17中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分包括SEQ ID NO:6中所示的序列或其衍生物,其中His标签不存在,具体地SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0066] 19. 根据段落1a、1b或1c到14中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA结构域组分进一步包括Kringle结构域。

[0067] 20. 根据段落19所述的供使用的方法或分子,其中所述Kringle结构域来自选自包括以下的组的蛋白质:激活转录因子2(ATF);因子XII(F12);凝血酶(F2);透明质酸结合蛋白2(HABP2);肝细胞生长因子(HGF);肝细胞生长因子激活剂(HGFAC);Kremen蛋白1(KREMEN1);KREMEN2;脂蛋白(a)(LPA);LPAL2;巨噬细胞刺激蛋白(MSP或MST1);磷酸肌醇-3-激酶-相互作用蛋白1(PIK3IP1);组织型纤溶酶原激活剂(PLAT);尿激酶(PLAU);血纤维蛋白溶酶(PLG);PRSS12;蛋白酪氨酸激酶跨膜受体ROR1(ROR1);以及蛋白酪氨酸激酶跨膜受体ROR2(ROR2)。

[0068] 21. 根据段落1a、1b或1c到20中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分与有效负载连接。

[0069] 22. 根据段落21所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分与所述有效负载结合。

[0070] 23. 根据段落1a、1b或1c到22中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分是融合蛋白的一部分。

[0071] 24. 根据段落23所述的供使用的方法或分子,其中有效负载包括可检测标记。

[0072] 25. 根据段落24所述的供使用的方法或分子,其中所述标记选自荧光分子(包含荧光探针(如罗丹明染料、FITC、FAM、CY5))、生物素、酶、标签(例如,HIS标签、FLAG标签、myc-标签)、放射性核素(具体地放射性碘化物、放射性同位素,如^{99m}Tc)、发光标记或可以通过

NMR或ESR光谱法检测的化合物,其中所述可检测标记处于分子信标中。

[0073] 26.根据段落1a、1b或1c到25中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述有效负载是珠、板或标签,例如可分离的珠,如磁珠。

[0074] 27.根据段落21到26所述的供使用的方法或分子,其中所述有效负载通过接头与所述GLA组分连接。

[0075] 28.根据段落27所述的供使用的方法或分子,其中所述接头是可裂解的。

[0076] 29.根据段落21到28中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述GLA组分和有效负载是诊断剂。

[0077] 30.根据段落1a、1b或1c到29中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述方法包括提供富集的所述胞外囊泡群的另外的步骤。

[0078] 31.根据段落1a、1b或1c到30中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述方法包括分离所述胞外囊泡的步骤。

[0079] 32.根据段落1a、1b或1c到31中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述方法被在体外执行。

[0080] 33.根据段落1a、1b或1c到32中任一项所述的供使用的方法或分子,其中包括所述GLA组分的分子是治疗剂。

[0081] 34.根据段落21到25和33中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述有效负载包括药物、化疗剂、肽(包含钉合肽)或生物治疗剂,例如:抗病毒药、抗细菌药、抗寄生虫药剂、抗癌药、抗癌疗法。

[0082] 35.根据段落21到25、33和34中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述有效负载包括毒素、聚合物(例如,合成的或天然存在的聚合物)、生物活性蛋白(例如,酶、其它抗体或抗体片段,例如,胞内抗体)、药物(小分子(化学实体))、c、核酸和其片段(例如,DNA、RNA和其片段)、金属螯合剂、纳米颗粒或其中两种或更多种的组合。

[0083] 36.根据段落35所述的供使用的的方法或分子,其中所述毒素选自奥瑞斯他汀(auristatin)(例如,MMAE(单甲基奥瑞斯他汀E)、MMAF(单甲基奥瑞斯他汀F))、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、阿霉素(doxorubicin)、倍癌霉素、美登木素生物碱(例如N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)、N2'-脱乙酰基-N2'-(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)和N2'-脱乙酰基-N2'-(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4))、卡络霉素、尾海兔素、美登素(maytansine)、 α -鹅膏菌素、假单胞菌外毒素(PE38)、蓖麻毒蛋白A链、白喉毒素(diphtheria toxin)、商陆抗病毒蛋白(PAP)、皂草素、白树毒素和妥布赖森。

[0084] 37.根据段落34到36中任一项所述的供使用的方法或分子,其中所述化疗剂选自替莫唑胺、埃博霉素、美法仑、卡莫司汀(carmustine)、白消安(busulfan)、洛莫司汀、环磷酰胺、达卡巴嗪、聚苯丙生、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、二氯甲基二乙胺、白消安、环磷酰胺、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、噻替派、卡培他滨(capecitabine)、链脲佐菌素、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸亮丙瑞林、盐酸阿霉素、硫酸博莱霉素、盐酸柔红霉素、更生霉素、脂质体柠檬酸柔红霉素、脂质体阿霉素盐酸盐、盐酸表柔比星、盐酸伊达比星、丝裂霉素、阿霉素、戊柔比星、阿那曲唑、枸橼酸托瑞米芬、阿糖孢昔、氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、干扰素 α -2b、普卡霉素、巯嘌呤、氨甲蝶呤、干扰素 α -2a、醋酸甲羟孕酮、雌莫司汀磷酸钠、雌二醇、醋酸亮丙瑞林、甲地孕酮、醋酸奥曲肽、二乙基乙烯雌酚二磷酸盐、睾内酯、醋酸戈舍瑞林。

瑞林、磷酸依托泊苷、硫酸长春新碱、依托泊苷、长春碱、依托泊苷、硫酸长春新碱、替尼泊苷、曲妥珠单抗、吉妥单抗、利妥昔单抗、依西美坦、依立替康盐酸盐、天冬酰胺酶、盐酸吉西他滨、六甲蜜胺、盐酸拓扑替康、羟基脲、克拉屈滨、米托坦、盐酸丙卡巴肼、酒石酸长春瑞滨、喷他汀钠、米托蒽醌、培门冬酶、地尼白介素、阿利维A酸、卟菲尔钠、贝沙罗汀、紫杉醇 (paclitaxel)、多西他赛 (docetaxel)、三氧化二砷、维A酸 (tretinoin) 以及其中两种或更多种的组合。

[0085] 38. 根据段落34到37中任一项所述的供使用的方法或分子, 其中所述化疗剂选自烷化剂、包含胸苷酸合酶抑制剂的抗代谢物、紫杉烷、蒽环类药物、包含植物生物碱的抗微管剂以及其中两种或更多种的组合。

[0086] 39. 根据段落38所述的供使用的方法或分子, 其中所述化疗剂选自紫杉醇、多西他赛、白蛋白结合型注射用紫杉醇 (abraxane)、卡巴他赛 (carbazitaxel)、其中的任何一种的衍生物、和上述中的任一种的两种或更多种的组合。

[0087] 40. 根据权利要求38或39所述的供使用的方法或分子, 其中所述烷化剂选自氮芥、亚硝基脲、四嗪、氮丙啶、铂和其衍生物, 非经典烷化剂以及其中两种或更多种的组合。

[0088] 41. 根据段落40所述的供使用的方法或分子, 其中所述铂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、沙铂、铂、奈达铂、三铂、脂铂以及其中两种或更多种的组合。

[0089] 42. 根据段落38到41中任一项所述的供使用的方法或分子, 其中所述烷基化是选自以下的抗代谢物: 抗叶酸 (例如氨甲蝶呤和培美曲塞)、嘌呤类似物 (例如硫嘌呤, 如硫唑嘌呤、巯嘌呤、硫嘌呤、氟达拉滨 (包含磷酸盐形式)、喷司他丁和克拉屈滨)、嘧啶类似物 (例如氟嘧啶, 如5-氟尿嘧啶和其前药, 如卡培他滨 [Xeloda®]、氟尿苷 (flouxuridine)、吉西他滨 (gemcitabine)、阿糖胞苷 (gemcitabine)、地西他滨 (decitabine)、雷替曲塞 (拓优得) 盐酸盐、克拉屈滨 (cladribine) 和6-氮尿嘧啶和其两种或更多种的组合)。

[0090] 43. 根据段落40到段落42中任一项所述的供使用的方法或分子, 其中所述蒽环类药物选自柔红霉素 (daunorubicin) (道诺霉素)、柔红霉素 (脂质体)、阿霉素 (亚德里亚霉素)、阿霉素 (脂质体)、表柔比星 (epirubicin)、伊达比星 (idarubicin)、米托蒽醌 (mitoxantrone) 以及其两种或更多种的组合, 具体地阿霉素。

[0091] 44. 根据段落34到43中任一项所述的供使用的方法或分子, 其中所述药物是抗癌药, 例如选自拓扑异构酶抑制剂、PARP抑制剂以及其中两种或更多种的组合。

[0092] 45. 根据段落34到44中任一项所述的供使用的方法或分子, 其中所述抗癌疗法是放射性核素, 例如选自Y-90、P-32、I-131、In-111、Sr-89、Re-186、Sm-153、Sn-117m以及其中两种或更多种的组合。

[0093] 46. 根据段落1a、1b或1c到25和27到45中任一项所述的供使用的方法或分子, 所述方法或分子包括向癌症患者施用包括所述GLA组分和有效负载的分子。

[0094] 47. 根据段落46所述的供使用的方法或分子, 其中所述癌症是上皮癌, 例如结肠直肠癌、睾丸癌、肝癌、胆道癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、胃癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、膀胱癌、脑癌、头颈癌或肺癌, 或可替代地, 所述癌症可以是血液癌, 例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和慢性骨髓增生性疾病, 如AML。

[0095] 在一个实施例中, 本公开的方法不靶向凋亡小体。

[0096] 因此, 在一个实施例中, 根据本公开的分子用于治疗病原体, 例如病毒、细菌、原生

动物、寄生虫感染,包含其胞内形式。

[0097] 本公开还扩展到包括GLA结构域或其活性片段的GLA组分的用途,其中所述GLA组分不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域,所述GLA结构域或其活性片段用于囊内靶向和递送(包含有效负载的囊内递送)。

[0098] 本公开还扩展到包括GLA结构域或其活性片段的GLA组分的用途,其中所述GLA组分不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域,所述GLA结构域或其活性片段用于制造用于胞内靶向和递送的药物(包含所述有效负载的囊内递送,具体地在所述有效负载包括治疗实体/分子的情况下)。

[0099] 因此,在一方面,提供了一种采用本文所公开的方法从病原体感染的人类细胞系中产生/分离囊泡的体外方法,例如HEp-2细胞、A549细胞、Calu-3细胞、HEK和马丁达比狗肾上皮细胞(Madin Darby Kidney Cells) (MDCK),例如用于疫苗。

[0100] 在一个实施例中,在体外产生的/分离的囊泡加载有有效负载,例如寡核苷酸或多核苷酸,如RNA或DNA,如CPG,所述负载采用包括GLA结构域或其活性片段的 γ -羧基谷氨酸组分(GLA组分),并且不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域。

[0101] 在一个实施例中,在体外产生的/分离的囊泡加载有免疫刺激剂分子,所述免疫刺激剂分子采用包括GLA结构域或其活性片段并且不包括来自GLA蛋白的活性催化结构域的 γ -羧基谷氨酸组分(GLA组分)。

[0102] 胞外囊泡模拟物可以通过在连续挤压下分解细胞而产生,参见例如Jang等人Nano 2013, 7, 7698。如果这些模拟物是由凋亡细胞或干细胞产生的,则在其表面将具有磷脂酰丝氨酸。

[0103] 在一个实施例中,寡核苷酸或多核苷酸与GLA组分缀合。

[0104] 本公开还扩展到疫苗组合物,其包括来自病原体感染细胞的胞外囊泡,并且加载有:外源性免疫刺激分子,例如选自佐剂,例如TLR9激动剂,如CPG、C3b、ICAM-1;和根据本公开的GLA组分。

[0105] 疫苗中的囊泡可能已经在体内或体外产生。囊泡可以在病原体感染的人类细胞系中体外产生,例如选自HEp-2细胞、A549细胞、Calu-3细胞、HEK和马丁达比狗肾上皮细胞(MDCK)。

[0106] 外源性免疫刺激分子可以被加载:在“病原体来源的”囊泡的外部、内部或可以位于两个位置。

[0107] GLA组分可以被加载:在“病原体来源的”囊泡的外部、内部或位于两个位置。

[0108] 在一个实施例中,免疫刺激分子未与GLA组分连接,即,免疫刺激分子被分别加载,例如,免疫刺激分子可以作为质粒提供,所述质粒可以被转染到囊泡中并且GLA组分作为蛋白质提供。

[0109] 用GLA组分和免疫刺激分子两者加载囊泡提供两种单独的作用机制,因为GLA组分结合了囊泡表面上的磷脂酰丝氨酸,从而向免疫系统揭示囊泡的存在。然后,免疫刺激分子增强了免疫系统对囊泡中致病物质的反应。

[0110] 外源性免疫刺激分子可以与GLA结构域连接,例如与GLA组分缀合,或可以是与GLA组分的融合体(表达构建体)。

[0111] 提供与GLA组分连接的免疫刺激分子是有利的,因为GLA组分可以结合囊泡表面上

的磷脂酰丝氨酸,从而将自身以和免疫刺激分子加载在囊泡上。此外,在一些情况下,GLA组分可以内化在囊泡上,并与之一起拉动免疫刺激分子。

[0112] 在一个实施例中,病原体是细菌或病毒,例如如本文所列出的,具体地流感病毒,例如甲型、乙型、丙型或丁型流感。甲型流感具有血凝素亚型H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、H18和神经氨酸酶亚型N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10、N11,如选自以下甲型流感的菌株:(H1N1) H1N2、H2N1、H911、H3N1、H3N2,和H2N3(一种新甲型H1N1流感病毒(CDC 2009H1N1流感网站))。

[0113] 本公开的技术可以适用于制备通用流感疫苗。

[0114] 然而,即使当用于制备季节性流感疫苗时,本发明技术也可能比在鸡蛋上生长当前可用的疫苗更有效和方便。

[0115] 本公开还提供了根据本公开的“病原体来源的”囊泡,用于治疗,具体地用作疫苗。

[0116] 还提供了根据本公开的“病原体来源的”囊泡在制备药物中的用途,具体地在疫苗制备中。

[0117] 如上所述,GLA组分可用于将有效负载(如治疗性有效负载)携带到胞外囊泡的内部。治疗性有效负载可以作用于囊泡本身,或可以通过囊泡递送到细胞并作用于细胞,或这两种情景的组合。

具体实施方式

[0118] 在一个实施例中,每个GLA组分连接1、2、3、4或5个有效负载。

[0119] GLA组分(在本文中也称为 γ -羧基谷氨酸组分)是指在不存在来自GLA蛋白(如蛋白S)的催化结构域的情况下包括GLA结构域的多肽。所述多肽可以进一步包括EGF结构域和/kringle结构域,例如来自蛋白S。在一个实施例中,GLA组分包括30到300个氨基酸残基,例如50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300个残基。在一个实施例中,GLA组分处于4.5到30kDa的范围内。在一个实施例中,GLA组分包括SEQ ID NO:1中所示的序列。在一个实施例中,GLA组分包括SEQ ID NO:6中所示的序列或其衍生物,不包括His标签。

[0120] 如本文所采用的GLA结构域(维生素K依赖性羧基化/ γ -羧基谷氨酸)是已经被氨基序列中的谷氨酸残基的维生素K依赖性翻译后羧基化修饰以提供 γ -羧基谷氨酸(Gla)的蛋白质结构域。在一个实施例中,本公开的分子中所采用的GLA结构域包括来自天然(野生型)GLA结构域的30到45个连续残基。在一个实施例中,GLA结构域包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个GLA残基。

[0121] 在一个实施例中,30%或更少的GLA组分是GLA残基。

[0122] 在一个实施例中,GLA组分包括1到5个二硫键,例如1、2、3、4或5个二硫键。

[0123] GLA结构域通过在两个羧酸残基之间螯合钙离子来结合钙离子。这些残基是起始于Gla蛋白成熟形式的N末端并且终止于保守的芳香族残基的区域的一部分。这导致在结构域的中间发现保守的Gla-x(3)-Gla-x-Cys基序,并且这对于羧化酶识别底物似乎很重要。

[0124] GLA结构域包含在许多蛋白质中,如凝血酶、因子VII、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S(PrS)、蛋白Z、骨钙蛋白、基质GLA蛋白、GAS6、转甲状腺素蛋白、骨膜蛋白、富含脯氨酸的GLA 1、富含脯氨酸的GLA 2、富含脯氨酸的GLA 3和富含脯氨酸的GLA 4。

[0125] 本文所采用的GLA结构域还延伸到蛋白质,其中天然GLA结构域中1到10% (如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10%) 的氨基酸可以被替换和/或缺失,前提是经过修饰的结构域在合适的体外测定中保留了天然(未经过修饰的GLA结构域)的天然活性的至少70% (如75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%)。在一个实施例中,结构域是全长天然结构域。

[0126] 本文所采用的EGF结构域是指保守的蛋白结构域。EGF结构域包括约30到40个氨基酸残基,并且已经在大量主要是动物蛋白中发现。在膜结合蛋白的胞外结构域或已知分泌的蛋白质中发现了大多数出现的EGF样结构域的。EGF样结构域包含6个半胱氨酸残基。EGF样结构域的主要结构是两链 β -片层,然后是短C末端、两链 β -片层的环。这两个 β -片层通常表示为主要(N端)和次要(C端)片层。EGF样结构域经常出现在蛋白质的许多串联拷贝中:这些重复通常折叠在一起以形成单个、线性螺线管域块作为功能单元。在一个实施例中,所采用的结构域是全长天然结构域。

[0127] 本文所采用的EGF结构域还延伸到蛋白质,其中天然EGF结构域中1到10% (如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10%) 的氨基酸可以被替换和/或缺失,前提是经过修饰的结构域在合适的体外测定中保留了天然(未经过修饰的EGF结构域)的天然活性的至少70% (如75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%)。在一个实施例中,结构域是全长天然结构域。

[0128] 本文所采用的Kring1e结构域是指折叠成由3个二硫键稳定的大环的自主蛋白结构域。所述自主蛋白结构域由三环、3-二硫键结构表征,其构型由许多氢键和小块的反平行 β -片层定义。所述自主蛋白结构域在血液凝固和纤溶活性蛋白中以不同的拷贝数量存在于一些血浆蛋白中,包含凝血酶原和尿激酶型纤溶酶原激活剂,其是属于MEROPS肽酶家族S1A的丝氨酸蛋白酶。

[0129] 本文所采用的Kring1e结构域还延伸到蛋白质,其中天然Kring1e结构域中1到10% (如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10%) 的氨基酸可以被替换和/或缺失,前提是经过修饰的结构域在合适的体外测定中保留了天然(未经过修饰的EGF结构域)的天然活性的至少70% (如75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%)。在一个实施例中,所采用的结构域是全长天然结构域。

[0130] 本文所采用的蛋白质的活性片段小于完整的天然蛋白质(或相关结构域),其在相关的体外测定中保留天然全长结构域或蛋白质的活性的至少50% (如60、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%)。

[0131] 本文所采用的催化结构域是在C末端方向上位于EGF结构域下游的结构域(或片段),例如如图1A所展示。

[0132] 本文所采用的体外是指未在人类或动物体内进行的实验室工作。

[0133] 本文所采用的体内是指在活生物体中,具体地在人类或动物中,具体地在人类中进行的工作/测试/治疗。

[0134] 胞外囊泡(EV)是长距离细胞间通讯的重要介质,并且参与原核和真核生物两者的多种生物学过程(在Arenaccio和Federico(Arenaccio and Federico);《实验医学与生物学进展(Adv Exp Med Biol)》998:3-19,2017;Lu等人,《欧洲药物与生物制药杂志(Eur J Pharm Biopharm)》119:381-195,2017;Vader等人,《先进药物输送评论(Adv Drug Delivery Rev)》106:148-156,2016;Lefebvre和Lecuyer,《微生物学前沿(Front Microbiol)》8:377,2017中的评论)。

[0135] 胞外囊泡从感染细胞(病毒、细菌或寄生虫)中脱落,并且含有来自这些感染原的物质(在Schorey等人,《欧洲分子生物学组织报告(EMBO Rep.)》16:24-43,2015中的评论;Schorey和Harding,《临床研究杂志(J.Clin Invest)》126:1181-1189,2016)。这种物质可以从毒素到毒力因子到感染性病毒而变化(包膜的和非包膜的;在Altan-Bonnet,N,《微生物学当前观点(Curr Opin Microbiol)》32:77-81,2016中的评论),并且可以是更有效地递送病毒群而不是单个病毒颗粒的新颖方法(Chen YH等人,《细胞(Cell)》160:619-630,2015)。因此,它们的分离可以提供对疾病的快速诊断洞察力。

[0136] 胞外囊泡是用于描述所有分泌的膜囊泡的宽泛术语。如本文所采用的,所述术语包含外泌体、微囊泡(也称为微粒)、核外颗粒体、基质囊泡、钙化囊泡、前列腺小体、癌小体、逆转录病毒样颗粒、细菌胞外囊泡、腔内囊泡(intraluminal vesicles)和凋亡小体。

[0137] 另外,含有对感染原和细胞特异的蛋白质、RNA和碳水化合物的胞外囊泡还可能潜在是原位疫苗接种的系统。在这种情况下,可以预见由于GLA结构域,免疫抑制磷脂酰丝氨酸分子的结合和中和使免疫检测和清除能够实现,并且可以作为一种新颖的且更有效的针对传染病的特异性疫苗接种方法。

[0138] 本文所采用的胞外囊泡包含微囊泡、凋亡小体和外泌体。胞外囊泡的直径通常处于10nm到5000nm的范围内。

[0139] 本文所采用的微囊泡是指由细胞膜出芽形成之后所释放的囊泡,并且例如通常直径处于100nm到1000nm范围内。

[0140] 外泌体在多囊泡体内产生,并在多囊泡体与细胞膜融合后释放。通常,外泌体的直径处于30到100nm的范围内。

[0141] 本文所采用的凋亡小体是指由凋亡细胞脱落进入胞外环境中的囊泡。凋亡小体可能不参与胞内通讯。通常,凋亡小体的直径处于800nm到5000nm的范围内。

[0142] 参见例如《模块化的胞外囊泡:前瞻性个性化和精密医学的曙光(Modularized Extracellular Vesicles:The Dawn of Prospective Personalized and Precision Medicine)》,Tao等人,《先进科学(Adv.Sci.)》2018,5,1700449;《间充质干细胞来源的胞外囊泡:走向无细胞治疗应用(Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Towards Cell-free Therapeutic Applications)》,Rani等人,www.moleculartherapy.org第23卷,第5期,812-823号,2015年5月;和实现治疗性胞外囊泡的承诺:关键在于治疗性负荷的细节(Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles:The Devil is in the Detail of Therapeutic Loading),Sutaria等人,《药学研究(Pharma Res.)》2017年5月;34 (5) 1053-1066,所述文献通过引用并入本文。

[0143] 因此,本公开提供了胞外囊泡用于诊断例如病原体感染、例如病毒感染、细菌感染和/或寄生虫感染的用途。

[0144] 因此,本公开提供了胞外囊泡用于治疗例如病原体感染、例如病毒感染、细菌感染和/或寄生虫感染的用途,具体地在治疗胞外囊泡以中和或消除致病物质的情况下和/或胞外囊泡加载有治疗性物质以递送到靶细胞。

[0145] 因此,本公开提供胞外囊泡用于诊断病原体感染(例如,病毒感染、细菌感染和/或寄生虫感染)的用途。

[0146] 因此,本公开提供了胞外囊泡用于治疗例如病原体感染(例如,病毒感染、细菌感染和/或寄生虫感染)的用途,具体地在胞外囊泡被治疗以中和或消除致病物质的情况下和/或胞外囊泡加载有用于递送到细胞的治疗性物质。

[0147] 因此,本公开提供了胞外囊泡用于诊断癌症的用途。

[0148] 因此,本公开提供了胞外囊泡用于治疗癌症的用途,例如其中胞外囊泡被治疗以中和或消除致病物质和/或胞外囊泡加载有用于递送到细胞的治疗性物质。

[0149] 根据本公开的胞外囊泡和方法还可以用于诊断和/或治疗自身免疫性疾病,特别是来自干细胞的胞外囊泡。

[0150] 在一个实施例中,本公开的胞外囊泡来自人类细胞。

[0151] 在一个实施例中,胞外囊泡来自干细胞(具体地健康的干细胞)。这些囊泡可以以类似于干细胞治疗的方式使用。

[0152] 在一个实施例中,本公开的胞外囊泡来自致病性细胞,如细菌细胞。

[0153] 细胞可以分泌不同类型的EV,并且根据EV的亚细胞来源对其已经进行分类(Colombo等人,《细胞与发育生物学年度评论(Annu Rev Cell Dev Biol)》30:255-289,2014)。尽管来源和大小存在差异,但由于囊泡大小上的重叠且缺乏亚型特异性标志物,因此不存在统一的EV命名法。因此,仍然难以纯化并且从而区分囊泡类型。例如,文献中历史上所使用的最流行的外泌体纯化方案(差速超速离心,220nm过滤(Thery等人,《细胞生物学实验指南(Curr Protoc Cell Biol)》第3章,第3.22单元,2006)-和最近在商业试剂盒中发布的-共分离不同类型的EV(在Tkach和Thiery,《细胞(Cell)》164:1226-1232,2016中的评论)。因此,像“外泌体”这样的术语通常被称为小型EV的混合群,并且因此,对于本发明,我们选择使用通用术语EV以便指代所有囊泡亚型。

[0154] 通常,胞外囊泡包括包含神经酰胺、胆固醇、磷酸甘油酯和鞘脂的脂质双层(Subra等人,2010;Trajkovic等人,2008;Vlassov等人,2012)。

[0155] 所有胞外囊泡均携带允许其靶向受体细胞的表面分子,其中通过一系列方式(例如,胞吞和/或吞噬作用、融合等)发出信号和/或将其内容物递送到胞质溶胶中,从而改变受体细胞的生理状态。由于胞外囊泡是蛋白质、脂质和遗传物质的天然递送载体,因此其代表了跨许多疾病适应症积极探索其用于成像、诊断和/或用作治疗载体的独特的生物载体(在Rufino-Ramos等人,《控制释放杂志(J.Control Release)》262:247-258,2017中的评论;Vader等人,《先进药物递送评论(Adv Drug Deliv.Rev)》106:148-156,2016;Sutaria等人,《药学研究(Pharm Res.)》34:1053-1066,2017;Ingato等人,《控制释放杂志(J.Control Release)》241:174-185,2016)。

[0156] 在一个实施例中,胞外囊泡是外泌体。外泌体的直径通常处于30到150nm的范围内,如30到100nm,并且例如可以携带选自以下的一种或多种表面标志物:转铁蛋白、CD9、CD63、CD61、CD81、TSG101、LAMPS和Alix。

[0157] 在一个实施例中,胞外囊泡是微囊泡(也称为微粒),并且包含内皮微粒。通常,微泡的直径处于50到2000nm的范围内,并且例如可以携带一种或多种选自VCAMP3和ARF6的表面标志物。尽管在正常个体的血液中可以发现循环内皮微粒,但是在患有某些疾病的个体中循环内皮微粒的数量增加,这些疾病包含高血压和心血管疾病、先兆子痫和各种形式的血管炎。在这些疾病状态中的一些疾病状态下,已经显示内皮微粒具有反映内皮功能障碍

状态的细胞表面分子的阵列。因此,内皮微粒可用作疾病中内皮功能状态的指标或指数,并且可能潜在地在某些疾病的发病机制中起关键作用,包含类风湿关节炎。

[0158] 在一个实施例中,胞外囊泡是核外颗粒体。通常,核外颗粒体的直径处于100到1000nm的范围内,如350到400nm,并且可以例如携带选自TyA和C1a的一种或多种表面标志物。

[0159] 在一个实施例中,囊泡是钙化胞外囊泡。这些囊泡从动脉粥样硬化斑块内的细胞中释放。最近,源自巨噬细胞和平滑肌细胞(SMC)的钙化EV因其在血管钙化中的作用而受到越来越多的关注。这些囊泡被认为在介导血管钙化中起作用,所述血管钙化是心血管疾病发病率和死亡率的主要预测指标。

[0160] 在一个实施例中,胞外囊泡是基质囊泡。本文所引用的基质囊泡参与骨发育,其中成骨细胞来源的囊泡使羟基磷灰石晶体沿发育中骨中的胶原纤维成核。基质囊泡还作为用于在动脉粥样硬化斑块纤维帽内形成微钙化的成核焦点,这导致斑块不稳定、破裂和随后的心肌梗死和中风。

[0161] 在一个实施例中,胞外囊泡是前列腺小体。本文所采用的前列腺小体是指由前列腺腺上皮细胞分泌到精液中的囊泡。通常,前列腺小体的直径处于40到500nm的范围内。前列腺小体具有异常的脂质组合物,以及紧密且高度有序的脂蛋白膜结构,类似于脂筏。前列腺小体的生理作用意味着精子活动力的提高,并且在进入卵子过程中抵御女性免疫防御的攻击。研究表明,癌性前列腺细胞和低分化前列腺细胞继续产生并分泌前列腺小体。老年男性前列腺癌的高发病率可利用前列腺小体所支持的免疫保护活性。前列腺小体中发现的免疫调节蛋白包含:氨基肽酶N(CD13);二肽基肽酶IV(CD26);脑啡肽酶(中性内肽酶,CD10);血管紧张素转换酶(ACE,CD143);组织因子TF(CD142,促凝血酶原激酶);衰变加速因子(CD55);保护素(CD59,MAC抑制剂)和补体调节膜辅因子蛋白(CD46)。前列腺小体还含有高水平的二价阳离子:Zn²⁺、Ca²⁺和Mg²⁺。

[0162] 在一个实施例中,胞外囊泡是癌小体。本文所采用的癌小体是指直径处于1μm到10μm范围内的大胞外囊泡。在脑肿瘤的上下文中,存在从神经胶质瘤细胞释放并表达EGFRvIII(受体的突变形式)的EV。这些囊泡被证明能够将癌蛋白EGFRvIII转移到缺乏这种受体的肿瘤细胞膜上,从而增殖肿瘤促进物质并诱导转化。Cav-1阳性的大癌小体已被证明能够从去势抵抗性和转移性疾病患者中区分局部局限性前列腺癌患者。

[0163] 在一个实施例中,胞外颗粒是逆转录病毒样颗粒。这些逆转录病毒样颗粒的直径通常处于75nm到100nm范围内并且可以携带表面标志物Gag。

[0164] 在一个实施例中,胞外囊泡是细菌胞外囊泡。这些囊泡的直径通常处于10到300nm范围内,并且在其表面上可以具有PAMP。

[0165] 在一个实施例中,胞外囊泡是腔内囊泡。如本文所采用的,腔内囊泡是指细胞内的囊泡。

[0166] 回融合是多囊泡体或晚期核内体内的内部(腔内)囊泡与核内体限制膜的融合。此过程被认为是由溶血磷脂酸(LBPA)、磷脂酰肌醇-3-磷酸盐、Alix和对酸性pH的明显依赖性介导的。MHC 2类和其它蛋白质(CD63和MPR)利用此过程有效地转运到胞质溶胶中的位置并返回质膜。然而,病原体也利用这种机制有效地进入细胞的胞质溶胶中(例如,VSV、炭疽)。与核内体和细胞器之间的细胞中的常规融合不同,回融合需要内部囊泡的胞质小叶和外膜

融合-类似于精子-卵子融合。

[0167] 在一个实施例中,胞外囊泡是凋亡小体。本文所采用的凋亡小体的直径通常处于500到5,000nm范围内,如500到4000nm,并且由经历程序性细胞死亡的细胞释放。

[0168] 干细胞和标志物

[0169] 在一个实施例中,根据本公开的胞外囊泡来自干细胞。

[0170] 在一个实施例中,干细胞是胚胎干细胞。在一个实施例中,细胞不是胚胎干细胞。

[0171] 在一个实施例中,干细胞是成体干细胞,例如包含祖细胞,以及造血干细胞、肌源性干细胞、骨祖干细胞、神经干细胞、间充质干细胞,如卫星细胞、放射状神经胶质细胞、骨髓基质细胞、骨膜、胰腺祖细胞、内皮祖细胞、胚细胞和滋养层干细胞。

[0172] 在一个实施例中,干细胞是癌干细胞。

[0173] 在一个实施例中,所述方法涉及哺乳动物干细胞,例如人类干细胞。本文所讨论的干细胞主要是人类干细胞。但是,技术人员能够根据需要识别其它哺乳动物的相关或相应的干细胞群。例如,SSEA-1是小鼠胚胎干细胞、人类生殖系细胞和胚胎性癌细胞的标志物;SSEA-3是灵长类胚胎干细胞、人类胚胎生殖系细胞、人类胚胎干细胞和胚胎性癌细胞的标志物;SSEA-4是灵长类胚胎干细胞、人类胚胎生殖系细胞、人类干细胞、胚胎性癌细胞的标志物;CD324是人类和小鼠胚胎干细胞、胚胎性癌细胞的标志物;CD90是人类和小鼠胚胎干细胞、造血干细胞、胚胎性癌细胞的标志物;CD117是人类和小鼠胚胎干细胞、造血干祖细胞、神经嵴来源的黑素细胞、原始生殖细胞、胚胎性癌细胞的标志物;CD326是人类和小鼠胚胎干细胞、胚胎性癌细胞的标志物;CD9是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;CD24是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;CD29是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;CD59是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;CD133是人类和小鼠胚胎干细胞、胚胎性癌细胞、造血干细胞的标志物;CD31是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;TRA-1-60是人类胚胎干细胞、畸形恶瘤、胚胎生殖细胞、胚胎性癌细胞的标志物;TRA-1-81是人类胚胎干细胞、畸形恶瘤、胚胎生殖细胞、胚胎性癌细胞的标志物;Frizzled5是人类和小鼠胚胎干细胞的标志物;干细胞因子(SCF)是人类和胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、胚胎性癌细胞的标志物;以及Cripto是人类和小鼠胚胎干细胞、心肌细胞和胚胎性癌细胞的标志物。

[0174] 造血干细胞(HSC)或原血细胞是通过造血作用的过程产生所有其它血细胞的干细胞。造血干细胞源自中胚层,并且位于包含在大多数骨骼的核心的红骨髓中。

[0175] 本文所采用的癌干细胞是指具有与正常干细胞相关的特征,特别是产生在特定癌症样品中发现的所有细胞类型的能力的致瘤细胞(即在肿瘤或血液癌症内发现的癌细胞)。参见,例如,《癌干细胞的鉴定和靶向(Identification and Targeting of Cancer Stem Cells)》,《生物学论文集(BioessayS)》2009年10月;31(10) 1038-1049,所述文献通过引用并入本文。癌干细胞由三个不同的特性定义:i)启动肿瘤并且驱动肿瘤增殖的选择性能力;ii)通过自我更新产生无穷无尽的自我复制的能力,以及iii)通过分化产生更成熟的非干细胞癌后代的潜力。癌干细胞不一定源自健康的干细胞,但可能源自分化的细胞。

[0176] CD34也称为造血祖细胞抗原CD34,具有作为细胞-细胞粘附因子的功能。CD34可以用作富集干细胞群的标志物。

[0177] 干细胞通常对于谱系阳性表面标志物呈阴性(即,是Lin-ve),例如干细胞是Lin-ve、CD34+ve、CD38-ve、CD45RA-ve、CD90阳性和CD49f_+ve。

[0178] 造血干细胞可以表达来自以下的表面标志物:CD48、CD150、CD244、CD34、CD38、SCA-1、Thy1.1、C-kit、lin、CD135、slam1/CD150、Mac-1 (CD11b)、CD4、干细胞因子 (SCF) 以及其中两个或更多个的组合。

[0179] 骨祖细胞可以表达选自以下的表面标志物:Gremlin-1、TGF-β、bFGF、BMP-2、ALPP、MCAM、胶原I、胶原1α1、胶原II、RUNX2、饰胶蛋白聚糖以及其中两种或更多种的组合(如所有所述的标志物)。

[0180] 成骨细胞或其祖细胞可以表达选自以下的表面标志物:Runx2、碱性磷酸酶/ALPP/ALPI、骨钙蛋白、BAP1、OPN、BAP31、胶原I、SCUBE3、纤连蛋白、SPARC、IGFBP-3以及其中两种或更多种的组合。

[0181] 骨细胞或其祖细胞可以表达选自以下的表面标志物:

[0182] i) TGFβ、RANKL、MCSF、骨硬化蛋白、DKK、以及其中两种或更多种的组合(如所有所述的标志物)和/或

[0183] ii) Osterix+ve、CD90+ve、骨钙蛋白+ve、胶原I+ve、骨唾液蛋白+ve以及其中两种或更多种的组合(如所有所述的标志物),和/或

[0184] iii) 碱性磷酸酶/ALPP(碱性磷酸酶胎盘)/ALPI+ve、胶原I+ve、胶原II+ve、饰胶蛋白聚糖+ve、MCAM/CD146+ve、MEPE/OF45+ve、osterix+ve、CD90+ve、osterix/Sp7+ve、RUNX2/CBFA1+ve、促血小板生成素/Tpo+ve以及其中两种或更多种的组合(如所有所述的标志物)。

[0185] 肌源性干细胞可以表达选自以下的标志物:CD56、CD146、VE-钙粘蛋白、α平滑肌肌动蛋白、FABP3、整联蛋白α7、肌间线蛋白、肌球蛋白重链、UEA-1受体以及其中两种或更多种的组合(如所有所述的标志物)。

[0186] 神经干细胞可以表达选自以下的标志物:

[0187] i) CD133、CD15、CD24低或-ve、GCTM-2、CD45、CD34、巢蛋白、Sox-2、ABCG2、FGF R4、Frizzled-9和其两种或更多种的组合(如所有所述的标志物),和/或

[0188] ii) CD24标志物是低或-ve,和/或

[0189] iii) CD133+ve、5E12+ve、CD34-ve、CD45-ve和CD24低或-ve的标志物组合。

[0190] 间充质干细胞可以表达选自以下的表面标志物:CD10、CD13、CD73、CD105、CD271、CD140b、CD240、frizzled-9、CD29、CD90、CD146、oct4、SSEA4、STR0-1、干细胞因子 (SCF) 以及其中两种或更多种的组合。

[0191] 脂肪来源的干细胞可以表达选自以下的表面标志物:

[0192] i) K15、CD34、巢蛋白、卵泡抑素、p63、整联蛋白α6、茶蛋白C、EGFR、IGFR、frizzled因子以及其中两种或更多种的组合,和/或

[0193] ii) iCD44、ICAM/CD54、CD34、整联蛋白家族成员和其两种或更多种的组合。

[0194] 来自卵巢和输卵管上皮干细胞的干细胞可以表达选自以下的表面标志物:Gremlin 1、Lrig1、Lgr5、Bmi1、Tert、HopX以及其中两种或更多种的组合。

[0195] 胚胎干细胞可以表达选自以下的一种或多种表面标志物:CD24、CD29、CD31、CD59、CD90、CD117、CD133、CD324、CD326、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、frizzled5、干细胞因子、crypto (TDGF-1)。

[0196] 来自干细胞的胞外囊泡可以基于其源自的细胞的标志物进行鉴定。

[0197] 其它定义

[0198] 本文所采用的有效负载是指与GLA结构域连接的分子,具体地用于递送到囊泡的分子。有效负载可以包括药物、毒素、化疗剂、聚合物、生物活性蛋白、肽(如稳定的肽)、多核苷酸(如DNA和包含微RNA、shRNA、RNAi等的RNA,包含分子信标)放射性核素、金属螯合剂、溶瘤病毒、病毒载体、标记和/或报告基团。本文所采用的连接是指将有效负载与GLA结构域结合的任何方式,包含融合蛋白(例如,采用酰胺键)或化学缀合(例如,马来酰亚胺化学、点击化学等)。有效负载还可用于指递送到胞外囊泡内部的物质,其中所述物质未与GLA组分连接。

[0199] GLA结构域是利用磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露以靶向和进入选定细胞的独特的检测和递送平台。磷脂酰丝氨酸是识别和吞噬凋亡细胞的主要信号。凋亡是进化上保守且受到严格调控的的细胞死亡方式(Poon IK等人,《自然综述免疫学(Nat Rev Immunol)》14:166-180,2014)。凋亡细胞的吞噬和摄取被称为“胞葬作用”,其在膜完整性丧失和炎性内容物释放之前用于立即且有效地去除凋亡细胞,并且从而抵消凋亡的有害炎性作用。PS表达起到抑制TLR诱导的和细胞因子诱导的信号级联和免疫原性DC成熟的作用(Poon IK等人,《自然综述免疫学(Nat Rev Immunol)》14:166-180,2014;Birge RB,《细胞死亡和分化(Cell Death Differ)》23:962-978,2016)。因此,在生理条件下,外化的磷脂酰丝氨酸作为主要的和进化上保守的免疫抑制信号发挥作用,所述信号促进耐受性并阻止局部和全身免疫激活。病理上,磷脂酰丝氨酸的先天免疫抑制作用已经被许多病毒、其它微生物和寄生虫劫持以促进感染,并且在许多情况下建立潜伏期(Birge RB等人,《细胞死亡和分化(Cell Death Differ)》23:962-978,2016;Amara A和Mercer J,《自然综述免疫学(Nat Rev Immunol)》13:461-469,2015;Moller-Tank S和Maury W,《病毒学(Virology)》468-470:565-580,2014)。磷脂酰丝氨酸在肿瘤微环境中被失调并拮抗肿瘤免疫力的发展,并且表达磷脂酰丝氨酸的外泌体目前正在被探索作为与癌症斗争中的早期诊断(Birge RB等人,《细胞死亡和分化(Cell Death Differ.)》23:962-978,2016;Lea等人,《肿瘤标靶(Oncotarget)》8:14395-14407,2017;Li X和Wang X,《分子癌症研究(Mol Cancer)》16:92,2017)。尽管不希望受到理论的束缚,但本发明人认为,从生物学的观点来看,并非所有磷脂酰丝氨酸都是等同的。发明人认为,由酶TMEM16F暴露的磷脂酰丝氨酸参与免疫抑制,并且是本公开的分子“看到的”的那一个。

[0200] 本文所采用的溶瘤病毒是指具有以下特征的病毒:

[0201] • 优先感染并杀死癌细胞,或

[0202] • 在癌细胞中选择性复制(例如,因为其复制取决于在癌细胞中被上调的基因,如p53)。

[0203] 本文所采用的病毒载体是指复制缺陷型病毒,通常编码转基因。

[0204] 本文所采用的体外是指未在人类或动物体内进行的实验室工作。

[0205] 本文所采用的体内是指在活生物体,具体地在人类或动物中进行的工作/测试/治疗。

[0206] 本文所采用的分子以最广义使用,并且不仅包含合成的化学分子,而且包含大分子,如蛋白质、聚合物(天然的或其它的)、核糖核酸分子、标记等。

[0207] 分子信标是可以报告均相溶液中的特定核酸的存在的寡核苷酸杂交探针。当分子信标与靶核酸序列结合时,分子信标是具有恢复荧光的内部淬灭的荧光团的发夹状分子。

[0208] 本文所采用的钉合肽是指由合成支架支撑的多个串联肽,其旨在增强肽的药理学性能。

[0209] 除非上下文另有说明,否则本文所采用的药物旨在指小的化学实体,例如通过有机化学方法合成的化学实体,具体地经过批准或许可的分子或正在被许可用于治疗用途的分子,具体地在人体中。本文所采用的药物包含括抗病毒化合物、抗生素和抗癌疗法。

[0210] 本文所采用的抗病毒化合物(抗病毒剂)是指专门用于治疗病毒感染的一类药物,包含广谱抗病毒剂以及特异于特定病毒或特定病毒家族的“窄”谱。

[0211] 本文所采用的抗生素是指抑制细菌生长或消灭细菌的药物或药剂。除非文中另有说明,否则此处的抗细菌药和抗生素可互换使用。

[0212] 本文所采用的抗寄生虫药是指抑制寄生虫生长、消灭寄生虫或从宿主清除寄生虫的药物或药剂。

[0213] 抗癌疗法是宽泛术语,包含抗癌药物、化学疗法、放射疗法、免疫肿瘤疗法等。

[0214] 本文所采用的抗癌药通常是指小分子癌症疗法。

[0215] 如本文中的化学疗法通常是指细胞毒性剂并且包含抗肿瘤药。

[0216] 生物治疗剂(也称为生物制药学的、生物学的或生物的)是“源”自生物学来源的治疗产品,例如重组蛋白和片段,包含抗体分子,包含抗体、抗体结合片段和多特异性抗体分子、多核苷酸、治疗性病毒、溶瘤病毒、病毒载体和此类物质的复杂组合。生物活性蛋白是生物治疗剂的亚组,并且包含重组蛋白和其活性片段(包含抗体分子)。

[0217] 本文所采用的抗体分子包含具有全长重链和轻链的完整抗体或其片段,以及包括相同抗体中任何一种的分子,例如Fab、经过修饰的Fab、Fab'、经过修饰的Fab'、F(ab')2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如,VH或VL或VHH)、scFv、胞内抗体、二价抗体、三价抗体或四价抗体、Bis-scFv、双抗体、三抗体、四抗体和上述任何一个中的表位-结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,《自然生物科技(Nature Biotech.)》23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,《药物设计综述-在线(Drug Design Reviews-Online)》2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法在所属领域中众所周知(参见例如Verma等人,1998,《免疫法期刊(Journal of Immunological Methods)》,216,165-181)。用于本发明的其它抗体片段包含W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171中所描述的Fab和Fab'片段。多价抗体可以包括多种特异性,例如双特异的,或可以是单特异性的(参见例如W0 92/22853和W005/113605)。在此实例中特别考虑双特异性和多特异性抗体变体,因为目的是中和两个独立的靶蛋白。本文所公开的抗体的可变区可以产生能够结合并中和两种靶抗原的单一抗体变体的方式进行配置。

[0218] 抗体和其结合片段,具体地小抗体片段,如结构域抗体、VHHs、单链Fvs(scFvs)、ds-scFvs、dsFv和胞内抗体,可以使用本发明技术进行胞内递送。

[0219] 在一个实施例中,抗体分子是人或人源化。

[0220] 毒素是有毒物质,特别是源自天然来源,具体地蛋白质。许多毒素(如加利车霉素)被用于癌症治疗。另外,化疗剂可以被认为是有毒的(或毒素)。因此,毒素的定义与本文的其它定义重叠。然而,像蛇毒的神经毒素是毒素,但不是化疗剂。然而,本领域技术人员熟悉这些技术定义并且能够理解本公开的上下文的含义。

[0221] 本文所采用的诊断剂是用于分析或成像以诊断、监测或了解疾病状态的药剂。诊

断剂通常包括报道分子,如可以以某种方式可视化、测量或监测的标记或类似物。

[0222] 适用于本公开的放射性核素包含铊-201、锝-99m、碘-123、碘-131、碘-125、氟-18和氧-15。

[0223] 本文所采用的异常细胞或致病细胞涉及与正常健康细胞具有差异的细胞,具体地一种或多种标志物的突变或上调,例如与病症或疾病的易感性或发展有关的异常;与病症或疾病(如癌前细胞、癌症、病原体感染细胞、镰状细胞性贫血或类似疾病)相关。

[0224] 本文所采用的凋亡是细胞死亡通路,其作为生物体生长的正常和受控部分发生。细胞凋亡导致的细胞死亡对周围组织的损害要小于细胞死亡机制(如坏死)。

[0225] 本文所采用的坏死是由疾病或损伤而导致的细胞死亡。坏死会向周围组织释放可能损害周围细胞的细胞因子和因子。坏疽是坏死细胞死亡的实例。

[0226] 化疗剂

[0227] 除非上下文另外指出,否则化疗剂和化学疗法或细胞毒性剂在本文中可互换采用。

[0228] 本文所采用的化学疗法旨在指对恶性细胞和组织“选择性”破坏的特定抗肿瘤化学剂或药物,例如烷化剂、抗代谢物(包含胸苷酸合酶抑制剂)、蒽环类药物、抗微管剂(包含植物生物碱)、拓扑异构酶抑制剂、parp抑制剂和其它抗肿瘤剂。在这种情况下,选择性地使用是不严格的,因为当然这些药剂中的许多均具有严重的副作用。

[0229] 医师可以基于所治疗的癌症的性质选择优选的剂量。

[0230] 可以在本公开的方法中采用的烷化剂的实例包含烷化剂氮芥、亚硝基脲、四嗪、氮丙啶、铂和衍生物、以及非经典烷化剂。

[0231] 例如,含有铂的化疗剂(也称为铂),如顺铂、卡铂、奥沙利铂、沙铂、吡铂、奈达铂、三铂和脂铂(顺铂的脂质体形式),具体地顺铂、卡铂和奥沙利铂。

[0232] 根据确切的癌症,顺铂的剂量范围为约20到约270mg/m²。剂量通常处于约70到约100mg/m²的范围内。

[0233] 氮芥包含二氯甲基二乙胺、环磷酰胺(cyclophosphamide)、美法仑、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、异环磷酰胺(ifosfamide)和白消安。

[0234] 亚硝基脲包含N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)、卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)和司莫司汀(semustine)(MeCCNU)、福莫司汀(fotemustine)和链脲霉素(streptozotocin)。四嗪(Tetrazines)包含达卡巴嗪(dacarbazine)、米托唑胺(mitozolomide)和替莫唑胺(temozolomide)。

[0235] 氮丙啶包含噻替派、自力霉素(mytomycin)和亚丝醌(diaziquone)(AZQ)。

[0236] 可以在本公开的方法中采用的抗代谢物的实例包含抗叶酸剂(例如氨甲蝶呤和培美曲塞)、嘌呤类似物(例如硫嘌呤,如硫唑嘌呤、巯嘌呤、硫嘌呤、氟达拉滨(包含磷酸盐形式)、喷司他丁和克拉屈滨)、嘧啶类似物(例如氟嘧啶,如5-氟尿嘧啶和其前药,如卡培他滨

[Xeloda®])、氟尿苷、吉西他滨、阿糖胞苷、地西他滨、雷替曲塞(拓优得)盐酸盐、克拉屈滨和6-氮尿嘧啶。

[0237] 可以在本公开的方法中采用的蒽环类药物的实例包含柔红霉素(道诺霉素)、柔红霉素(脂质体)、阿霉素(亚德里亚霉素)、阿霉素(脂质体)、表柔比星、伊达比星、目前用于治疗膀胱癌的戊柔比星和米托蒽醌蒽环类类似物,具体地阿霉素。

- [0238] 可以在本公开的方法中采用的抗微管剂的实例包含长春花生物碱和紫杉烷。
- [0239] 长春花生物碱包含完全天然的化学药品,例如长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine),以及还包含半合成长春花生物碱,例如长春瑞滨、长春地辛和长春氟宁(vinflunine)。
- [0240] 紫杉烷包含紫杉醇、多西他赛、白蛋白结合型紫杉醇、卡巴他赛和其衍生物。本文所采用的紫杉烷衍生物包含紫杉烷如紫杉醇的重制,例如在胶束制剂中,衍生物还包含化学衍生物,其中合成化学物质用于修饰紫杉烷起始材料。
- [0241] 可以用于本公开的方法的拓扑异构酶抑制剂包含I型拓扑异构酶抑制剂、II型拓扑异构酶抑制剂和II型拓扑异构酶毒剂。I型抑制剂包含拓朴替康、伊立替康、吲哚替康(indotecan)和因帝米替康(indimitecan)。II型抑制剂包含染料木素和ICRF 193,其具有以下结构:
- [0242] II型毒剂包含安吖啶(amsacrine)、依托泊昔、磷酸依托泊昔、替尼泊昔和阿霉素以及氟喹诺酮。
- [0243] 在一个实施例中,化疗剂是PARP抑制剂。
- [0244] 在本公开中适合用作有效负载的病毒
- [0245] 在一个实施例中,本公开中所采用的病毒是包膜病毒,例如选自疱疹病毒(如单纯性疱疹1型)、痘病毒(如痘苗病毒)、肝炎病毒(hepatitis virus)、黄病毒(flavivirus)、披膜病毒(togavirus)、冠状病毒(coronavirus)、丁型肝炎(hepatitis D)、正粘病毒(orthomyxovirus)、副粘病毒(paramyxovirus)(如麻疹或新城疫病毒)、弹状病毒(rhabdovirus)、布尼亚病毒(bunyavirus)、线状病毒(filovirus)和弹状病毒科(Rhabdoviridae)(如印第安纳水泡性口炎病毒(VSV))。
- [0246] 在一个实施例中,本公开中所采用的病毒是非包膜病毒,例如选自腺病毒科(如腺病毒)、乳头瘤病毒科(papillomaviridae)、小核糖核酸病毒科(picornaviridae)(如柯萨奇病毒或塞内卡谷病毒(例如,塞内卡病毒))、呼肠孤病毒(reovirus)。
- [0247] 在一个实施例中,所述病毒是腺病毒,例如人类腺病毒,如选自B组病毒(具体地Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35、Ad51或其嵌合体,如Enadenotucirev)、C组病毒(具体地Ad1、2、5、6或其嵌合体)、D组病毒(具体地Ad8、Ad10、Ad13、Ad15、Ad17、Ad19、Ad20、Ad22、Ad30、Ad32、Ad33、Ad36、Ad37、Ad38、Ad39、Ad42、Ad43、Ad44、Ad45、A46、Ad47、Ad48、Ad49、Ad50或其嵌合体)、E组病毒(具体地Ad4)、F组病毒(具体地Ad40、Ad41或其嵌合体)和B组、C组、D组或F组病毒中两个或更多个的嵌合体。
- [0248] 绝大多数病毒已经很好地描述了与靶细胞识别和摄取相关的蛋白质。可以使用描述于Verheijen和Rottier,《病毒学进程(Adv. Virology)》2012:798526,2012中的评论的方法来引入对其趋向性的修饰以重定向或使更具选择性的肿瘤靶向溶瘤病毒。
- [0249] 不参与天然病毒靶向的另外的病毒细胞表面蛋白可以具有在其上工程化的靶向基序(例如,Ad病毒粒子次要外壳蛋白IX,Salisch等人,《公共科学图书馆:综合(PLoS One)》12:e0174728,2017)。
- [0250] 包膜病毒具有覆盖病毒衣壳的外膜(包膜)。包膜通常源自宿主细胞膜的部分(磷脂和蛋白质),但还包含一些病毒蛋白。包膜表面的糖蛋白用于识别并结合到宿主的膜上的受体位点。然后,病毒包膜与宿主的膜融合,从而使衣壳和病毒基因组进入并感染宿主。

[0251] WO2014/13834中公开了各种溶瘤病毒,通过引用并入本文。

[0252] 单纯性疱疹病毒(HSV)借助于四种必需糖蛋白-gD、gH/gL、gB进入细胞,通过gD结合到其受体、nectin1和HVEM之一以级联方式激活。通过将配体和scFvs插入gC和/或gD蛋白或gH中来实现HSV的重新靶向(Campadelli-Fiume、G等人,《医学病毒学综述(Rev in Med Virol)》21:213-226,2011;Gatta,V,《公共科学图书馆病原体(PLoS Pathog)》11:e1004907,2015)。溶瘤单纯性疱疹病毒1型载体已经开发用于临床用途。这些病毒具有复制能力,并且在影响病毒复制、神经致病性和免疫逃避性的基因中具有突变,例如包含第一代病毒(如NV1020(R7020)、d1sptk、d18.36tk、hrR3、R3616、1716)、第二代病毒(如G207(MGH-1)、3616UB、SUP、NV1023)、第三代病毒(如G47Δ)、转录表达载体(如G92A、d12.CALP、Myb34.5)、转基因表达载体(如rRP450)和其它病毒(如泰利莫齐拉赫帕雷(Talimogene laherparepvec)(T-Vec))。HSV-1载体被认为可用于治疗各种实体瘤,例如包含神经胶质瘤、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌和胰腺癌。HSV-1病毒感染各种细胞类型和种类,其本质上是溶细胞的,病毒的复制生命周期导致宿主细胞的破坏,其具有良好的特征和大的基因组(152K),但含有为治疗性基因的插入提供高达30K空间的许多非必需基因。通常,出于安全原因,HSV病毒不会在胸苷激酶基因中突变。泰利莫齐拉赫帕雷是溶瘤性疱疹病毒,其被批准用于治疗黑素瘤。其它疱疹类病毒包含Virttu生物制剂公司(Virttu Biologics)的G207(即SEPREHVIR(HSV-1716))、HSV-1R3616突变体、HSV-1 1716突变体、NV1020(R7020)、R3616突变体(缺失的RL1),KM100突变体在UL48(编码反式激活因子内膜蛋白pUL48[VP16])和RL2基因、G92A、突变体、Myb34.5和rQNestin34.5中具有插入。

[0253] 可以采用痘病毒-痘苗病毒,如经过改良的痘苗安卡拉(MVA)(Galmiche MC等人,《普通病毒学期刊(J Gen Virol)》78:3019-3027,1997),MVA可以用携带针对肿瘤相关抗原MUC-1的插入的定向的scFv的p14融合分子替换(Paul,S等人,《病毒免疫学(Viral Immunol)》20:664-671,2007)。也可以参见在Liang L等人,《病毒(Viruss)》6:3787-3808,2014中的评论;Hsiao JC等人,《病毒学杂志(J Virol)》73:8750-8761,1999;在Chen TL和Roffler S,《医学研究评论(Med Res.Rev.)》28:885-928,2008中的评论和Kinoshita T等人,《生物化学杂志(J Biochem)》144:287-294,2008。詹尼勒克斯(Jennerex)的JX-594是一种胸苷激酶缺失的痘苗病毒加GM-CSF。GL-ONC1是一种减毒的痘苗病毒(李斯特菌),其可在临床前小鼠模型中引起各种实体瘤的消退和消除。

[0254] 副粘病毒(如麻疹或新城疫病毒),

[0255] 麻疹病毒(MeV)是副粘病毒科家族内的麻疹病毒属的单链、反义、包膜(非节段)的RNA病毒。麻疹病毒具有两个包膜糖蛋白:血凝素(H)附着蛋白和融合蛋白(F)。附着、进入和随后的细胞-细胞融合通过2个麻疹受体、CD46和信号淋巴细胞活化分子(SLAM)来介导。参见例如,在Msaouel P等人,《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》797:141-162,2012中的评论;Robinson S.和Galanis,E.,《生物治疗专家意见(Expert Opin Biol Ther)》17:353-363,2017;Aref S等人,《病毒(iruses)》8.Pii:E294,2016;(在Chen TL和Roffler S,《医学研究评论(Med Res.Rev.)》28:885-928,2008中的评论和Kinoshita T等人,《生物化学杂志(J Biochem)》144:287-294,2008,以及Russell SJ和Peng KW,《微生物学和免疫学的当前话题(Curr Topic Microbiol. Immunol)》330:213-241,2009;Robinson S和Galanis,E,《生物疗法专家意见(Expert Opin Biol Ther)》17:353-363,2017;Aref S等人,《病毒

(iruses)》8.Pii:E294,2016)。编码人类甲状腺碘化钠共转运体或MV-NIS的麻疹病毒是麻疹病毒的减毒溶瘤埃德蒙斯顿(Edmonston) (Ed) 毒株。放射性碘成像为NIS基因表达监测提供了新技术。

[0256] 还可以采用新城疫病毒。

[0257] 腺病毒科腺病毒是研究最广泛的用作溶瘤剂的病毒之一。一系列肽和蛋白质已经被工程化成与病毒粒子相关的病毒蛋白,以改变病毒的天然趋向性(在Verheijen MH和Rottier PJM,《病毒学的进程(Adv Virol)》2012:798526,2012中的评论)。然而,所有这些都依赖于细胞核中的病毒组装,这提出了重大挑战。

[0258] 其它非包膜病毒包含柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒和呼肠孤病毒。参见例如,在Altan-Bonnet,N,《微生物学当前观点(Curr Opin Microbiol)》32:77-81,2016中的评论和Chen YH等人,《细胞(Cell)》160:619-630,2015;在Chen TL和Roffler S,《医学研究评论(Med Res. Rev.)》28:885-928,2008中的评论和Kinoshita T等人,《生物化学杂志(J Biochem)》144:287-294,2008以及在Verheijen MH和Rottier PJM,《病毒学进程(Adv Virol)》2012:798526,2012中的评论。

[0259] 存在多种腺病毒,例如Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12,如由Oncos Therapeutics公司发起的用于治疗前列腺癌的CGTG-102(Ad5/3-D24-GMCSF),例如用于治疗软组织肉瘤,W02005/118825中公开的安柯瑞(Oncorine)(H101)、CG0070、Enadenotucirev(EnAd),W02008/080003中公开的OvAd1和OvAd2,ONCOS-102,例如用于不可切除的恶性胸膜间皮瘤和DNX-2401,例如用于神经胶质瘤。

[0260] Cavatak是用于治疗恶性黑色素瘤的野生型柯萨奇病毒A21制剂的商标名。塞内卡谷病毒(NTX-010)和(SVV-001),例如用于小细胞肺癌和神经母细胞瘤。

[0261] 呼肠孤病毒-Reolysin®(佩拉瑞普(pelareorep);野生型呼肠孤病毒;血清型3型Dearing;溶瘤生物科技(Oncolytics Biotech)),例如用于治疗各种癌症和细胞增殖性病状。

[0262] 水泡性口腔炎病毒(VSV)VSV是另一种被探索作为溶瘤剂的包膜病毒。参见例如,Betancourt等人,《病毒学杂志(J Virol)》89:11786-11800,2015)以及在Hastie E和Grdzelishvili VZ,《普通病毒学杂志(J Gen Virol)》93:2529-2545,2012中的评论)。

[0263] 由病毒编码的蛋白质

[0264] 在一个实施例中,本公开的方法中采用的病毒或载体包括转基因,例如其中转基因用于替换细胞中的缺陷遗传物质,以在细胞中提供新的或增强的功能,以使细胞对治疗敏感,以阻断细胞中的功能,或以表达治疗性蛋白质或肽。在一个实施例中,根据本公开的用作有效负载的病毒包括一种或多种转基因,例如编码独立地选自以下的药剂:RNAi序列、蛋白质、多肽或肽的试剂(例如,抗体分子或其结合片段、趋化因子、细胞因子、免疫调节剂、荧光标签或酶)。

[0265] 这包含但不限于显示出临床前希望但缺乏有效且经济的递送方式的独特形式,例如肽、胞内抗体和可替代的支架(在Boldicke T,《蛋白质科学(Protein Sci)》26:925-945,2017中的评论;Marschall和Dubel,《计算和结构生物科技期刊(Comput Struct Biotechnol)》14:304-308,2016;Miersch和Sidhu,《F1000Res5.pii.F1000 Faculty Rev.1947》,2016,肽;Tsomaia,《欧洲药物化学杂志(Eur J Med Chem)》94:459-470,2015;

Marschall ALJ等人,《Mabs》7:1010-1035,2015;AlDeghaither D等人,《临床药理学杂志 (J Clin Pharmacol.)》55:S4-S20,2015))) 并且包含对肿瘤细胞、肿瘤干细胞、肿瘤相关的内皮和肿瘤相关的基质具有治疗作用的药剂。特别令人感兴趣的是能够发挥多种功能的分子,例如作为治疗剂、生物标志物和/或诊断剂。单纯性疱疹病毒胸昔激酶(HSV-TK)基因是一种成熟的前药转化酶,具有临床认可的前药(更昔洛韦-GCV),参见例如Holder等人,《癌症研究 (Cancer Res.)》53:3475-3485,1993,Touraine RL等人,《基因疗法 (Gene Therapy)》5:1705-1711,1998)。

[0266] 另外,胸昔激酶蛋白表达还可用于在治疗过程中成像和跟踪病毒疗法的活性。正电子发射断层扫描和单光子发射计算机断层扫描两者都是常规用于检测和监测癌症和癌症疗法的方法,并且两者都是在施用适当的胸昔激酶底物时用于检测胸昔激酶蛋白表达的可行性方法(Wang JQ等人,《生物有机与药物化学 (Bioorg Med Chem)》13:549-556,2005; Tjuvajev JG等人,《核医学杂志 (J Nucl Med)》43:1072-1083,2002)。可替代地,NIS基因可以被用作并且已经被用作用于溶瘤病毒中的诊断和治疗目的药剂,非常像TK (Miller A和Russell S,《生物治疗专家意见 (Expert Opin Biol Ther)》16:15-32,2016; Ravera S等人,《生理学年评 (Annu Rev Physiol)》79:261-289,2017; Portulano等人,《内分泌学评论 (Endocr Rev.)》35:106-149,2014)。

[0267] 在一个实施例中,相互作用并抑制RAS或RAS信号通路中的蛋白质的抗体被编码在本公开的病毒中,例如作为与GLA组分的融合蛋白。RAS基因构成包含HRAS、NRAS和KRAS的多基因家族。参见例如,Bos JL,《癌症研究 (Cancer Res.)》49:4682-4689,1989;和Cetin M等人,《分子生物学杂志 (J Mol Biol.)》429:562-573,2017。

[0268] 标记

[0269] 在一个实施例中,有效负载包括荧光标记、化学发光标记、放射性标记、酶、染料或配体。

[0270] 根据本公开的标记被定义为可以使用试验检测的任何部分。报道分子的非限制性实例包含酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、光亲和分子、有色颗粒或配体,如生物素。本文所采用的标记还包含标签,例如His标签、Flag标签等。标记包含生物素,所述生物素是抗生物素蛋白的底物。

[0271] 标记可以通过缀合或融合连接到GLA组分。标记是唯一的有效负载,或附加到另一个实体(如治疗有效负载)。

[0272] 标记缀合物适合用作诊断剂。诊断剂通常分为两类,一类用于体外诊断,并且另一类用于体内诊断方案,通常称为“定向成像”。许多合适的成像剂在本领域中是已知的,以及其附着于肽和多肽的方法也是已知的(参见例如,美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。所使用的成像部分可以是顺磁离子、放射性同位素、荧光染料、NMR可检测物质和X光成像剂。

[0273] 在顺磁离子的情况下,可以通过举例提及离子,如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)和/或铒(III),其中钆是特别优选的。适用于其它上下文的离子,如X光成像,包含但不限于镧(III)、金(III)、铅(II),并且尤其是铋(III)。

[0274] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可提及砹²¹¹、¹⁴碳、⁵¹铬、³⁶

氯、⁵⁷钴、⁵⁸钴、铜⁶⁷、¹⁵²Eu、镓⁶⁷、³氢、碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹³¹、铟¹¹¹、⁵⁹铁、³²磷、铼¹⁸⁶、铼¹⁸⁸、⁷⁵硒、³⁵硫、锝^{99m}和/或钇⁹⁰。¹²⁵I适用于某些实施例,而锝^{99m}和/或铟¹¹¹由于其能量低且适于长距离检测而特别适用。放射性标记的肽和多肽可以根据本领域众所周知的方法产生。例如,肽和多肽可以通过与碘化钠和/或碘化钾以及化学氧化剂(如次氯酸钠)或酶氧化剂(如乳过氧化物酶)接触而碘化。可以通过配体交换过程用锝^{99m}标记肽,例如通过用亚锡溶液还原高锝酸盐,将还原的锝螯合到葡聚糖凝胶柱(Sephadex column)上,并且将肽应用于此柱。可替代地,可以使用直接标记技术,例如通过温育高锝酸盐、还原剂如SNC1₂、缓冲溶液如邻苯二甲酸钠钾溶液和肽。通常用于将作为金属离子存在的放射性同位素与肽结合的中间官能团是二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0275] 适合用作有效负载的荧光标记包含Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、级联蓝色、Cy3、Cy5、6-FAM、荧光素异硫氰酸盐、HEX、6-Joe、俄勒冈绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明,和/或得克萨斯州红。

[0276] 另一种类型的有效负载是适用于体外的有效负载,其中肽与第二结合配体和/或酶(酶标签)连接,所述酶在与显色底物接触时将产生有色产物。合适的酶的实例包含尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。合适的二次结合配体是生物素和抗生物素蛋白以及链霉亲和素化合物。此类标签的使用对于本领域技术人员是熟知的并且描述于例如,在美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241。

[0277] 用于将肽连接到其“缀合配偶体(conjugate partner)”的附着的其它方法在本领域中是已知的。一些附着方法涉及使用金属螯合物,其使用例如,有机螯合剂如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA);乙烯三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或附着到抗体的四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3(美国专利4,472,509和4,938,948)。肽或多肽也可在偶联剂(如戊二醛或高碘酸盐)存在下与酶反应。在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸酯反应,制备与荧光素标记物的偶联物。

[0278] 在一个实施例中,标记能够染色或标记干细胞的细胞核。

[0279] 组合疗法

[0280] 在一个实施例中,所采用的化疗剂的组合是,例如铂和5-FU或其前体,例如顺铂或奥沙利铂和卡培他滨或吉西他滨,如FOLFOX。

[0281] 在一个实施例中,化学疗法包括化疗剂,具体地细胞毒性化疗剂的组合。

[0282] 在一个实施例中,化学疗法组合包括铂,如顺铂和氟尿嘧啶或卡培他滨。

[0283] 在一个实施例中,化学疗法组合包括卡培他滨和奥沙利铂(Xelox)。

[0284] 在一个实施例中,化学疗法是亚叶酸和5-FU的组合,任选地与奥沙利铂组合。

[0285] 在一个实施例中,化学疗法是亚叶酸、5-FU和伊立替康(FOLFIRI)的组合,任选地与奥沙利铂(FOLFIRINOX)组合。所述方案由以下组成:伊立替康(180mg/m² IV,90分钟以上)与亚叶酸(400mg/m²[或2×250mg/m²] IV,120分钟以上)同时施用;随后是氟尿嘧啶(400-500mg/m² IV推注),然后是氟尿嘧啶(2400-3000mg/m²静脉输注,46小时以上)。此周期通常每两周重复一次。上文所示的剂量可能因周期而异。

[0286] 在一个实施例中,化学疗法组合采用微管抑制剂,例如硫酸长春新碱、埃博霉素A、N-[2-[(4-羟苯基)氨基]-3-吡啶基]-4-甲氧基苯磺酰胺(ABT-751),紫杉醇来源的化疗剂,例如紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇或多西他赛或其组合。

[0287] 在一个实施例中,化学疗法组合采用mTor抑制剂。mTor抑制剂的实例包含:依维莫司(everolimus)(RAD001)、WYE-354、KU-0063794、雷帕霉素(papamycin)(西罗莫司)、替西罗莫司(Temsirolimus)、地磷莫司(Deforolimus)(MK-8669)、AZD8055和BEZ235(NVP-BEZ235)。

[0288] 在一个实施例中,组合疗法采用MEK抑制剂。MEK抑制剂的实例包含:AS703026、CI-1040(PD184352)、AZD6244(司美替尼)、PD318088、PD0325901、AZD8330、PD98059、U0126-EtOH、BIX 02189或BIX 02188。

[0289] 在一个实施例中,化学疗法组合采用AKT抑制剂。AKT抑制剂的实例包含:MK-2206和AT7867。

[0290] 在一个实施例中,所述组合采用极光激酶抑制剂。极光激酶抑制剂的实例包含:极光A抑制剂I、VX-680、AZD1152-HQPA(巴拉塞蒂布(Barasertib))、SNS-314甲磺酸、PHA-680632、ZM-447439、CCT129202和橙皮苷。

[0291] 在一个实施例中,组合疗法采用p38抑制剂,例如如W02010/038086中所公开的,如N-[4-({4-[3-(3-叔丁基-1-p-甲苯基-1H-吡唑-5-基)脲基]萘乙酰胺-1-基}甲基)吡啶-2-基]-2-甲氧基乙酰胺基。

[0292] 在一个实施例中,所述组合采用Bcl-2抑制剂。Bcl-2抑制剂的实例包含:甲磺酸奥巴托克斯(obatoclax mesylate)、ABT-737、ABT-263(纳威托克斯(navitoclax)和TW-37。

[0293] 在一个实施例中,化学疗法组合包括抗代谢物,如卡培他滨(希罗达)、磷酸氟达拉滨、氟达拉滨(氟达拉)、地西他滨、雷替曲塞(拓优得)、盐酸吉西他滨和克拉屈滨。

[0294] 在一个实施例中,组合疗法包括更昔洛韦,其可有助于控制免疫反应和/或肿瘤血管形成。

[0295] 在一个实施例中,化学疗法包含PARP抑制剂。

[0296] 在一个实施例中,组合疗法包含具有对DHODH酶活性特异性抑制的癌症代谢抑制剂。

[0297] 在一个实施例中,本文的方法中采用的一种或多种疗法是节拍疗法,即用低剂量的抗癌药连续或频繁地治疗,通常与其它治疗方法伴随给予。

[0298] 在一个实施例中,提供了多个周期的治疗(如化学疗法)的使用,例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个。

[0299] 在一个实施例中,化学疗法以28天周期使用。

[0300] 本公开的GLA组分可以用于通过靶向源自感染细胞的胞外囊泡而适用于治疗以下感染中的一种或多种:不动杆菌属感染(鲍氏不动杆菌(Acinetobacter baumannii))、放射菌病(Actinomycosis)(衣氏放线菌(Actinomyces israelii)、戈氏放线菌(Actinomyces gerencseriae)和丙酸杆菌(Propionibacterium propionicus))、非洲睡眠病(African sleeping sickness)也被称为非洲锥虫病(African trypanosomiasis)(布氏锥虫(Trypanosoma brucei))AIDS-获得性免疫缺陷综合症(HIV(人体免疫缺损病毒))、变形虫病(Amebiasis)(痢疾阿米巴(Entamoeba histolytica))、边虫病(Anaplasmosis)(红孢子

虫属 (*Anaplasma species*))、血管圆线虫病 (*Angiostrongyliasis*) (管圆线虫属 (*Angiostrongylus*))、异尖线虫病 (*Anisakiasis*) (异尖线虫 (*Anisakis*))、炭疽 (*Anthrax*) (炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*))、溶血隐秘杆菌 (*Arcanobacterium haemolyticum*) 感染 (溶血隐秘杆菌)、阿根廷出血热 (*Argentine hemorrhagic fever*) (胡宁病毒 (*Junin virus*))、蛔虫病 (*Ascariasis*) (蛔虫 (*Ascaris lumbricoides*))、曲菌病 (*Aspergillosis*) (曲霉属真菌 (*Aspergillus*) 属)、星状病毒 (*Astrovirus*) 感染 (星状病毒科 (*Astroviridae*) 家族)、巴贝西虫病 (*Babesiosis*) (巴倍虫属)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 感染 (蜡样芽胞杆菌)、细菌性肺炎 (*Bacterial pneumonia*) (多种细菌)、细菌性阴道病 (*Bacterial vaginosis*) (细菌性阴道炎微生物群 (*Bacterial vaginosis*))、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 感染 (拟杆菌属)、小袋虫病 (*Balantidiasis*) (结肠小袋纤毛虫 (*Balantidium coli*))、巴尔通氏体病 (*Bartonellosis*) (巴尔通氏体属)、贝蛔属 (*Baylisascaris*) 感染 (贝蛔属)、BK 病毒感染 (BK 病毒)、黑色发结节病 (*Black piedra*) (结节菌)、芽囊原虫病 (*Blastocystosis*) (芽囊原虫属)、芽生菌病 (*Blastomycosis*) (皮炎芽生菌)、玻利维亚出血热 (*Bolivian hemorrhagic fever*) (马丘波病毒 (*Machupo virus*))、肉毒中毒 (*Botulism*) 和婴儿型肉毒中毒 (*Infant botulism*) ((肉毒梭状芽胞杆菌 (*Clostridium botulinum*)) ; 注意: 肉毒中毒不是由肉毒杆菌毒素的摄取引起的肉毒杆菌感染)、巴西出血热 (*Brazilian hemorrhagic fever*) (萨比亚病毒 (*Sabiávirus*))、布鲁氏菌病 (*Brucellosis*) (布鲁氏菌)、黑死病 (*Bubonic plague*) (肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*))、伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*) 感染 (伯克霍尔德菌)、布路里溃疡病 (*Buruli ulcer*) (溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*))、杯状病毒 (*Calicivirus*) 感染 (杯状病毒科 (*Caliciviridae*)) (诺瓦克病毒 (*Norovirus*) 和沙波病毒 (*Sapovirus*)))、*Campylobacteriosis* (弯杆菌病 (*Campylobacter*))、念珠菌病 (*Candidiasis*) 也称为鹅口疮 (*Thrush*) (念珠菌)、毛细线虫病 (*Capillariasis*) 菲律宾毛线虫 (*Capillaria philippinensis*) 引起的肠道疾病 (*Intestinal disease*)、由肝毛细线虫 (*Capillaria hepatica*) 引起的肝脏疾病 (*hepatic disease*) 和由嗜气毛细线虫 (*Capillaria aerophila*) 肺部疾病 (*pulmonary disease*)) 卡里翁氏病 (*Carrion's disease*) (杆菌状巴尔通体 (*Bartonella bacilliformis*))、猫抓病 (*Cat-scratch disease*) (韩瑟勒巴通氏菌 (*Bartonella henselae*))、蜂窝组织炎 (*Cellulitis*) (通常A组链球菌 (*Streptococcus*) 和葡萄球菌 (*Staphylococcus*))、查加斯病 (*Chagas Disease*) 也称为南美洲锥虫病 (*American trypanosomiasis*) (克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*))、软性下疳 (*Chancroid*) (杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*))、水痘 (*Chickenpox*) (水痘-带状疱疹病毒 (*Varicella zoster virus*))、基孔肯雅病 (*Chikungunya*) (甲病毒属 (*Alphavirus*))、衣原体 (*Chlamydia*) (沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*))、肺炎衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*) 感染也称为TWAR (肺炎衣原体)、霍乱病 (*Cholera*) (霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*))、色芽生菌病 (*Chromoblastomycosis*) (裴氏着色真菌 (*Fonsecaea pedrosoi*))、壺菌病 (*Chytridiomycosis*) (蛙壺菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*))、支睾吸虫病 (*Clonorchiasis*) (华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*))、难辨梭菌结肠炎 (*Clostridium difficile colitis*) (艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*))、球孢子菌病 (*Coccidioidomycosis*) (粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*) 和波萨达斯球孢子菌

(*Coccidioides posadasii*))、科罗拉多壁虱热 (Colorado tick fever) (科罗拉多蜱传热病毒)、普通感冒 (Common cold) / 急性病毒性鼻咽炎 (Acute viral rhinopharyngitis) / 急性鼻卡他 (Acute coryza) (通常鼻病毒 (rhinoviruses) 和冠状病毒 (coronaviruses))、克里米亚-刚果出血热 (Crimean-Congo hemorrhagic fever) (刚果出血热病毒 (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus))、隐球菌病 (Cryptococcosis) (新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*))、隐孢子虫病 (Cryptosporidiosis) (隐孢子虫 (*Cryptosporidium*))、皮肤幼虫移行症 (Cutaneous larva migrans) (通常巴西钩口线虫 (*Ancylostoma braziliense*) 和多个其它寄生虫)、圆孢球虫病 (Cyclosporiasis) (环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*))、囊尾幼虫病 (Cysticercosis) (有钩绦虫 (*Taenia solium*))、巨细胞病毒 (Cytomegalovirus) 感染 (巨细胞病毒)、登革热 (Dengue fever) (登革热, 如DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)、双核阿米巴病 (Dientamoebiasis) (脆双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*))、白喉 (Diphtheria) (白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*))、裂头绦虫病 (Diphyllobothriasis) (裂头绦虫 (*Diphyllobothrium*))、麦地那龙线虫病 (Dracunculiasis) (麦地那龙线虫 (*Dracunculus medinensis*))、埃博拉病毒 (Ebola) 出血热 (hemorrhagic fever) (埃博拉病毒 (*Ebolavirus*))、包虫病 (Echinococcosis) (棘球绦虫 (*Echinococcus*))、埃里希体病 (Ehrlichiosis) (埃立克体属 (*Ehrlichia*))、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) (耐碳青霉烯类肠杆菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae))、蛲虫病 (Enterobiasis) (蠕形住肠蛲虫 (*Enterobius vermicularis*))、肠球菌 (Enterococcus) 感染 (肠球菌 (*Enterococcus*))、肠病毒 (Enterovirus) (肠病毒)、行性斑疹伤寒 (Epidemic typhus) (普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*))、传染性红斑 (Erythema infectiosum) (细小病毒 (Parvovirus) B19)、幼儿急疹 (Exanthem subitum) (人类疱疹病毒6 (Human herpesvirus 6) (HHV-6) 和人类疱疹病毒7 (Human herpesvirus 7) (HHV-7))、片吸虫病 (Fasciolasis) (肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 和巨片吸虫 (*Fasciola gigantica*))、姜片虫病 (Fasciolopsiasis) (布氏姜片虫 (*Fasciolopsis buski*))、丝虫病 (Filariasis) (丝虫目 (Filarioidea))、由产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 引起的食物中毒 (Food poisoning) (产气荚膜梭菌)、独立生存的阿米巴感染 (Free-living amebic infection) (各种病原体)、梭菌属 (*Fusobacterium*) 感染 (梭菌属)、气性坏疽 (Gas gangrene) (通常梭菌, 如产气荚膜梭菌 (*perfringens*))、地霉病 (Geotrichosis) (白地霉 (*Geotrichum candidum*))、梨形鞭毛虫病 (Giardiasis) (肠兰伯氏鞭毛虫 (*Giardia lamblia*))、鼻疽病 (Glanders) (鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia mallei*))、颤口虫病 (Gnathostomiasis) (棘聘口线虫 (*Gnathostoma spinigerum*) 和刚棘颤口线虫 (*Gnathostoma hispidum*))、淋病 (Gonorrhea) (淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*))、腹股沟肉芽肿 (Granuloma inguinale) (克雷伯氏肉芽肿病 (*Klebsiella granulomatis*))、A组链球菌感染 (streptococcal infection) (酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*))、B组链球菌感染 (无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*))、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 感染 (流感嗜血杆菌)、手足口病 (Hand, foot and mouth disease) (肠道病毒、主要是柯萨奇病毒A和肠病毒71 ((EV71)))、汉坦病毒 (Hantavirus) 肺综合征 (Pulmonary Syndrome) (辛诺柏病毒 (*Sin Nombre virus*))、腹地病毒 (Heartland virus) 疾病 (腹地病毒)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 感染

(幽门螺杆菌)、溶血性尿毒症综合征 (Hemolytic-uremic syndrome) (大肠杆菌, 如O157:H7、O111和O104:H4)、肾综合征出血热 (Hemorrhagic fever with renal syndrome) (布尼亞病毒科 (Bunyaviridae) 家族)、甲型肝炎 (Hepatitis A) (甲型肝炎病毒 (Hepatitis Avirus))、乙型肝炎 (Hepatitis B) (乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus))、丙型肝炎 (Hepatitis C) (丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus))、丁型肝炎 (Hepatitis D) (丁型肝炎病毒 (Hepatitis D Virus))、戊型肝炎 (Hepatitis E) (戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus))、单纯性疱疹 (Herpes simplex) (单纯性疱疹1和2 (Herpes simplex virus 1 and 2) (HSV-1和HSV-2))、组织胞浆菌病 (Histoplasmosis) (荚膜组织胞浆菌 (Histoplasma capsulatum))、钩虫感染 (Hookworm infection) (十二指肠钩虫 (Ancylostoma duodenale) 和美洲钩虫 (Necator americanus))、人类博卡病毒感染 (Human bocavirus infection) (人类博卡病毒)、人类埃翁氏埃里希体 (Human ewingii ehrlichiosis) (伊氏埃立克体 (Ehrlichia ewingii))、人粒细胞无形体病 (Human granulocytic anaplasmosis) (嗜吞噬细胞无形体 (Anaplasma phagocytophilum))、人变位肺病毒感染 (Human metapneumovirus infection) (人变位肺病毒)、人单核细胞埃立克体病 (Human monocytic ehrlichiosis) (查菲埃立克体 (Ehrlichia chaffeensis))、乳头瘤病毒感染 (Human papillomavirus infection) (人乳头瘤病毒)、人副流感病毒感染 (Human parainfluenza virus infection) (人副流感病毒)、膜壳绦虫病 (Hymenolepiasis) (微小膜壳绦虫 (Hymenolepis nana) 和缩小膜壳绦虫 (Hymenolepis diminuta))、EB病毒传染性单核细胞增多症 (Epstein-Barr virus infectious mononucleosis) (EB病毒)、流行性感冒 (Influenza) (正粘病毒科 (Orthomyxoviridae))、等孢球虫病 (Isosporiasis) (贝氏等孢子球虫 (Isospora belli))、川崎病 (Kawasaki disease)、角膜炎 (Keratitis) (各种病原体)、金格杆菌感染 (Kingella kingae infection) (金格杆菌)、拉沙热 (Lassa fever) (拉沙病毒 (Lassa virus))、军团病 (Legionellosis) 也称为军团病 (嗜肺军团菌 (Legionella pneumophila))、军团病也称为庞蒂亚克热 (Pontiac fever) (嗜肺军团菌)、利什曼病 (Leishmaniasis) (利什曼虫)、麻风病 (Leprosy) (麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae) 和弥漫型麻风分枝杆菌 (Mycobacterium lepromatosis))、钩端螺旋体病 (Leptospirosis) (钩端螺旋体属 (Leptospira))、李氏杆菌病 (Listeriosis) (单核细胞增多性李斯特氏菌 (Listeria monocytogenes))、莱姆病 (Lyme disease) (伯氏疏螺旋体 (Borrelia burgdorferi)、伯氏疏螺旋体 (Borrelia garinii)、和疏螺旋体 (Borrelia afzelii))、淋巴丝虫病 (Lymphatic filariasis) (班氏吴策线虫 (Wuchereria bancrofti) 和马来丝虫 (Brugia malayi))、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (Lymphocytic choriomeningitis) (淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)、疟疾 (疟原虫)、马尔堡病出血热 (马尔堡病毒)、麻疹 (麻疹病毒)、中东呼吸综合征 (Middle East respiratory syndrome) (中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus))、类鼻疽 (Melioidosis) (类鼻疽伯克氏菌 (Burkholderia pseudomallei))、脑膜炎 (Meningitis) (各种)、脑膜炎球菌病 (Meningococcal disease) (脑膜炎奈瑟氏菌 (Neisseria meningitidis))、后殖吸虫病 (Metagonimiasis) (通常横川后殖吸虫 (Metagonimus yokagawai))、微孢子虫病 (Microsporidiosis) (葡萄球菌微孢子虫 (Microsporidia phylum))、接触传染性软疣 (Molluscum contagiosum) (接触传染性软疣病毒)、猴天花 (Monkeypox) (猴天花病毒)、流

行性腮腺炎 (Mumps) (流行性腮腺炎病毒)、鼠型斑疹伤寒 (Murine typhus) (斑疹伤寒立克次氏体 (*Rickettsia typhi*))、支原体肺炎 (Mycoplasma pneumonia) (肺炎支原体)、足分支菌病 (Mycetoma) (放线菌瘤 (Actinomycetoma)) 和真菌 (fungi) 真菌性足菌肿 (Eumycetoma)、蝇蛆病 (Myiasis) (寄生双翅目蝇幼虫 (parasitic dipterous fly larvae))、新生儿结膜炎 (Neonatal conjunctivitis) (最常见沙眼衣原体和淋球菌)、诺瓦克病毒感染 (诺瓦克病毒)、诺卡氏菌病 (Nocardiosis) (诺卡氏菌属, 如诺卡氏菌属星形诺卡菌 (*N. asteroides*))、盘尾丝虫病 (Onchocerciasis) (盘尾丝虫)、后睾吸虫病 (泰国肝吸虫 (*Opisthorchis viverrini*) 和猫肝吸虫 (*Opisthorchis felineus*))、副球孢子菌病 (Paracoccidioidomycosis) (巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*))、肺吸虫病 (Paragonimiasis) (并殖吸虫, 如卫氏肺吸虫 (*westermani*))、巴斯德菌病 (Pasteurellosis) (巴斯德菌、盆腔炎 (Pelvic inflammatory disease) (各种病原体)、百日咳 (Pertussis) (百日咳博代氏杆菌 (*Bordetella pertussis*))、鼠疫 (Plague) (鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*))、肺炎球菌感染 (S肺炎链球菌)、肺孢子虫性肺炎 (Pneumocystis pneumonia) (耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*))、肺炎 (各种病原体)、脊髓灰质炎 (脊髓灰质炎病毒)、普氏菌属感染 (Prevotella infection) (普氏菌属)、原发性阿米巴脑膜炎 (Primary amoebic meningoencephalitis) (通常福氏纳格里阿米巴原虫 (*Naegleria fowleri*))、进行性多灶性白质脑病 (Progressive multifocal leukoencephalopathy) (JC 病毒)、鹦鹉热 (Psittacosis) (鹦鹉热衣原体 (*Chlamydophila psittaci*))、Q发热 (伯纳特氏立克次氏体 (*Coxiella burnetii*))、狂犬病 (Rabies) (狂犬病病毒)、回归热 (Relapsing fever) (包柔氏螺旋体 (*Borrelia*) 如 *B. 赫姆西氏菌* (*B. hermsii*) 和 *B. 复发性贝氏菌* (*B. recurrentis*))、呼吸道合胞体病毒感染 (Respiratory syncytial virus infection) (呼吸道合胞体病毒)、鼻孢子菌病 (Rhinosporidiosis) (鼻孢子菌)、鼻病毒感染 (Rhinovirus)、立克次体感染 (立克次氏体属)、立克次氏体痘 (Rickettsialpox) (立克次氏体痘 (*Rickettsia akari*))、里夫特裂谷热 (Rift Valley fever) (里夫特裂谷热病毒)、落基山斑疹热 (Rocky Mountain spotted fever) (立氏立克次体)、轮状病毒感染 (轮状病毒)、风疹 (风疹病毒)、沙门氏菌病 (Salmonellosis) (沙门氏菌)、严重急性呼吸综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome) (SARS冠状病毒)、血吸虫病 (Schistosomiasis) (裂体吸虫属 (Schistosoma) (败血症 (Sepsis) (各种病原体)、志贺氏菌病 (Shigellosis) (志贺氏菌病)、带状疱疹 (Shingles) (水痘-带状疱疹病毒)、天花 (Smallpox) (大天花病毒或小天花病毒)、孢子丝菌病 (Sporotrichosis) (申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*))、葡萄球菌性食物中毒 (Staphylococcal food poisoning) (葡萄球菌)、葡萄球菌感染 (葡萄球菌感染)、类圆线虫病 (Strongyloidiasis) (粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*))、亚急性硬化性全脑炎 (Subacute sclerosing panencephalitis) (麻疹病毒)、梅毒 (Syphilis) (梅毒螺旋体)、绦虫病 (Taeniasis) (绦虫)、破伤风 (Tetanus) (破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*))、颜面癣 (Tinea barbae) (通常毛癣菌属 (*Trichophyton*))、头癣 (Tinea capitis) (断发毛癣菌 (*Trichophyton tonsurans*))、体癣 (Tinea corporis) (通常毛癣菌属)、股癣 (Tinea cruris) (通常絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*))、红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*) 和须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*))、手癣 (Tinea manum) (红色毛癣菌)、黑癣 (Tinea nigra) (通常威尼克外瓶霉 (*Hortaea*

werneckii))、脚癣 (Tinea pedis) (通常毛癣菌属)、甲癣 (Tinea unguium) (通常毛癣菌属)、花斑癣 (Tinea versicolor) (马拉色氏霉菌属 (Malassezia))、弓蛔虫病 (Toxocariasis) (犬弓蛔虫 (Toxocara canis) 或猫弓首线虫 (Toxocara cati))、沙眼 (Trachoma) (沙眼衣原体)、弓形体病 (Toxoplasmosis) (刚地弓形虫 (Toxoplasma gondii))、旋毛虫病 (Trichinosis) (旋毛虫 (Trichinella spiralis))、滴虫病 (Trichomoniasis) (阴道毛滴虫 (Trichomonas vaginalis))、鞭虫病 (Trichuriasis) (毛首鞭虫 (Trichuris trichiura))、肺结核 (Tuberculosis) (通常结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis))、兔热病 (Tularemia) (土拉弗朗西斯菌)、伤寒症 (Typhoid fever) (肠沙门氏菌肠亚种 (Salmonella enterica subsp. enterica))、伤寒血清 (serovar typhi))、斑疹伤寒 (Typhus fever) (立克次氏体)、解脲支原体感染 (Ureaplasma urealyticum infection) (解脲支原体)、溪谷热 (Valley fever) (粗球孢子菌 (Coccidioides immitis) 或球孢子菌属 posadasii)、委内瑞拉马脑炎 (Venezuelan equine encephalitis) (委内瑞拉马脑炎病毒)、委内瑞拉出血热 (Venezuelan hemorrhagic fever) (瓜纳瑞托病毒 (Guanarito virus))、创伤弧菌感染 (Vibrio vulnificus infection) (创伤弧菌)、副溶血弧菌肠炎 (Vibrio parahaemolyticus enteritis) (副溶血性弧菌 (Vibrio parahaemolyticus))、病毒性肺炎 (Viral pneumonia) (各种病毒)、西尼罗热 (West Nile Fever) (西尼罗病毒)、白癣 (White piedra) (白吉利毛孢子菌 (Trichosporon beigelii))、假结核耶尔森菌感染 (Yersinia pseudotuberculosis infection) (假结核耶尔森菌)、耶尔森氏鼠疫杆菌肠道病 (Yersiniosis) (小肠结肠炎耶尔森氏菌 (Yersinia enterocolitica))、黄热病 (黄热病毒) 和结合菌病 (Zygomycosis) (接合菌 (Zygomycetes))。

[0301] 胞内病原体

[0302] 胞内病原体可能是一些最难治疗的,因为一旦病原体进入细胞内,细胞环境可能会向病原体提供某种程度的保护。

[0303] 病原体,可以是病毒、细菌、真菌、原生动物等。本发明公开的分子特别适用于胞内病原体的治疗,具体地本文公开的那些病原体。

[0304] 值得注意的的胞内细菌包含韩瑟勒巴通氏菌、土拉弗朗西斯菌、单核细胞增多性李斯特氏菌、伤寒沙门氏菌、布鲁氏菌、军团杆菌、分枝杆菌(如结核分枝杆菌)、诺卡氏菌、马红球菌、耶尔森氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌。

[0305] 一种或多种抗生素,选自红霉素、多西环素、阿奇霉素、利福平、链霉素、庆大霉素、多西环素、环丙沙星、氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、氯霉素、TMP-SMZ(甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)、左氧氟沙星、莫西沙星、克拉霉素、四环素、甘草环素、乙胺丁醇、利福布汀、亚胺培南、头孢噻肟、阿米卡星、万古霉素、米诺环素、青霉素G、氨苄西林、氟喹诺酮、氨曲南以及其中两种或更多种的组合。

[0306] 众所周知,结核分枝杆菌很难治疗。在一个独立方面,本公开提供了用于治疗潜伏性和/或活性TB的分子,其中一种或多种TB药物作为有效负载与本文所描述的GLA组分缀合。

[0307] 本公开的分子可以能够通过将药物递送到分枝杆菌所在的细胞内来显著提高当前药物的功效。

[0308] TB的治疗取决于多种因素,包含TB是潜伏性的还是活动性的,如果患者是成人、儿童、孕妇、HIV阳性或以上的组合。下文的细节涉及本发明的所有方面,例如,制备什么样分子以及如何使用分子治疗患者。

[0309] 对HIV患者和2到11岁范围内的儿童的潜伏性TB的治疗是每天服用异烟肼,持续6到9个月。怀孕的患者可以每周接受治疗两次,而不是每天。

[0310] 因此,在本公开的分子的一个实施例中,GLA组分与包括异烟肼或其等同物的有效负载连接。

[0311] 对12岁或12岁以上无复杂因素的潜伏性TB患者的治疗是可以每周一次给予异烟肼和利福喷汀治疗,持续3个月。可替代地,利福平可以每日给予,持续4个月。

[0312] 因此,在一个实施例中,有效负载进一步包括利福喷汀。

[0313] 可替代地,可以提供分子,其中如本文所描述的,GLA结构域与包括利福喷汀的有效负载连接。可以提供根据本公开的分子组合以用于治疗。

[0314] 活动性TB的一线治疗通常选自异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺以及其中两种或更多种的组合。

[0315] 因此,提供了根据本公开的分子,所述分子包括如本文所描述的,与包括利福平的有效负载连接的GLA组分。

[0316] 还提供了根据本公开的分子,所述分子包括如本文所描述的,与包括乙胺丁醇的有效负载连接的GLA组分。

[0317] 在另一个实施例中,提供了根据本公开的分子,所述分子包括如本文所描述的,与包括吡嗪酰胺的有效负载连接的GLA组分。

[0318] 如明确设想,如本文所公开的用于采用胞外囊泡治疗TB的有效负载可以包括两种或更多种,如三种药物或四种药物,如:异烟肼和利福霉素、异烟肼和吡嗪酰胺、异烟肼和乙胺丁醇、利福霉素和吡嗪酰胺、利福霉素和乙胺丁醇、吡嗪酰胺和乙胺丁醇、异烟肼和利福霉素和吡嗪酰胺、异烟肼和利福霉素和乙胺丁醇,以及异烟肼和利福霉素和吡嗪酰胺和乙胺丁醇。

[0319] 病毒病原体包含流感、人体免疫缺陷病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、天花病毒、呼吸道合胞病毒、朝鮮出血热病毒、水痘、水痘带状疱疹病毒、单纯性疱疹病毒1或2、人类疱疹病毒第四型、马尔堡病毒、汉坦病毒、黄热病毒、甲型、乙型、丙型或戊型肝炎、埃博拉病毒、人乳头瘤病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒(rubella virus)、狂犬病毒、新城疫病毒、轮状病毒(rotavirus)、HIV(如HTLV-1和-2)。

[0320] 抗病毒药物可与GLA组分相连,可独立地选自以下中的一种或多种:阿巴卡韦、阿昔洛韦、阿昔洛韦、阿德福韦、金刚烷胺、安普那韦、安普利根、阿比多尔、阿扎那韦、阿特普拉、博西普韦尔特、西多福韦、可比韦、地瑞那韦、地拉韦啶、地达诺新、二十二醇、依度尿苷、依非韦伦、恩曲他滨、恩夫韦地、恩替卡韦、进入抑制剂、泛昔洛韦、福米韦生、福桑普那韦、膦甲酸钠、膦乙酸钠、更昔洛韦、依巴他滨、异丙肌苷、碘苷、咪喹莫特、茚地那韦、肌苷、整合酶抑制剂、III型干扰素、II型干扰素、I型干扰素、干扰素、拉米夫定、洛匹那韦、洛韦利德、马拉韦罗、吗啉脒胍、美替沙腙、奈非那韦、奈韦拉平、多吉美、核苷类似物、奥瑟他韦、聚乙二醇干扰素 α -2a、喷昔洛韦、帕拉米韦、普拉康纳利、足叶草毒素、蛋白酶抑制剂、雷特格韦、逆转录酶抑制剂、利巴韦林、金刚烷乙胺、利托那韦、嘧啶、沙奎那韦、司他夫定、协同增效剂

(抗逆转录病毒)、茶树油、特拉匹韦、替诺福韦、替诺福韦二吡呋酯、替普那韦、三氟尿苷、拉米夫定、曲金刚胺、特鲁瓦达、伐昔洛韦、缬更昔洛韦、维立韦罗、维达拉滨、塔利韦林、扎西他滨、扎那米韦和齐多夫定。

[0321] 在技术领域众所周知的是,抗病毒药物可以组合使用,例如以提高效力。

[0322] 因此,在一个实施例中,本发明的分子提供有治疗原生动物疾病的有效负载,例如疟疾、非洲睡眠病等。

[0323] 值得注意的原生动物寄生虫包含疟原虫型寄生虫,如疟疾。用于治疗疟疾的药物,如奎宁和相关药剂、氯喹、阿莫地喹、乙嘧啶、氯胍、磺胺类、甲氟喹、阿托伐醌、伯氨喹、青蒿素和其衍生物、卤泛曲林、多西环素、克林霉素、磺胺嘧啶以及其中两种或更多种的组合。

[0324] 在一个实施例中,本公开的分子以包含赋形剂、稀释剂和/或载剂的药用组合物的形式提供。在一个实施例中,所述组合物是肠胃外制剂。

[0325] 肠胃外制剂意指被设计成不通过胃肠道递送的制剂。典型的肠胃外递送途径包含注射、植入或输注。

[0326] 在一个实施例中,肠胃外制剂是以注射的形式。注射包含静脉注射、皮下注射、颅内注射、鞘内注射、肿瘤内注射或肌内注射。如本文所采用的,注射意指通过注射器将液体注入体内。

[0327] 在一个实施例中,肠胃外制剂是以输注的形式。

[0328] 如本文所采用的,输注意指通过滴注、输注泵、注射器驱动器或等效装置以较慢的速率施用流体。在一个实施例中,输注在1.5分钟到120分钟的范围时间段内施用,如约3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、65分钟、70分钟、65分钟、80分钟、85分钟、90分钟、95分钟、100分钟、105分钟、110分钟或115分钟。

[0329] 在一个实施例中,所述制剂用于静脉内(i.v.)施用。此途径特别有效,因为其可以快速进入大多数器官和组织,并且对于治疗转移特别有用,例如已确定的转移,尤其是位于高度血管化区域(如肝和肺)的转移。

[0330] 治疗制剂通常在制造和储存条件下是无菌的且稳定的。所述组合物可以配制成溶液、微乳剂、脂质体或其它适于人体施用的肠胃外制剂,并且可以配制成预填充装置,例如注射器或小瓶,具体地单剂量。

[0331] 如上文所讨论的,制剂通常包括药学上可接受的稀释剂或载剂,例如与病毒相容的无毒、等渗载剂,并且其中病毒在所需时间段内是稳定的。

[0332] 载剂可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,通过使用分散剂或表面活性剂,如卵磷脂或如聚山梨醇酯80或40等非离子表面活性剂,可以保持适当的流动性。在分散体中,可以通过表面活性剂的存在来辅助维持所需的粒度。等渗剂的实例包含组合物中的糖、如甘露醇等多元醇、山梨糖醇或氯化钠。

[0333] 因此,在实施例中,提供了根据本公开的分子,其中本文所描述的GLA组分与包括一种或多种抗疟疾药的有效负载连接。

[0334] 在本说明书的上下文中,“包括”旨在意指“包含”。

[0335] 在技术上适当时,可以组合本发明的实施例。

[0336] 实施例在本文描述为包括某些特征/要素。本公开还延伸到分开由所述特征/要素组成或基本由所述特征/要素组成的实施例。

[0337] 如专利和申请等技术参考文献通过引用并入本文。

[0338] 技术背景是本说明书的技术公开的一部分,并且可以用作修改的基础,因为其中的讨论不限于讨论现有技术,因为其还包含讨论在本发明的领域和应用中遇到的技术问题。

[0339] 本文具体和明确地叙述的任何实施例可以单独或与一个或多个另外的实施例组合形成免责声明的基础。

[0340] 本申请要求以下美国序列号的优先权:62/554530、62/569,403、62/554533、62/569,411、62/584,565和62/593,014。这些申请中的每一项都通过引用并入本文。这些申请可以作为修正本说明书的基础。

[0341] 现在将参考以下实例描述本发明,这些实例仅仅是说明性的,并且不应解释为以任何方式进行限制本发明的范围。

[0342] 实例

[0343] 图1A-D示出了GLA蛋白结构的各种表示。

[0344] 图1E示出了根据本公开的GLA组分的实施例。

[0345] 图2示出了用过氧化物处理以诱导凋亡的乳腺癌细胞系的蛋白S(PrS)和膜联蛋白染色。A.经用氧化物处理并且用FITC-PrS染色的人MDA-231细胞。B.如A中经染色的、未处理的MDA-231细胞。C.用膜联蛋白染色的、经处理的MDA-231细胞。D.经用过氧化物处理并且用PrS染色的人MCF-7细胞。E.如D中的小鼠MET-1细胞。F.如D中的小鼠4T1细胞。

[0346] 图3示出了PrS和膜联蛋白的重叠,但不同的细胞定位。A.经用过氧化物处理并且用Cy5 PrS(红色)和FITC膜联蛋白(绿色)染色的小鼠4T1细胞。浅色箭头,共定位信号;红色箭头,用PrS而不是膜联蛋白进行染色的细胞;绿色箭头,用膜联蛋白染色相对较亮,而用PrS染色相对较不亮,指示不同的结合模式(插图分别示出了PrS和膜联蛋白染色)的细胞。B.用FITC PrS和Cy5膜联蛋白染色的、经处理的4T1细胞。绿色箭头,用PrS而不是膜联蛋白进行染色的细胞。C.用超过1,000倍的冷膜联蛋白预培养的经处理的4T1细胞的Cy5膜联蛋白染色。

[0347] 图4示出了用PrS和膜联蛋白对凋亡COS-1细胞的染色。如所描述的,用t-BHP处理细胞,并且用FITC膜联蛋白(左侧)和Cy5 PrS(右侧)染色细胞。箭头表示被假定是凋亡小体的亚细胞结构。

[0348] 图5示出了用PrS和膜联蛋白对胞外囊泡的鉴别染色。从4T1细胞制备胞外囊泡,并且用FITC PrS(绿色)和Cy5膜联蛋白(红色)染色。箭头表示仅用膜联蛋白(红色箭头)、仅PrS(绿色箭头)和两种蛋白质(浅色箭头)染色的囊泡。

[0349] 图6示出了PrS和膜联蛋白的亚细胞定位。A.B.用FITC PrS(绿色箭头)和Cy5膜联蛋白(红色箭头)对凋亡4T1细胞染色;浅色箭头,共定位。C.可能的凋亡小体。

[0350] 图7示出了5分钟内PrS的内化。凋亡4T1细胞是用FITC PrS(绿色)和Cy5膜联蛋白(红色)染色,并且在添加蛋白质后10分钟内成像。A.合并图像。B.仅赫斯特核染色(Hoescht nuclear stain)。

[0351] 图8示出了小鼠的4T1肿瘤的BLI图像。

[0352] 图9使用放射性标记的PrS和膜联蛋白对阿霉素对4T1肿瘤的影响进行SPECT成像。在阿霉素之前 (A和C) 和在阿霉素之后24小时后 (B和D) ,用^{99m}Tc PrS (A和B) 或膜联蛋白 (C和D) 对患有4T1乳腺癌肿瘤的小鼠进行成像。

[0353] 图10示出了环己酰亚胺处理的小鼠的SPECT成像。在处理之前 (A和C) 和在处理后24小时 (B和D) ,每试验组显示五只小鼠。用^{99m}Tc PrS (A和B) 或膜联蛋白 (C和D) 对小鼠进行成像,箭头表示肝脏信号增强。

[0354] 图11示出了Cy5 PrS在感染脾脏中的定位。CD1小鼠感染了生物发光李斯特菌,并在感染后第2天成像。处死前30分钟,给小鼠注射Cy5 PrS,并去除脾脏并冷冻。示出了中等感染 (A) 和对照未感染 (C) 的小鼠。示出了Cy5通道中每只小鼠的感染 (B) 和未感染 (D) 脾脏的切片,并与相衬图像合并。

[0355] 图12示出了Cy5 PrS在用阿霉素处理的肿瘤中的定位。植入了4T1乳腺癌肿瘤的小鼠用阿霉素处理 (右试验组) 或其余小鼠未处理 (左试验组) 。24小时后,给小鼠静脉注射Cy5 PrS,并且在30分钟后处死。去除肿瘤、冷冻,并切片以用于荧光显微镜检查。示出了四只不同小鼠的合并的Cy5/相衬图像。

[0356] 图13示出了TSC的分化。在存在 (左) 或不存在 (右) 生长因子的情况下培养TSC。右试验组中的箭头表示具有分化特征的巨细胞。

[0357] 图14示出了滋养层干细胞和分化的滋养层细胞的PrS染色。滋养层干细胞 (左) 通过取出生长因子分化成滋养层巨细胞 (右) 。将细胞用Cy5 PrS染色并成像。

[0358] 图15示出了MSC分化。如文中所描述对MSC进行处理,以分化成脂肪细胞 (上部试验组) 或成骨细胞 (下部试验组) 。在每种情况下,分化的细胞均表现出预期的形态。

[0359] 图16示出了用PrS (绿色) 、膜联蛋白 (红色) 和赫斯特 (Hoechst) (蓝色) 染色的MSC。加入染色剂混合物后10分钟内对细胞成像。

[0360] 图17示出了用PrS (绿色,最亮的区域) 、膜联蛋白 (红色,细胞膜周围的浅色区域) 和赫斯特 (Hoechst) (蓝色) 染色的TSC。加入染色剂混合物后5分钟内对细胞成像。

[0361] 图18示出了TSC囊泡的分化染色。如图17中,对TSC染色。这组细胞正在分泌用膜联蛋白 (红色) 而不是PrS (绿色) 染色的大囊泡。

[0362] 图19示出了C17.2神经祖细胞的PrS染色。细胞用PrS-FITC染色,并用标准 (非共焦) 显微镜成像。

[0363] 图20示出了将PrS在4C下内化成TSC。在4C下,将FITC PrS (绿色) 和Cy5膜联蛋白 (红色) 添加到TSC中,并用共焦显微镜成像。

[0364] 图21示出了小鼠骨髓的谱系阴性SCA-1/c-试剂盒染色细胞。在分析中的这一点上,细胞未用PI (碘化丙啶;用于检测死亡细胞) 或PrS染色。造血谱系染色不存在 (左试验组) ,并且c-试剂盒和SCA1的染色 (右试验组) 定义了HSC群,以绿色 (最亮的区域) 示出。

[0365] 图22示出了长期HSC的PrS染色。如图1中所示对HSC进行分离,并且用FITC PrS染色。使用Cy7 (x轴) 确定SLAM模式。

[0366] 图23示出了短期HSC的PrS染色。如图1中所示对HSC进行分离,并且用FITC PrS染色。使用Cy7 (x轴) 确定SLAM模式。

[0367] 图24示出了长期HSC中PrS的内化。如所描述的,制备HSC、用PrS染色并且用共焦显

微镜检查。绿色(最亮的区域), FITC PrS; 蓝色, 赫斯特核染色; 红色, PI。请注意, PI染色被排除在细胞核之外, 这表示细胞是活着的。

[0368] 图25示出了表现细胞核PI的死亡的HSC的实例。

[0369] 图26 GLA介导的递送对细胞无毒。

[0370] 本说明书在相关的序列表中还包含序列1到6。

[0371] 此项目启动了对标记的重组PrS作为SPECT(单光子计算机断层扫描)的体内成像剂的测试。令人惊讶地发现, 分子迅速内化成凋亡细胞。这一出乎意料的发现使我们进一步探索了此现象, 于是随后我们发现PrS也被内化成若干类型的非凋亡干细胞的子集。

[0372] PrS是SEQ ID N0:6中所示的蛋白S GLA结构域和蛋白S EGF结构域。

[0373] 方法

[0374] 对于荧光, 根据制造商的说明, 分别使用安玛西亚(Amersham)(GE医疗)和分子探针公司(Molecular Probes)(英杰公司(Invitrogen))标记试剂盒实现Cy5和FITC的缀合。两种试剂盒均提供了用于去除未缀合的荧光团的色谱柱。最初, 用FITC标记1ml中的0.77mg PrS(份数2)和1ml中的0.77mg膜联蛋白, 以测试与凋亡细胞结合的特异性。对于共定位和竞争研究, 用Cy5标记1ml中的0.68mg PrS(份数3)和0.68mg膜联蛋白。对于共焦显微镜, 用FITC标记第二批货物中的0.76mg PrS, 并且使用先前标记的Cy5缀合膜联蛋白。应该注意的是, 根据标记试剂盒制造商的说明, 未确定标记的精确效率, 并且假定从色谱柱中回收率为85%。因此, 在任何情况下, 两种蛋白质的相对染色强度都可以反映出这些意外情况。最初将细胞染色30分钟, 但随后确定少于5分钟就足够了。为了测试PrS的凋亡细胞特异性, 最初使用了四种乳腺癌细胞系; 人MDA-231和MCF7以及小鼠4T1和MET-1。随后, 还使用了COS-1猴肾细胞。用过氧化氢或氢过氧化叔丁基(t-BHP)诱导细胞凋亡。将细胞以每孔 6×10^4 个细胞铺板在24孔板中或以每孔 1×10^4 个细胞铺板在Eppendorf室玻片上, 并且第二天使用2mM H₂O₂或t-BHP诱导细胞凋亡, 持续时间点为30分钟到2小时。诱导后, 将孔用膜联蛋白结合缓冲液(AB; 圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotech))洗涤, 并且用标记蛋白染色。根据过去的经验和文献, 5.5 μ g/ml的膜联蛋白蛋白质用于染色。基于所提供的凝胶图像, 通过假设膜联蛋白的分子量为36kD, 并且重组PrS为30kD, 来调整PrS的等摩尔添加量。将细胞染色持续15分钟。Hoechst 33342染料用于可视化核酸。然后用AB洗涤孔, 并在仍然可行的情况下使用EVOS荧光显微镜观察。对于共焦显微镜, 采用了斯坦福细胞科学成像设施(Stanford Cell Sciences Imaging Facility)中的徕卡(Leica)SP8显微镜。然后用AB洗涤孔, 并使用徕卡sp8显微镜观察。Hoechst 33342染料用于可视化细胞核。为了进行毒性研究, 将PrS添加到滋养层干细胞(TSC)中, 并使用Nexcelom Cellometer用锥虫蓝测试了活力。

[0375] 为了测试标记的蛋白质检测肿瘤的能力, 将 5×10^4 4T1-1uc细胞植入左腋窝脂肪垫中的5只雄性BALB/c小鼠组中。从植入后1周开始, 每天使用体内生物发光成像(BLI)对小鼠进行成像, 以监测肿瘤的生长。然后在植入后第11天, 用13mg/kg体重的腹膜内(IP)阿霉素对小鼠进行处理, 并且第二天执行BLI。携带肿瘤的对照小鼠是其余未用阿霉素处理的小鼠。在处理后48小时, 在静脉内注射示踪剂之后1小时后(麻醉1.3g/kg的氨基甲酸乙酯IP), 用单头A-SPECT γ 照相机(γ 医学)对小鼠成像; 1mm针孔准直仪, 128步进入 128×128 成像矩阵, 每步15秒, 2.7cm ROR; FOV=上胸部/颈部。每个蛋白的注射剂量为160 μ l (800 μ Ci)。然后处死动物并进行生物分布。对于环己酰亚胺处理实验, 将5只(7周龄)年轻雄性瑞士韦伯斯

特(Swiss Webster)小鼠组麻醉(1.3g/kg的氨基甲酸乙酯IP),并静脉注射50mg/kg环己酰亚胺。注射环己酰亚胺后1小时45分钟,注射示踪剂(每剂PrS=180ul/1.2mCi;每剂膜联蛋白V=170μl/1.05mCi)。示踪剂注射后45分钟,使用单头平行孔准直仪(128×128矩阵)在A-SPECT γ 照相机上用10分钟静态全身图像对小鼠成像。

[0376] 为了测试荧光PrS在活体动物中由于感染导致在凋亡部位的特异性定位,向CD1小鼠静脉注射生物发光单核细胞增生性李斯特菌。此细菌病原体感染包含脾脏在内的许多器官,其中单核细胞和粒细胞的广泛凋亡发生。在感染后的某些时间,脾脏是细菌复制的主要位点,并且因此来自细菌的脾脏BLI信号可以与凋亡探针的定位相关。每天感染小鼠并对其进行成像。当脾脏信号明显时(感染后第2天,在8周龄的CD1雌性小鼠中感染 2×10^5 个菌落形成单位的细菌),将300mg/kg体重的Cy5 PrS注射进小鼠体内,在30分钟后处死动物,并且去除脾脏、在OCT中冷冻,并且切片用于荧光显微镜检查。采用未感染的对照小鼠。

[0377] 进行流式细胞术。采用如上所述制备的新近标记的FITC PrS。在此实验室中,对小鼠造血干细胞(HSC)近常规纯化。通过对c-试剂盒+谱系阴性细胞染色,从正常小鼠骨髓中分离细胞。为了进一步表征细胞,还进行了SLAM标志物染色。这些标志物对自我更新和分化的细胞进行染色,而不染色的HSC只能分化。如结果所示,随后用FITC PrS染色显示SLAM染色细胞中阳性百分比。然后将细胞分选到FITC,并用共焦显微镜检查,使用Hoechst 33342进行核可视化。

[0378] 结果

[0379] 为了评估细胞培养中凋亡过程中的PrS结合特异性,我们采用了几种人类和小鼠乳腺癌细胞系。如上所述用过氧化物诱导细胞凋亡,并评估FITC PrS结合。这些实验的实例在图2中示出。未处理的细胞表现出最小的结合,如图2的B试验组中所示。选择过氧化物的浓度和培养时间,使仅少数细胞受到影响,因为在较高的浓度和/或较长的培养时间下,细胞分离并且无法进行染色和显微镜检查。此外,许多未受影响的细胞的存在作为每个区域内的内部阴性对照。FITC膜联蛋白表现出类似于PrS的凋亡特异性,可作为内部阳性对照。然后,测试了这两种蛋白质的共定位和竞争结合。对于共定位,制备了FITC和Cy5标记的PrS和膜联蛋白。用过氧化物处理4T1细胞,并使用两种荧光团组合,用Cy5和FITC标记的PrS和膜联蛋白染色。然后在EVOS荧光显微镜下观察细胞。结果在图3中示出。在所测试的条件下,所有明亮染色的细胞均表现出用两种蛋白质的染色。然而,无论是使用Cy5还是FITC,PrS似乎都会染色一些膜联蛋白没有染色的细胞,尽管微弱(图3)。在两种探针之间,每种蛋白质对不同细胞的相对染色强度有时会有所不同,即,有时膜联蛋白以相同的强度对两个细胞进行染色,而PrS却没有,并且反之亦然(图3A,绿色箭头和插入物)。因此,尽管两种探针通常都染色相同的细胞,但其似乎表现出细微的差异。在竞争试验中,将增加过量的未标记膜联蛋白与凋亡4T1细胞预培养持续15分钟,并且然后用Cy5 PrS对细胞进行染色。出人意料的是,PrS的染色没有被(最高超量测试的(图3C)甚至1,000倍超量的膜联蛋白阻断,即使这些蛋白质被认为结合到相同的靶分子(即暴露的PS)。在许多细胞类型中都观察到膜联蛋白和PrS的共染色。虽然两种蛋白质通常在每种细胞类型中都对相同的细胞进行染色,但其它差异却变得明显。具体地,一些小于细胞的物体被差异地染色(图4)。这些物体在过氧化物处理后数量增加,被解释为凋亡小体;在凋亡细胞分裂过程中,产生膜结合细胞片段。如图4所示,PrS对这些实体进行染色,而膜联蛋白则没有,但是这些物体中的一些确实对两种

蛋白质都进行了染色。这种观察是未意料到的。为了进一步探索亚细胞实体的差异染色,使用标准离心协议从4T1小鼠肿瘤细胞制备了胞外囊泡(EV)。这两种蛋白质还对这些囊泡进行差异地染色(图5),这一结果可能具有生物学和治疗意义。

[0380] EV(具体地外泌体、微泡(MV)和凋亡小体(AB))被认为通过细胞间生物分子的转移在细胞-细胞的通讯中起关键作用。这些类型的EV的生物起源有所不同,并且其起源于内体(外泌体)或质膜(MV),或是程序性细胞死亡(AB)的产物。所有哺乳动物细胞都被认为分泌EV。每种类型的EV都可以将分子货物转移到邻近和远处两者的细胞,从而影响细胞行为,如那些涉及肿瘤发展和进程的行为。实际上,EV可以在几乎所有癌症特征中都起作用,包含维持增殖信号、逃避生长抑制、抵抗细胞死亡、重新编程能量代谢、获得基因组不稳定性和发展肿瘤微环境。EV还与血管生成的诱导、入侵的控制、抑制前生态位的启动、维持炎症和逃避免疫监视有关。免疫细胞似乎也可以通过EV进行通讯,并且认为EV是来自肿瘤细胞、感染组织和伤口的信号。对EV生物学及其对癌症特征的贡献的更深入了解,为诊断和治疗癌症带来了新的可能性。开发另外的EV表面标志物对于推进这一领域至关重要,而PrS可以是决定因素。

[0381] 用荧光显微镜进行这些研究之后,然后通过共焦显微镜评估PrS和膜联蛋白染色的亚细胞定位。将小鼠4T1细胞(缺少Luc-GFP报告基因)以每个腔室 1×10^4 个细胞铺板在8部分室玻片上,并且第二天用2mM H₂O₂或t-BHP(暴露2小时)诱导凋亡。然后洗涤细胞,并用PrS和膜联蛋白染色持续15分钟。Hoechst 33342染料用于染色核酸。在所有情况下,用两种探针对最明亮染色细胞进行染色。然而,在许多细胞中,在细胞质中观察到标记的PrS,而没有观察到标记的膜联蛋白(图6)。尽管膜联蛋白被内化并出现在少数细胞的囊泡中,但是在同一细胞中未观察到内化的膜联蛋白和表面定位的PrS。这些结果是出乎意料的,因为推测这两种蛋白质都结合了PS。

[0382] 然而,显然,两种蛋白质对测试的抑制剂的反应不同。为了进一步研究PrS的内化,进行了时程实验。用Cy5膜联蛋白和FITC PrS对凋亡4T1细胞进行染色,持续5分钟,并且在添加探针后5分钟内观察。在这些细胞的细胞质中立即观察到PrS,这表明在5分钟内内化(图7)。时程图像还显示,PrS和膜联蛋白在早期时间点并不总是等同地对相同的细胞进行染色。图7中的细胞似乎处于不同的凋亡阶段,因为左侧的细胞显示出被明显地完整的核膜包围的未浓缩的细胞核,而右边的细胞显示出强烈的染色,通常是在凋亡过程后期出现的染色质浓缩的特征。这样的染色模式可以表明PrS在凋亡中比膜联蛋白的结合更早。尽管在这一点上纯属猜测,但这种偏好可以解释迄今为止观察到的这些蛋白质之间的许多差异。例如,如图3A和B所示,一些细胞被PrS而不是膜联蛋白染色,这可能是由于PrS在凋亡过程中的结合较早。为了检查PrS在活体动物中的定位,进行了若干个实验。这些研究采用了体内化学和感染性诱导凋亡,以及将PrS定位于用阿霉素处理的肿瘤上,已知阿霉素可以诱导凋亡。在患有4T1luc乳腺肿瘤并用阿霉素处理的动物中,使用HYNIC标记的PrS和膜联蛋白,进行SPECT成像。因为4T1肿瘤已经用荧光素酶标记,所以可以使用体内生物发光成像(BLI)在小鼠中对其进行成像。此实验的图像之一如图8所示。此方法可用于评估肿瘤植入,并且跟踪随时间推移单个动物的进展情况。然后将^{99m}Tc标记的PrS和膜联蛋白用于用阿霉素处理的动物和对照的SPECT成像。所述结果的实例在图9中示出。两只动物的头部和胸部的图像显示PrS探针在唾液腺中非特异性积聚,和使用此探针的低信噪比。因此,所显示的PrS图

像中的显示阈值被降低以显示更多背景,从而导致图像的假彩色更明亮。低信噪比可能是由于HYNIC仅标记1mg蛋白质(次优),并且也由于无法进行HYNIC的对照研究:蛋白质标记比。

[0383] 还对用诱导肝脏凋亡的环己酰胺处理的小鼠进行SPECT成像(图10)。在图10中,每个试验组显示5只小鼠的全身图像。与许多放射性标记的探针一样,在肾脏中可以看到背景。用环己酰胺处理小鼠会增加肝脏中的膜联蛋白SPECT信号。再次,与膜联蛋白相比,PrS显示低信号。膜联蛋白能够检测环己酰胺处理的小鼠的凋亡肝脏,而PrS显示由于处理,肝脏中的信号仅轻微增加。为了独立于SPECT成像和HYNIC标记的伴随并发症来测试PrS在凋亡组织和处理的肿瘤中的定位,向用诱导凋亡反应的细菌感染的小鼠和携带肿瘤的小鼠注射Cy5 PrS。对于感染,采用了单核细胞增生李斯特菌(一种用荧光素酶标记的细菌病原体),具有良好的BLI特征。来自脾脏的特征性BLI信号提供了极好的共定位研究。如上所述感染CD1小鼠,并在感染后第2天用BLI对小鼠进行成像。然后向小鼠注射Cy5 PrS,并且将小鼠在30分钟后处死,并且去除脾脏以用于切片和荧光显微镜检查(图11)。在所有情况下,感染小鼠的脾脏切片显示出比对照组大得多的Cy5荧光信号。在图11中,所示出的感染小鼠显示出低光子计数,这表明此动物的感染尚未进展得很远。在这一天,许多小鼠表现出10倍于脾脏的信号强度。然而,相对于所示的未感染对照,Cy5通道荧光仍然非常强。这个结果可能反映了正在进行的对感染的先天免疫反应,因为粒细胞和巨噬细胞已被证明是此类动物中的膜联蛋白信号的主要来源(这些细胞被编程用于凋亡以限制组织破坏)。

[0384] 然后测试了荧光性PrS在用阿霉素处理的4T1肿瘤中的定位。如上所描述的,用阿霉素处理植入肿瘤的小鼠,并且在处死并去除肿瘤之前30分钟静脉注射Cy5 PrS,以用于切片和荧光显微镜检查。结果在图12中示出。在处理的动物中观察到强烈染色的区域,而从未处理的肿瘤切片观察到更适度的信号。尽管一些未处理的肿瘤确实显示出比背景高的信号的小区域,但是在任何未处理的切片中均未观察到与处理的肿瘤相似强度的信号。

[0385] 干细胞在表型上不同于分化的细胞,并且可以非凋亡地表达PS以避免免疫反应的诱导。滋养层干细胞(TSC)在培养中分化成若干类型的滋养层细胞。TSC是从在成纤维细胞生长因子、激活素和肝素存在下生长的小鼠子宫刮屑中制备的。当这些因子从培养基中去除时,TSC会自发分化成巨细胞(图13)。TSC用PrS染色,而在培养中源自这些细胞的分化的滋养层细胞没有染色(图14)。我们还确定了在没有凋亡诱导的情况下PrS被内化成干细胞。此结果证实了在诱导凋亡的肿瘤细胞系中进行的观察。在不诱导凋亡的情况下,在肿瘤细胞中观察到最小的染色。为了测试干细胞的内化,我们采用了间充质干细胞(MSC)和TSC。MSC是从小鼠骨髓中制备的。从小鼠体内冲洗骨髓,并且在不存在生长因子的情况下培养6天。在此培养期间中,MSC和造血干细胞(HSC)复制,而成纤维细胞粘着但不会增值超过几代。6天后,单层是可见的。胰蛋白酶消化传代后,粘着的MSC得以保留,而悬浮液中生长的HSC则丢失。由于缺乏生长因子,因此成纤维细胞不会存活,并且也不会被保留。因此,此简单程序导致了几乎同质的MSC群。为了确认这些细胞的同一性,我们分别用地塞米松和磷酸甘油(诱导分化成成骨细胞)或地塞米松和吲哚美辛(诱导分化成脂肪细胞)处理培养物。结果在图15中示出。响应于上述处理,分化的细胞显示出各个细胞的外观。脂肪细胞含有大的脂肪囊泡,并且成骨细胞是暗色的,具有独特的胞内胶原和矿化。

[0386] 为了评估亚细胞染色模式,用PrS和膜联蛋白以及Hoechst核染色剂对未分化的

MSC进行染色,并且用共焦显微镜观察。观察的结果在图16中示出。PrS被迅速内化。在MSC的情况下,大约20个细胞中有1个用PrS染色,与以前的数据一致,但是未确定染色的精确百分比。MSC的形态是异质的,并且细胞会向培养基中分泌大量物质,其中一些物质会粘着在玻片的表面上,从而在某些图像中产生背景。但是,数据清楚地显示了内化的PrS,在添加后5分钟内,并且表面上的膜联蛋白。TSC也像MSC一样被染色并成像。观察结果也证实了这些细胞的内化,这也发生在添加蛋白质后5分钟之内。结果在图17中示出。如图中可以看到的,TSC在形态上变化非常大,并且在没有分化的情况下可以是多核的。与MSC一样,这些原代细胞向培养基中释放大量物质,其中一些已经确定为胞外囊泡(以前的数据)。这种物质再次使成像变得困难。一些EV用膜联蛋白而不是PrS染色,并且这种现象在TSC中是可见的,如图18所示。在TSC簇的图像中,细胞释放的囊泡用膜联蛋白而不是被内化的PrS染色。这些模式引起有关PrS和膜联蛋白的特异性和结合目标的令人关注的问题。这两种蛋白质都被认为可以结合PS。但是,与EV的差异性结合以及不同的亚细胞定位模式表明,所述两种蛋白质并非以完全相同的方式结合。需要进一步研究来建立这种区别的基础,这可能证明是有意义的。我们还观察到神经祖细胞系C17.2(图19)的PrS染色,这是能够在体外分化成星形胶质细胞和其它神经元细胞的转化细胞系。这些转化细胞中约有5%被染色,尽管这个百分比是估计值。值得注意的是,即使将细胞冷却到4℃,也会进入TSC(图20)。然而,必须注意,一旦放在显微镜上,腔室就无法连续冷却。但是,在成像过程的5分钟的时间范围内温度,不可能升高太多。此结果虽然具有挑衅性,但必须在更加可控的条件下明确重复。如果发现得到证实,则所述机制的确将会非常令人关注。

[0387] 我们已经成功地用PrS对造血干细胞(HSC)进行染色。使用流式细胞术,我们确定HSC用PrS染色,并且通过共焦显微镜观察到这些细胞中PrS的内化。使用荧光激活细胞分选术(FACS)鉴定并分离HSC。在骨髓中这些细胞被鉴定为谱系阴性,SCA/c-试剂盒阳性细胞(图21)。然后将这些细胞用PrS-FITC染色。可以用SLAM标志物染色的模式鉴定短期和长期的两个HSC群。SLAM(信号淋巴细胞激活分子)标志物CD48、CD150、CD229和CD244用不同的模式对HSC进行差异地染色,使SLAM模式阳性的染色指示自我更新和分两者的能力,而SLAM模式阴性的HSC仅能够分化。PrS染色了长期HSC(图22)和短期HSC(图23)的子集。显示的细胞是碘化丙啶(PI)阴性的,这意味着所述细胞都是活细胞。此结果证实了先前的实验,所述先前的实验证明了干细胞的子集用PrS染色而没有诱导凋亡。

[0388] 然后,我们继续测试了将PrS内化到HSC。此实验因许多因素而变得复杂。也许最困难的是HSC在培养的存活,其在培养基中一夜之间大量死亡。因此,我们必须对实验进行计时,以便在同一天进行流式细胞术分析和共焦显微镜检查。此外,细胞不粘着,从而使显微镜检查不是很理想。为了使显微镜检查更有效,将细胞重悬于一小滴培养基中。最后,我们需要确保通过显微镜分析的PrS染色的细胞仍然是活着的。在分析和分离过程期间,许多HSC死亡。因此,除了Hoechst核染色剂之外,添加并扫描了PI,并且采用了另一个通道。PI亮核的存在表示细胞死亡。尽管存在这些困难和定时的复杂性,但我们仍能够进行实验并证实PrS内化到活的HSC(图24)。核PI染色的缺乏证实了这些细胞是活着的。然而,如图25所示,一些细胞已经死亡或正在死亡。尽管显示了实验的复杂性和时间长度,但结果显示内化。

[0389] 最后,在图26中,对TSC进行了初步毒性研究,并且确定在135μg/ml的浓度下,相对

于PBS,活力在30分钟后仅降低了非常小的程度,从78%降低到74%。考虑到在此水平下,10%的培养体积是含PrS的溶液,此结果证实了我们的定性观察结果,即PrS对干细胞基本上无毒,并且观察到的轻微毒性很可能是由于制备本身污染内容物所致。较低浓度的PrS对活力没有影响。测试的蛋白质的最高水平是用于染色的浓度的1000倍以上。虽然全毒性研究不是本项目的正式组成部分,但需要更广泛的测试,发现的情况是PrS显示出非常小的毒性。

发明内容

[0390]

[0391] 上述结果表明,PrS被迅速内化到包含许多类型的干细胞的表达PrS的细胞阵列中,这证明PrS具有适于操纵朝向开发治疗剂为目标的独特特征。另外,如图3和7所示,PrS和膜联蛋白之间的特异性差异表明这两种蛋白质之间的结合本身是不同的。膜联蛋白是四聚体而PrS是单体的事实不能解释这些差异,并且这些数据表明细胞表面的某些其它组分可能与PrS结合有关。PrS的结合、特异性和内化的机制以及模块操纵的能力提供了许多可能性。

[0392] 实例2

[0393] 干细胞在表型上不同于分化的细胞,并且可以非凋亡地表达PS以避免免疫反应的诱导。干细胞用包括荧光标记的有效负载的本公开的GLA结构域分子染色,而没有诱导凋亡。

[0394] 滋养层干细胞(图14)在胎盘中分化成若干类型的滋养层细胞,用蛋白S染色,而在培养中源自这些细胞的分化滋养层细胞却没有染色。所述染色剂能够区分体内分化的干细胞和体外分化的细胞。

[0395] 此数据表明,本公开的分子可以用于体内样品或离体样品中的靶细胞。

[0396] 结论

[0397] 胞外囊泡为一系列疾病的诊断和治疗提供了令人兴奋的机会。诸位发明人已经证明Gla结构域识别磷脂酰丝氨酸的表达。此属性可以用于:鉴定表达磷脂酰丝氨酸的胞外囊泡、分离胞外囊泡、靶向胞外囊泡和/或用例如治疗性物质加载囊泡。这是令人惊讶的,因为胞外囊泡是微小的亚细胞实体。

[0398] 参考文献

[0399] 1.Thompson,W.W.等人,使用四种不同方法对美国流感相关死亡人数的估计,《流感及其它呼吸道病毒(Influenza Other Respir Viruses)》,2009.3(1):第37-49页。

[0400] 2.Osterholm,M.T.等人,流感疫苗的效力和效果:系统回顾和元分析,《柳叶刀感染性疾病(Lancet Infect Dis)》,2012.12(1):第36-44页。

[0401] 3.Dixit,R.等人,奥司他韦耐药性的出现:流行病之前、期间和之后的流感控制和管理,《传染性疾病药物靶向(Infect Disord Drug Targets)》,2013.13(1):第34-45页。

[0402] 4.Jefferson,T.等人,用于成人和儿童流感的奥司他韦:临床研究报告的系统评价和法规评论摘要,《英国医学杂志(BMJ)》,2014,348:第g2545页。

[0403] 5.Godfrey,C.等人,递送至关重要:从开发剪接切换反义疗法中汲取的经验教训,《EMBO分子医学(EMBO Mol Med)》,2017.9(5):第545-557页。

- [0404] 6.Kaczmarek, J.C., P.S.Kowalski 和 D.G.Anderson, RNA治疗剂的递送进展:从概念到临床,《基因组医学 (Genome Med)》,2017.9(1):第60页。
- [0405] 7.Ling, H., 非编码RNA:治疗策略和递送系统,《实验医学与生物学进展 (Adv Exp Med Biol)》,2016,937:第229-37页。
- [0406] 8.Poon, I.K. 等人,凋亡细胞清除:基础生物学和治疗潜力,《自然评论免疫学 (Nat Rev Immunol)》,2014.14(3):第166-80页。
- [0407] 9.Birge, R.B. 等人,磷脂酰丝氨酸是在胞葬作用、感染性疾病和癌症中的整体免疫抑制信号,《细胞死亡分化 (Cell Death Differ)》,2016.23(6):第962-78页。
- [0408] 10.Amara, A. 和 J.Mercer, 病毒凋亡模拟,《自然综述:微生物学 (Nat Rev Microbiol)》,2015.13(8):第461-9页。
- [0409] 11.Moller-Tank, S. 和 W.Maury, 磷脂酰丝氨酸受体:包膜病毒进入和感染的增强剂,《病毒学 (Virology)》,2014.468-470:第565-80页。
- [0410] 12.Ludwig, S. 等人,在没有出现抗性变体的情况下MEK抑制削弱了乙型流感病毒的传播,《FEBS快报 (FEBS Lett)》,2004.561(1-3):第37-43页。
- [0411] 13.Sharma, R. 等人,磷脂酰丝氨酸阳性外泌体的检测用于早期恶性肿瘤的诊断,《英国癌症杂志 (Br J Cancer)》,2017.117(4):第545-552页。
- [0412] 14.Azuma, K. 等人,肝特异性 γ -谷氨酰羧化酶缺陷小鼠表现出出血性素质和寿命短,《公共科学图书馆综合 (PLoS One)》,2014.9(2):第e88643页。
- [0413] 15.Hjortoe, G. 等人,在肝细胞中因子VIIa的结合和内化,《血栓形成与止血期刊 (J Thromb Haemost)》,2005.3(10):第2264-73页。
- [0414] 16.Meliopoulos, V.A. 等人,高通量RNA干扰筛选阐明了新型流感疗法的宿主基因靶标,《FASEB J》,2012.26(4):第1372-86页。
- [0415] 17.Pleschka, S. 等人,通过抑制Raf/MEK/ERK信号级联削弱流感病毒的传播,《自然细胞生物学 (Nat Cell Biol)》,2001.3(3):第301-5页。
- [0416] 18.Makkoch, J. 等人,响应甲型流感病毒(亚型pH1N1、H3N2和H5N1)的人类微RNA分析剖析研究,《实验生物学和医学 (Exp Biol Med) (梅坞市)》,2016.241(4):第409-20页。
- [0417] 19.Wolf, S. 等人,甲型流感 (H7N9) 复制所必需的人类基因的微RNA调节,《公共科学图书馆综合 (PLoS One)》,2016.11(5):第e0155104页。
- [0418] 20.Skalickova, S. 等人,针对抗流感病毒使用抗病毒多肽的应用前景,《病毒 (Viruses)》,2015.7(10):第5428-42页。
- [0419] 21.Matsubara, T. 等人,唾液酸模拟肽作为血凝素抑制剂用于抗流感治疗,《药物化学杂志 (J Med Chem)》,2010.53(11):第4441-9页。
- [0420] 22.Wunderlich, K. 等人,对甲型和乙型流感病毒复制具有抑制活性的PA结合肽的鉴定,《公共科学图书馆综合 (PLoS One)》,2009.4(10):第e7517页。
- [0421] 23.Ozcan, G. 等人,基于siRNA的治疗剂的临床前和临床开发,《先进药物递送评论 (Adv Drug Deliv Rev)》,2015.87:第108-19页。
- [0422] 24.Mack, S. 等人,用于寡核苷酸缀合的假无连接点击化学,《化学生物学当前协议 (Curr Protoc Chem Biol)》,2016.8(2):第83-95页。
- [0423] 25.Paredes, E. 和 S.R.Das, 点击化学以快速标记和连接RNA,《生物化学

(Chembiochem)》,2011.12(1):第125-31页。

[0424] 26.Zheng,Y.和P.A.Beal,用于酶结合RNA的烷基改性ATP类似物的合成与评价,《生物有机化学与医药化学快报(Bioorg Med Chem Lett)》,2016.26(7):第1799-802页。

[0425] 27.Jain,N.等人,当前ADC接头化学,《药学研究(Pharm Res)》,2015.32(11):第3526-40页。

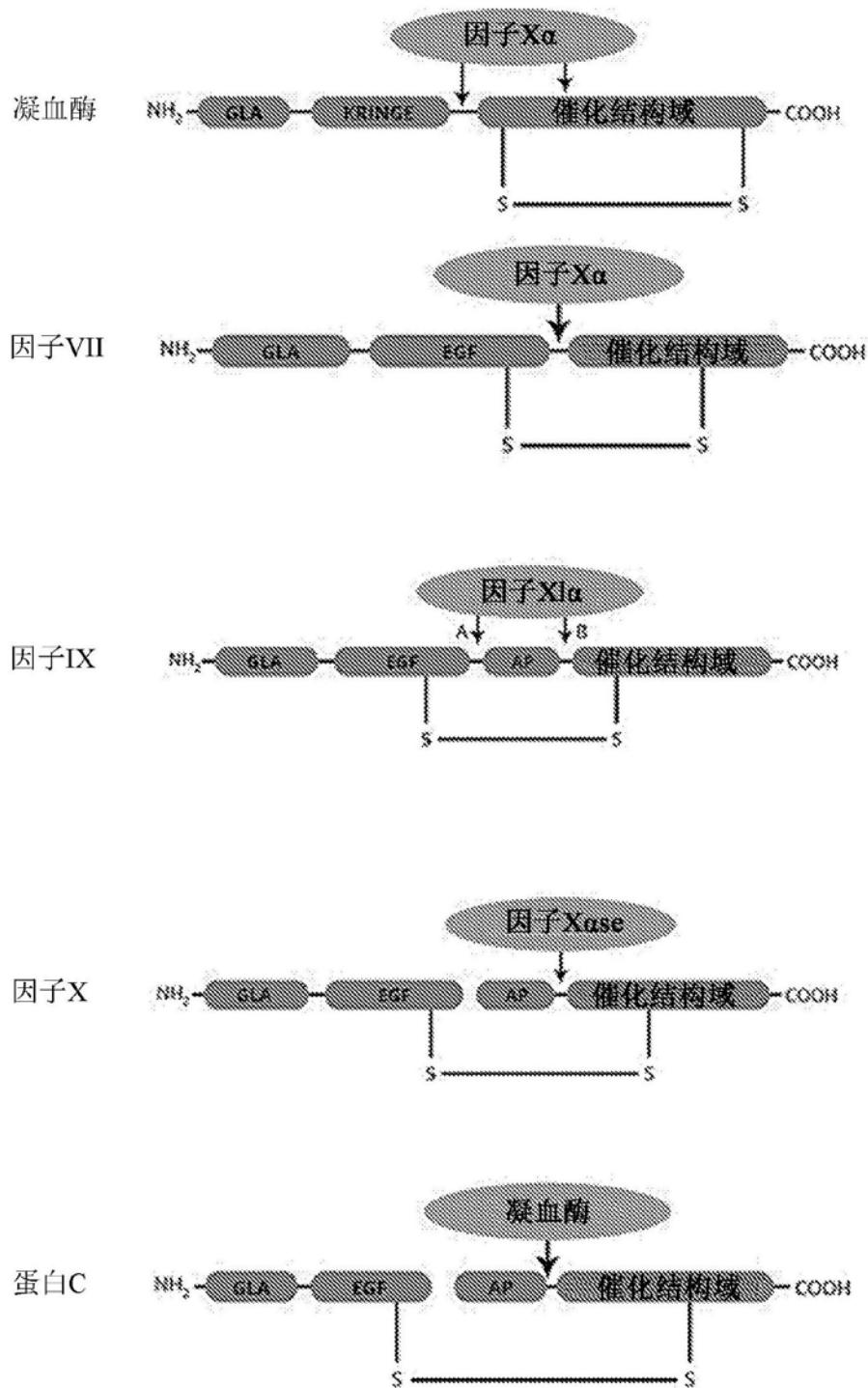


图1A



图1B

	疏水性堆叠区域			
	ω-环	二硫环	30	40
PS	ANS - L L Y Y T K Q G N L Y R Y C I V Y L C N K Y Y A R Y V F Y N D P Y T D Y F Y P K Y L			
PZ	A G S Y L L Y Y L F Y G N L Y K Y C Y Y Y I C V Y Y Y A R Y V F Y N Y V V T D Y F W R R Y K			
PT	A N T - F L Y Y V R K G N L Y R Y C V Y Y T C S Y Y Y A F Y A L Y S S T A T D V F W A K Y T			
FVII	A N A - F L Y Y L R P G S L Y R Y C K Y Y Q C S F Y Y A R Y I F K D A Y R T K L F W I S Y S			
80178	A N A - F L Y Y L R Q G S L Y R Y C K Y Y Q C S F Y Y A R Y I Y D A Y R T K L F W I S Y S			

根据Hansson和Stenflo, 《血栓形成与止血杂志 (Journal of Thrombosis and Haemostasis) 》修饰

图1C

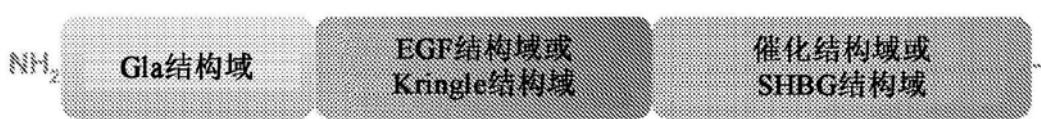


图1D

GLA组分的实施例

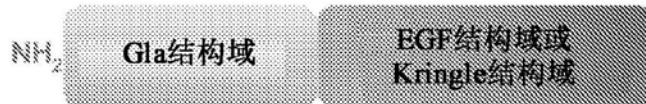


图1E

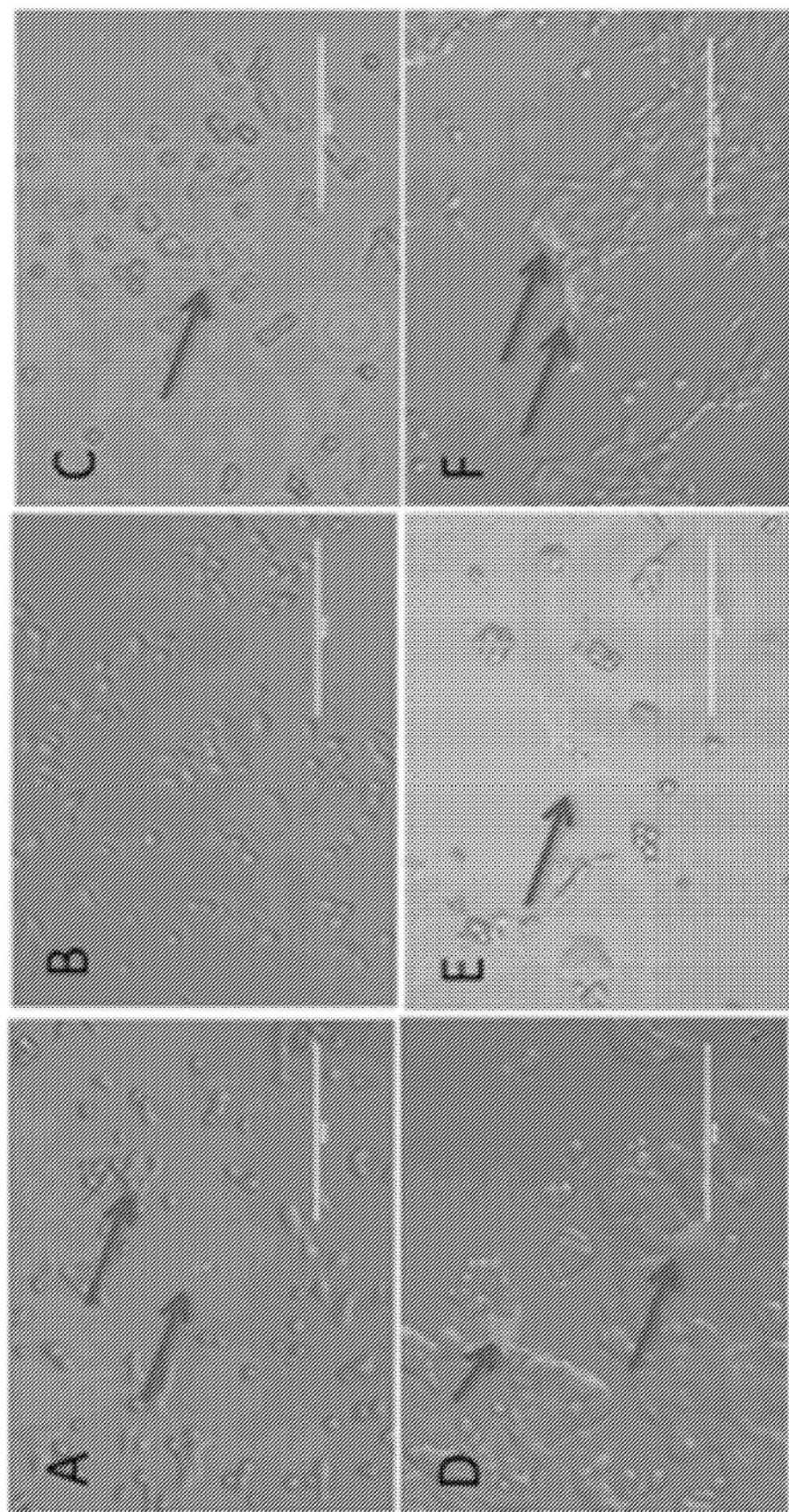


图2

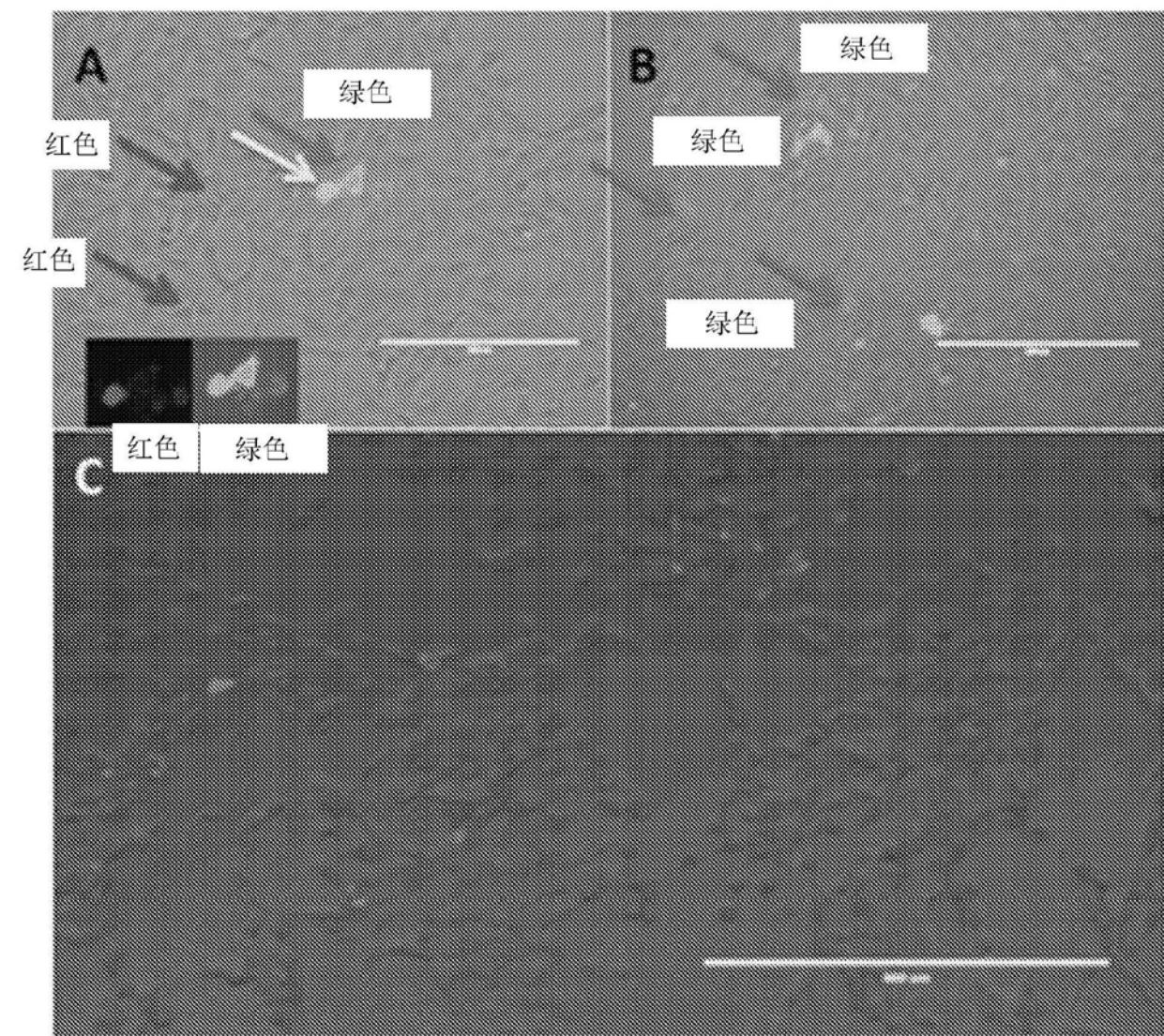


图3

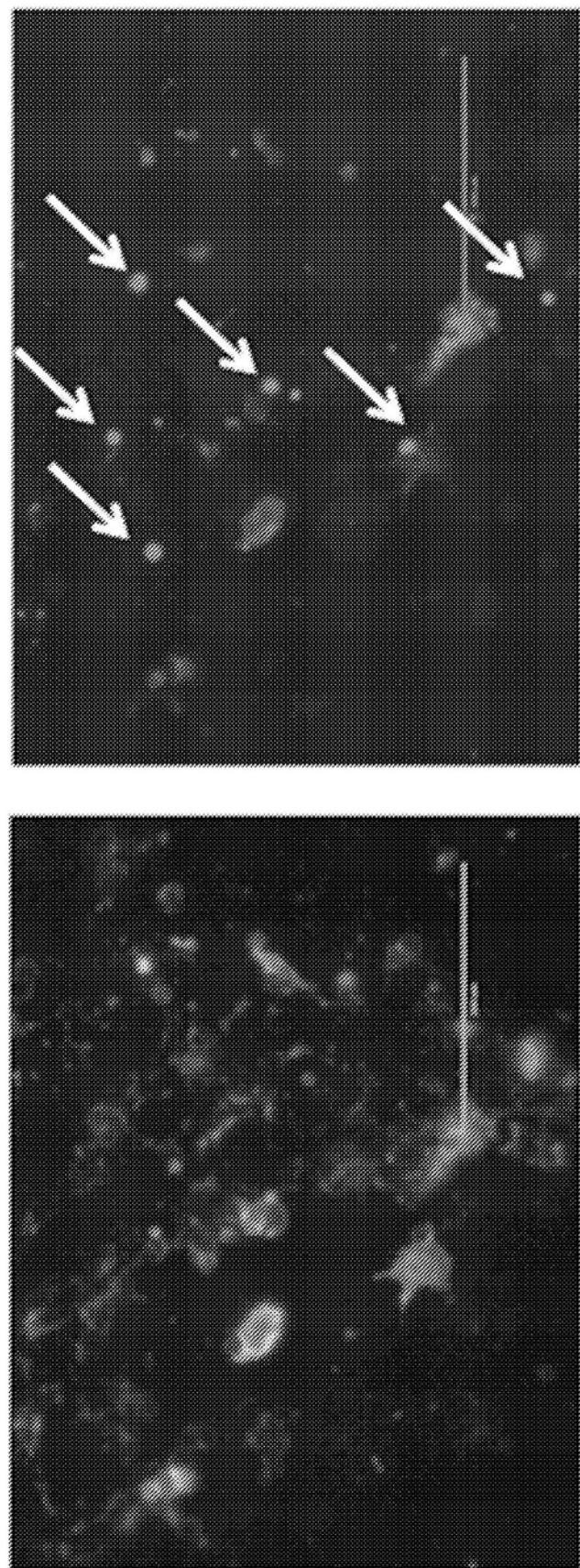


图4

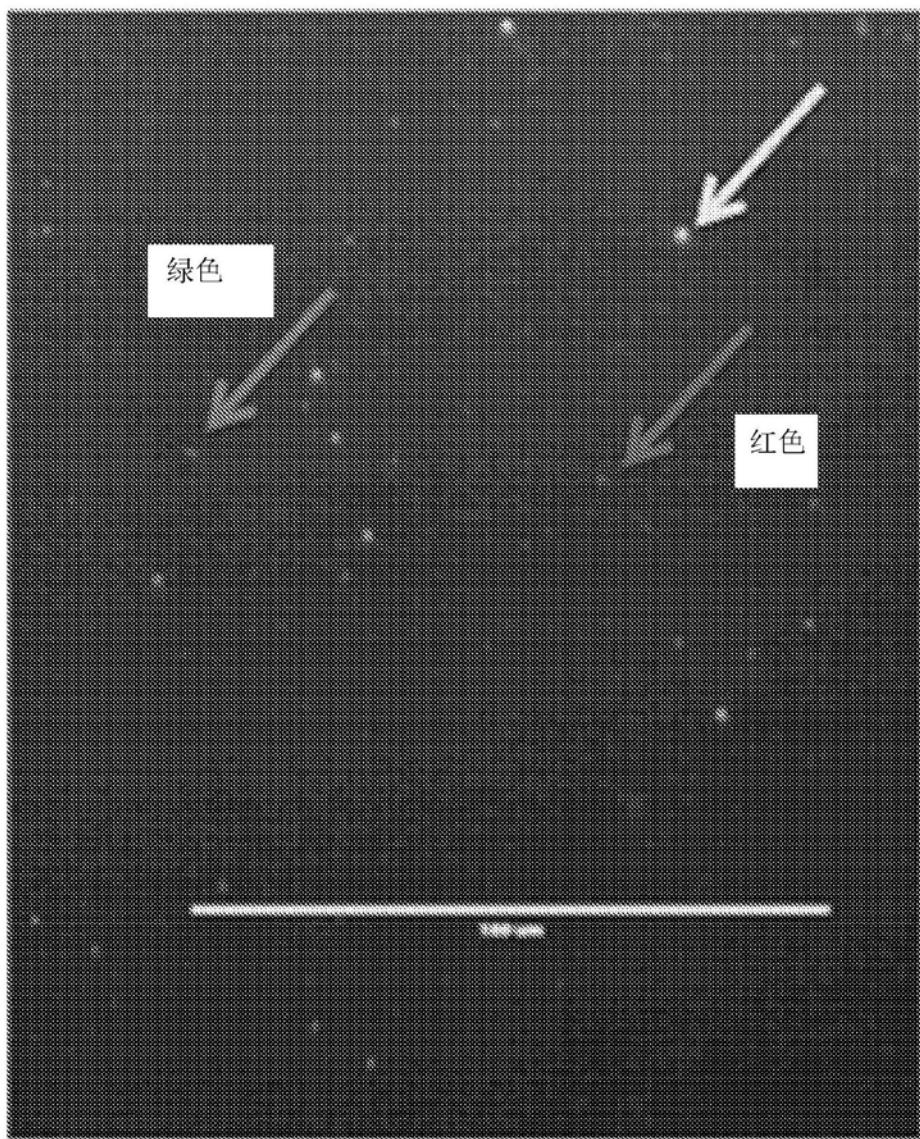


图5

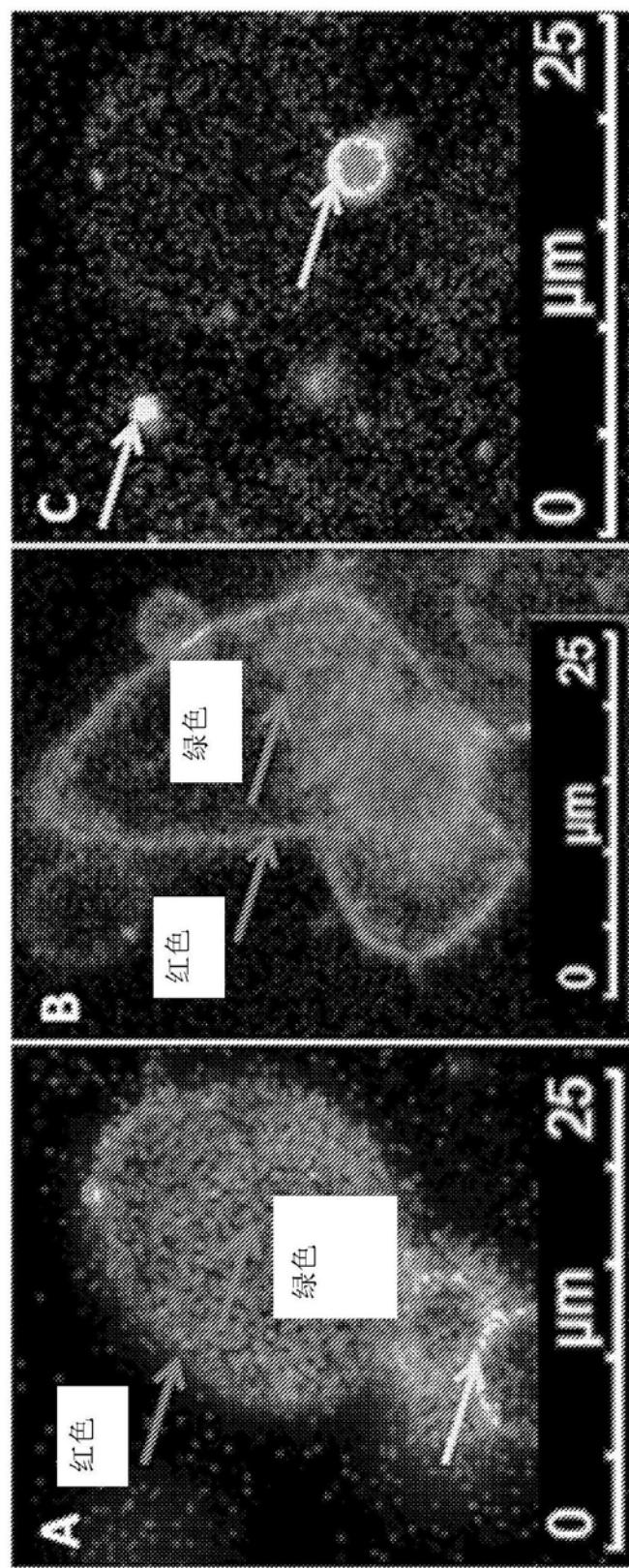


图6

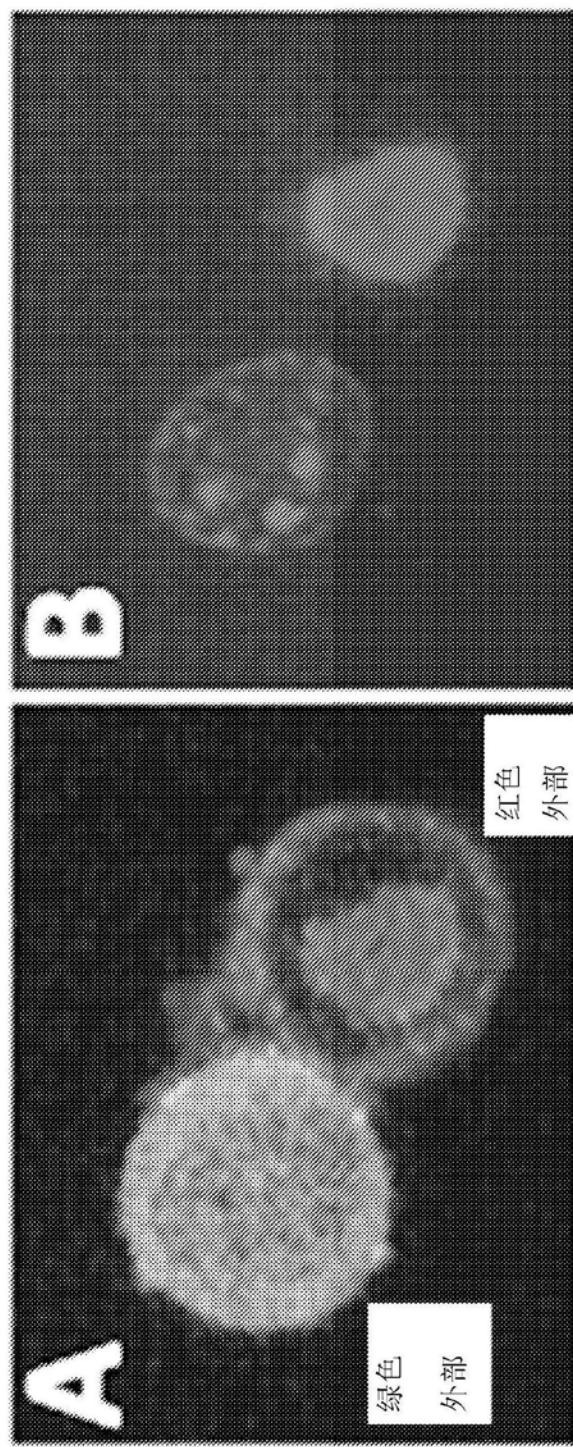


图7

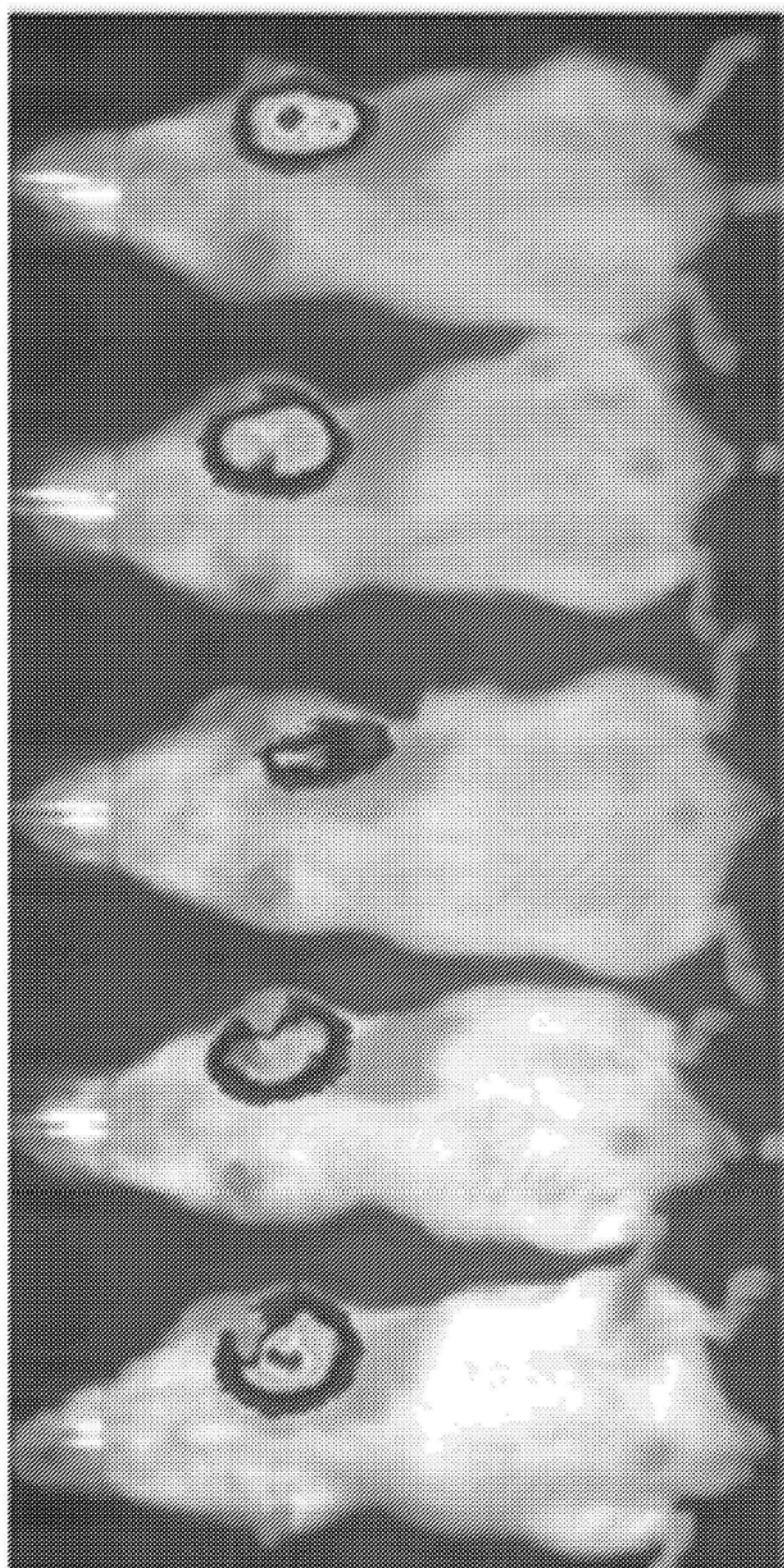


图8

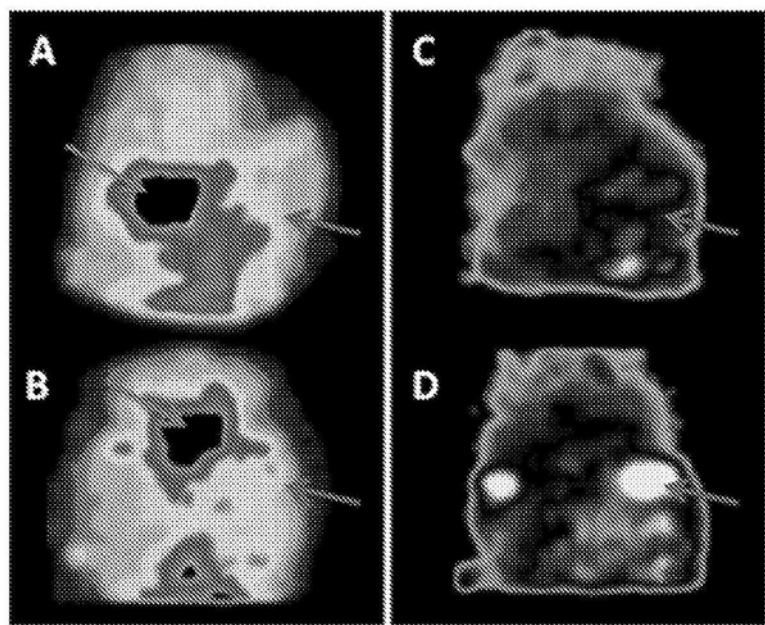


图9

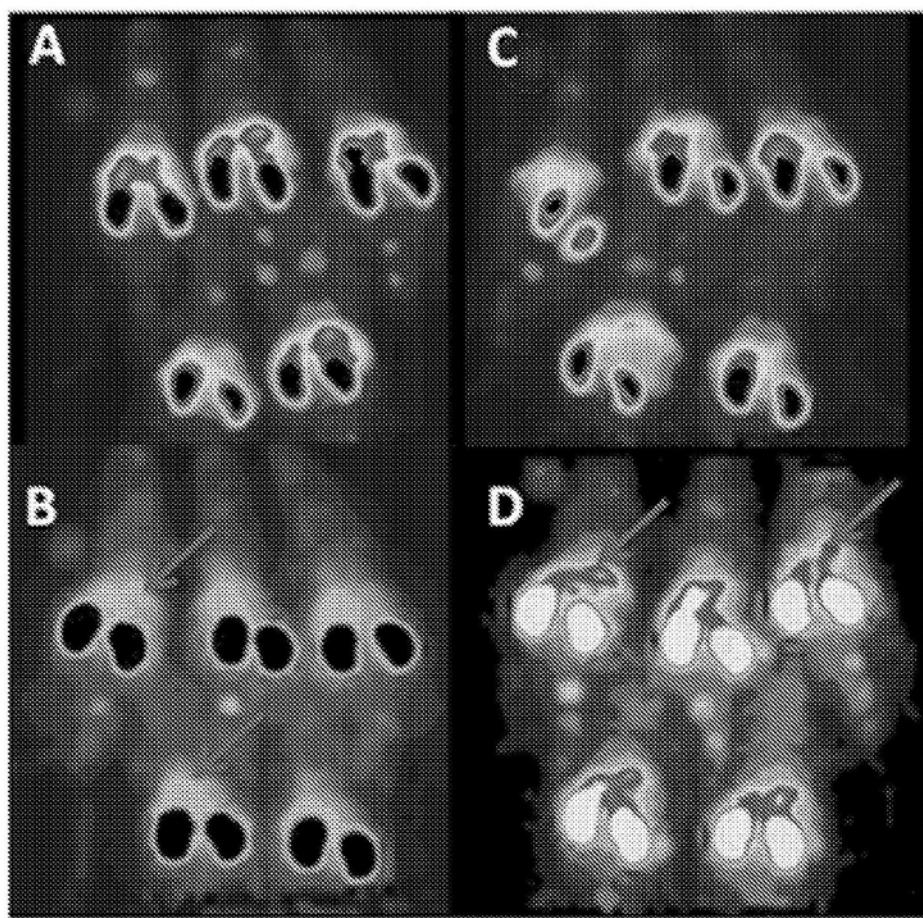


图10

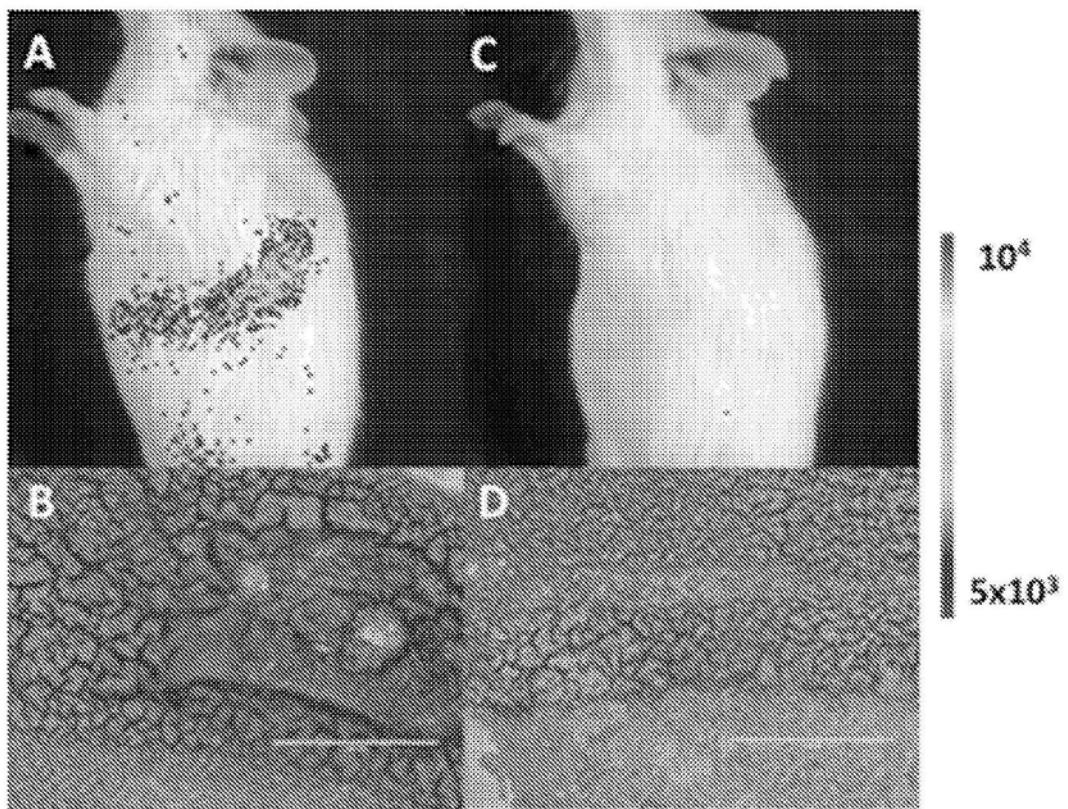


图11

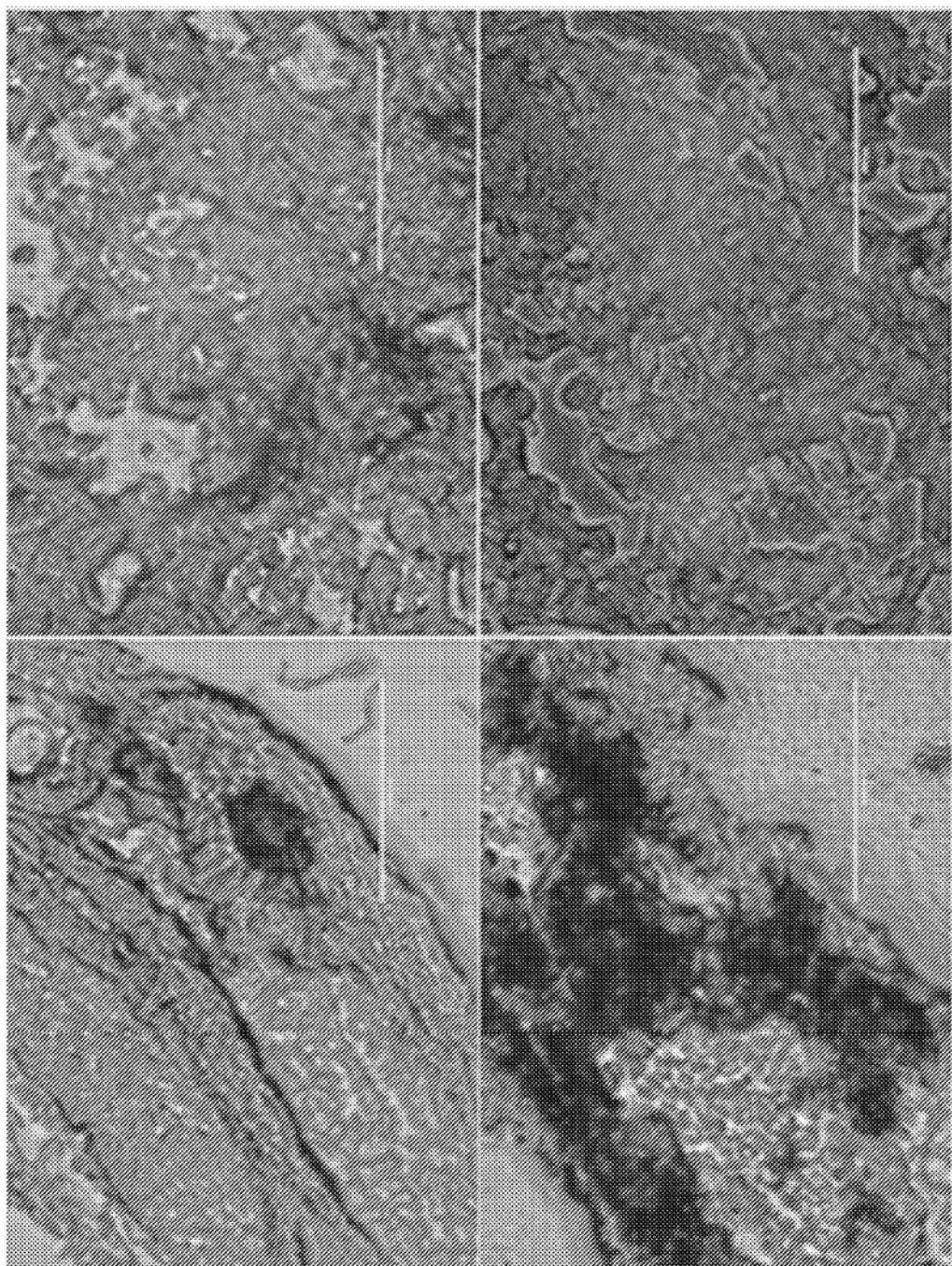


图12

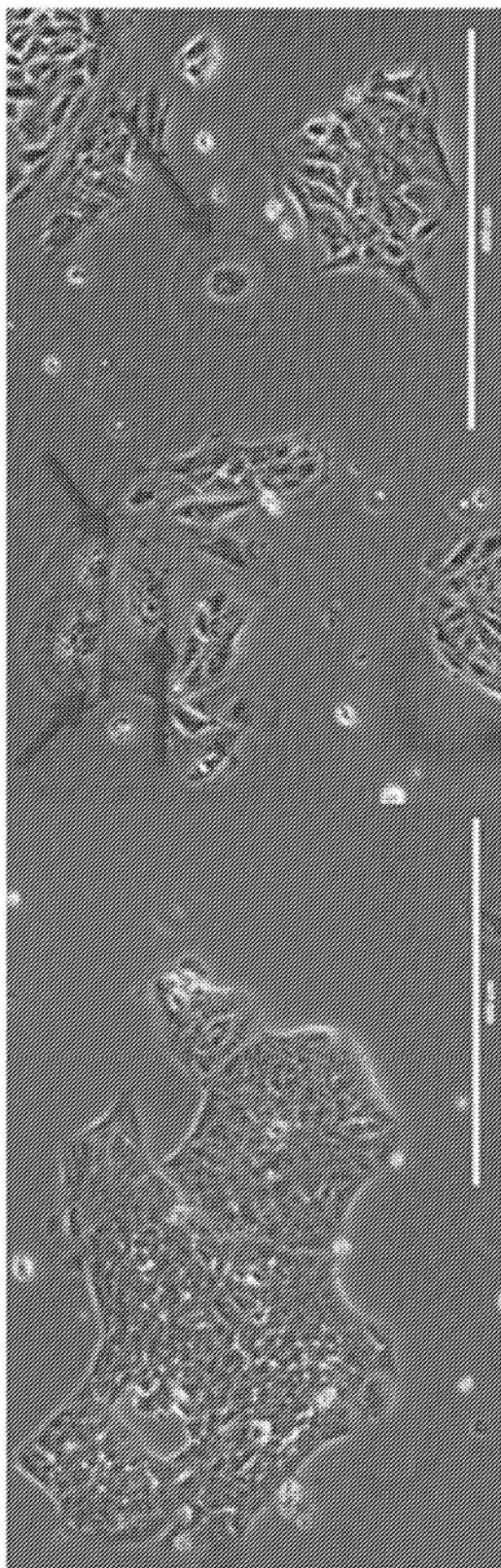


图13

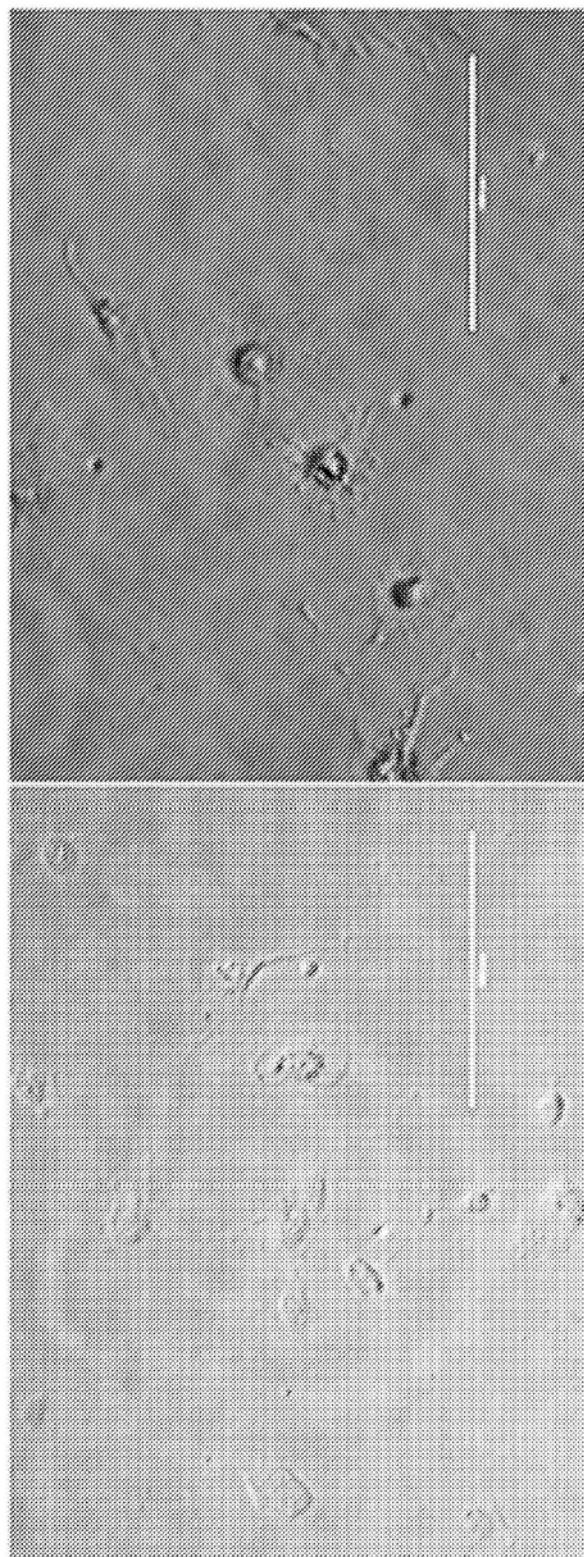


图14

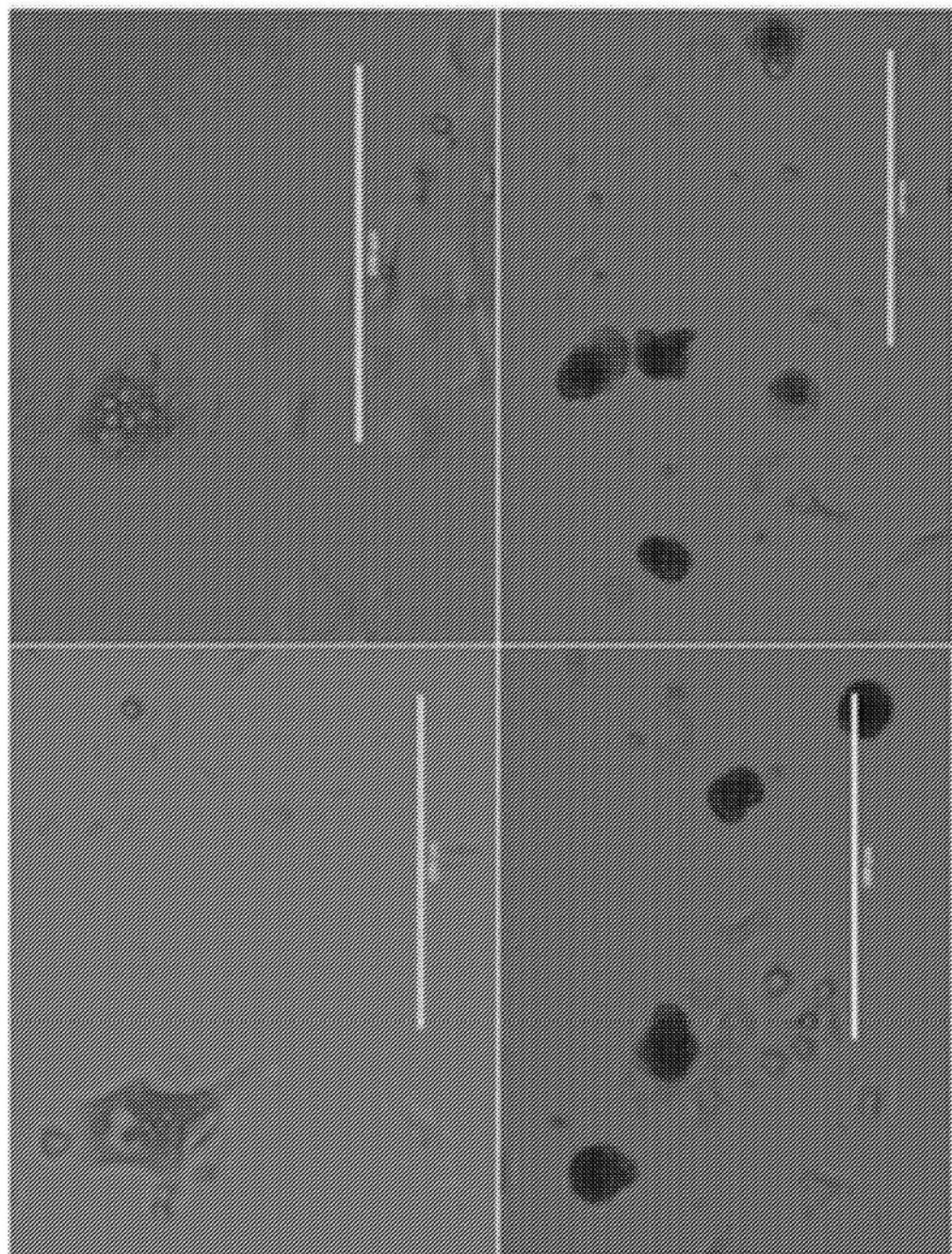


图15

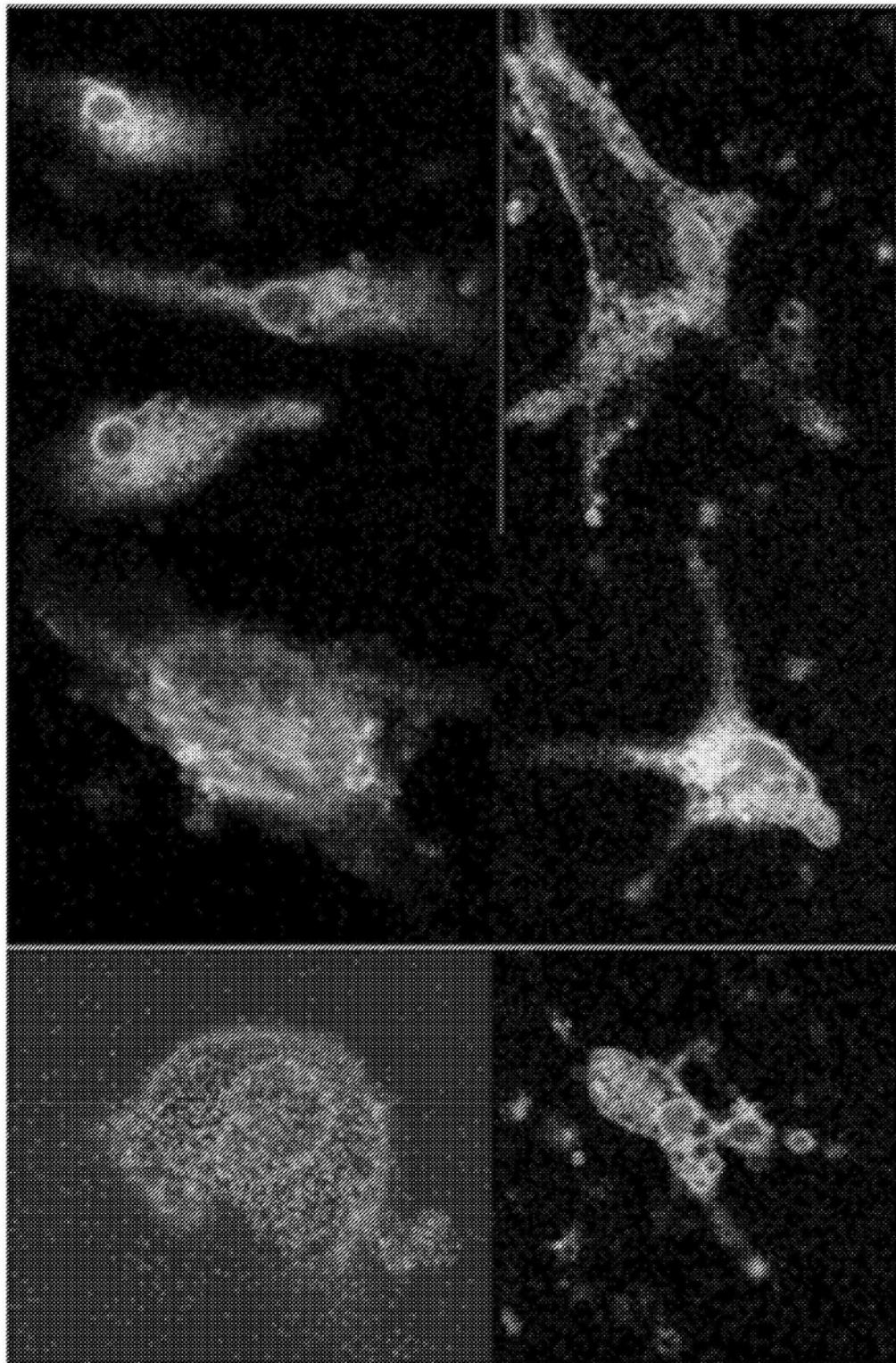


图16

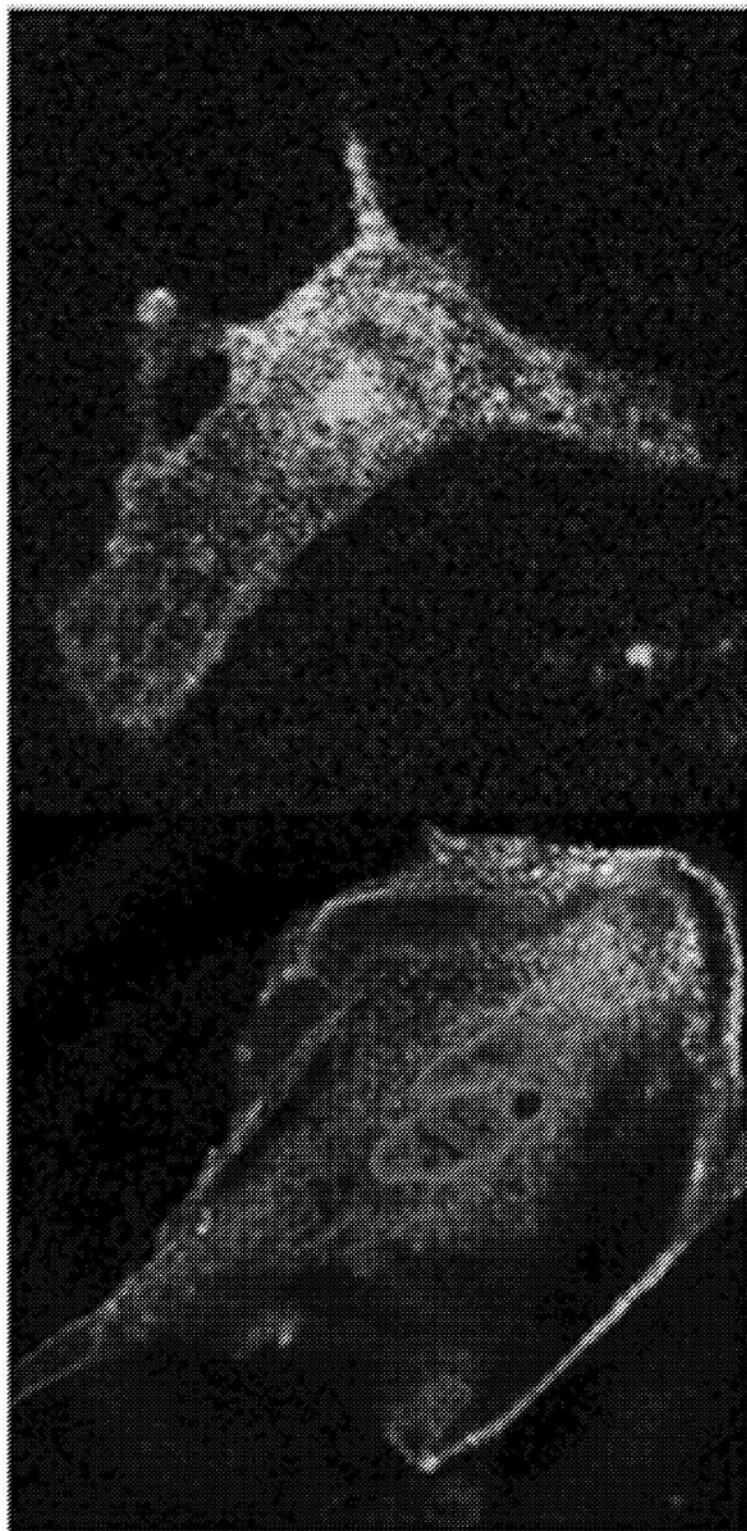


图17

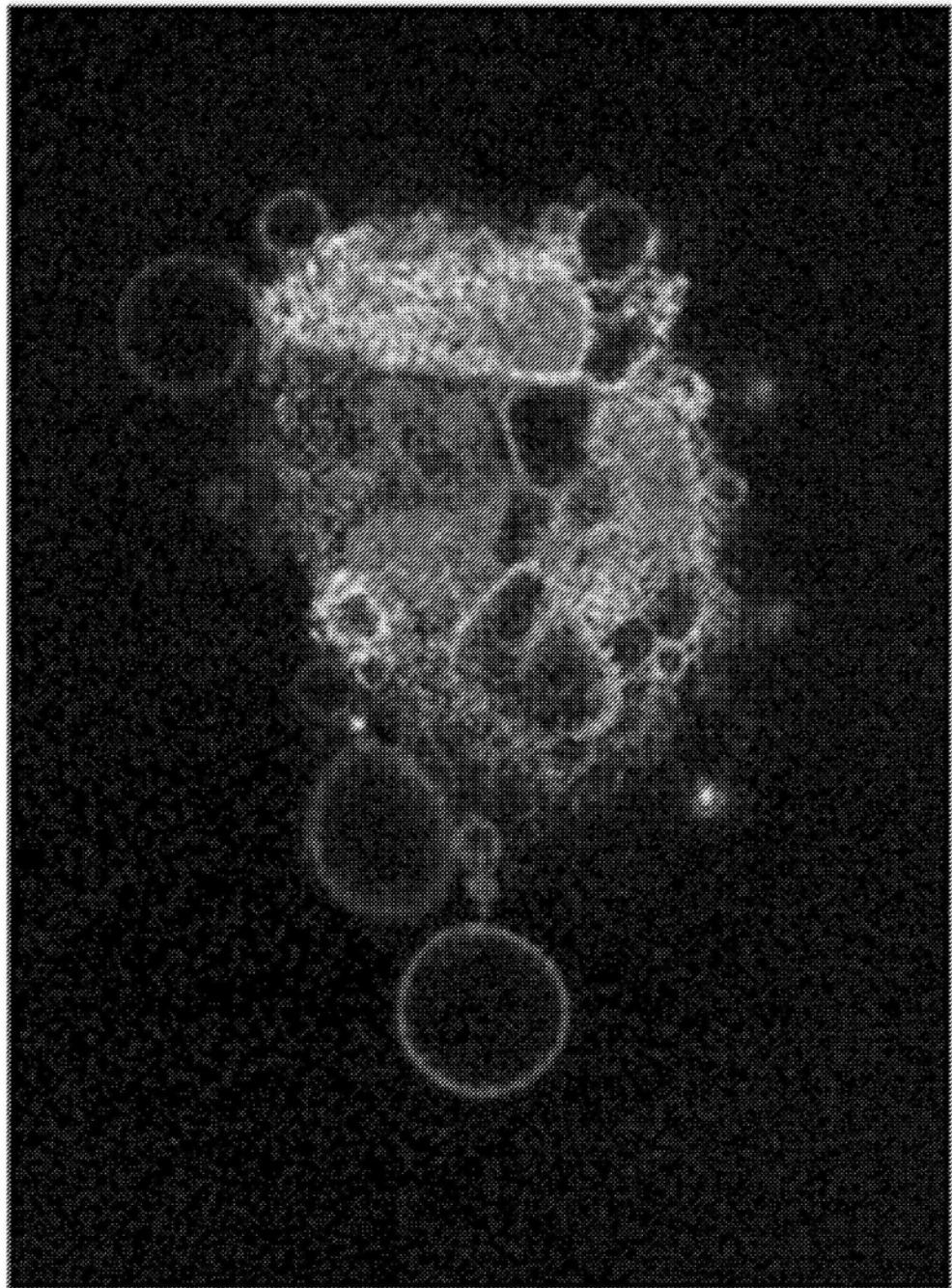


图18

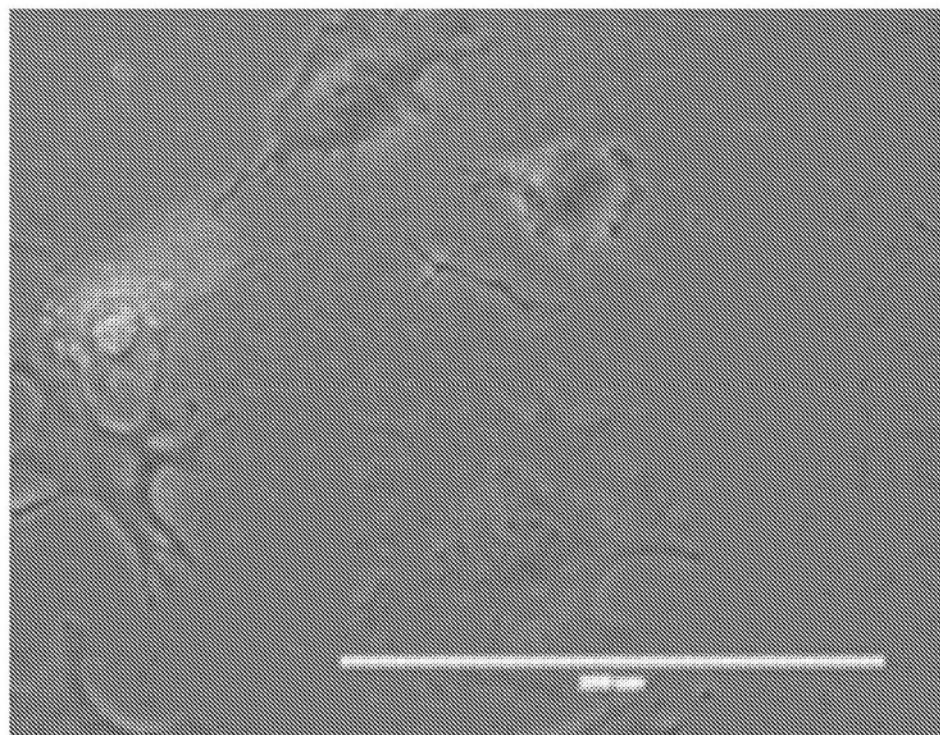


图19



图20

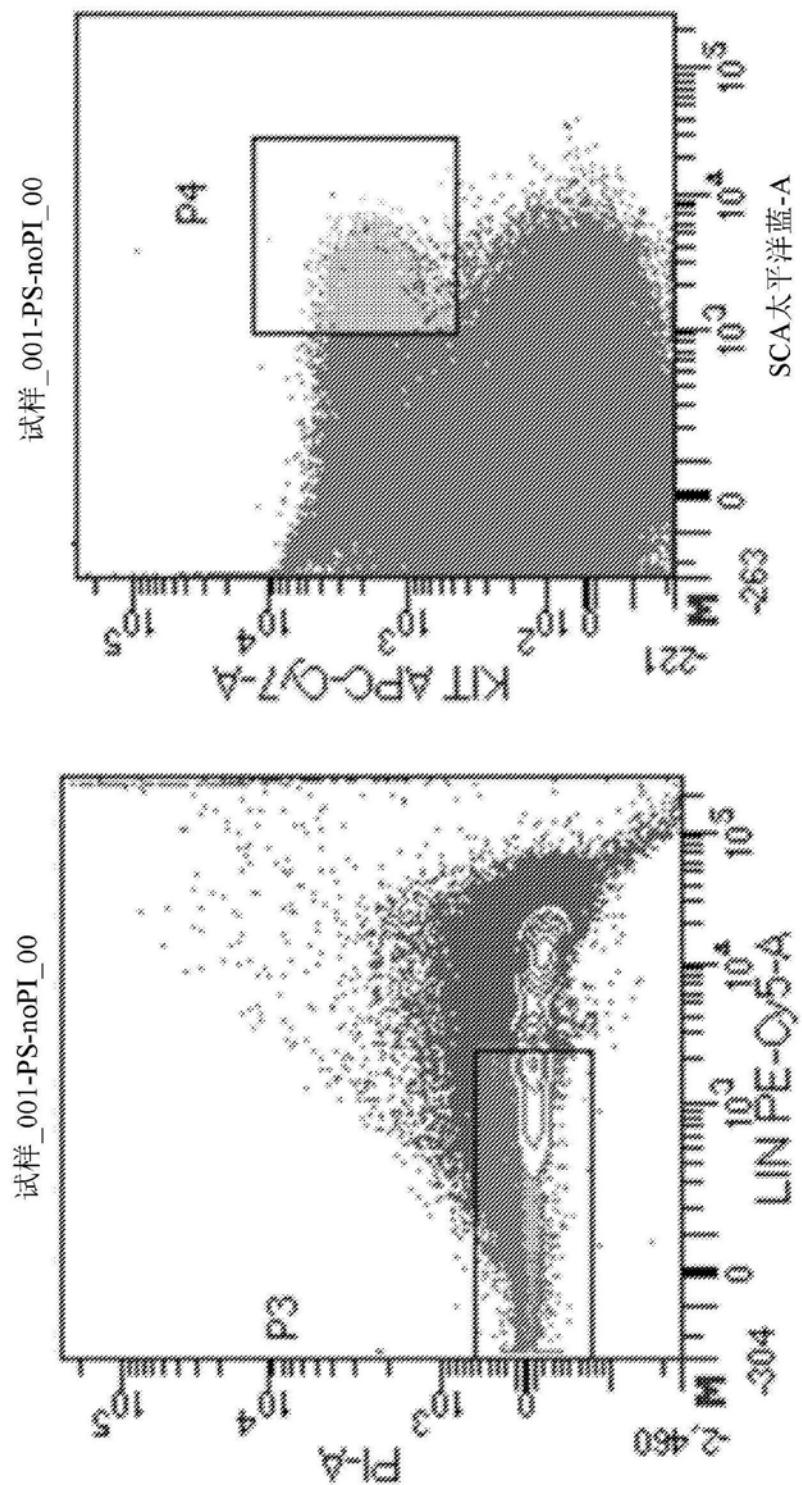


图21

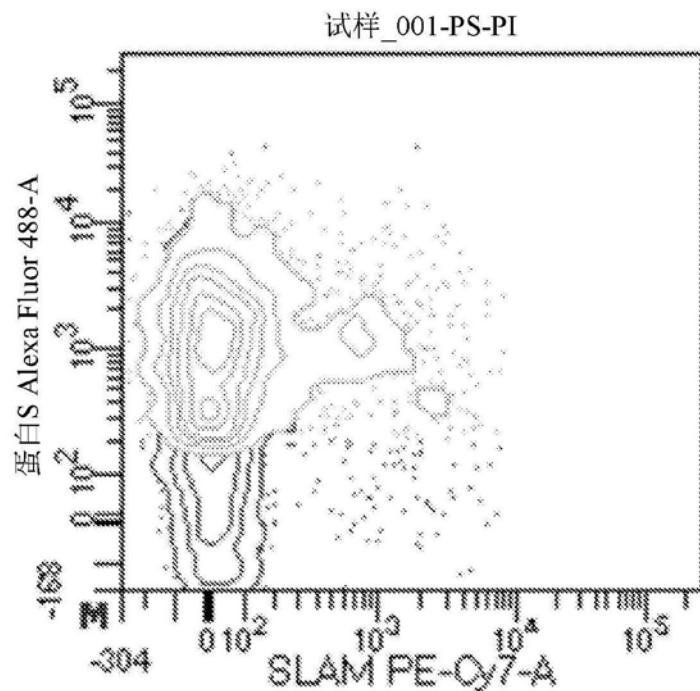


图22

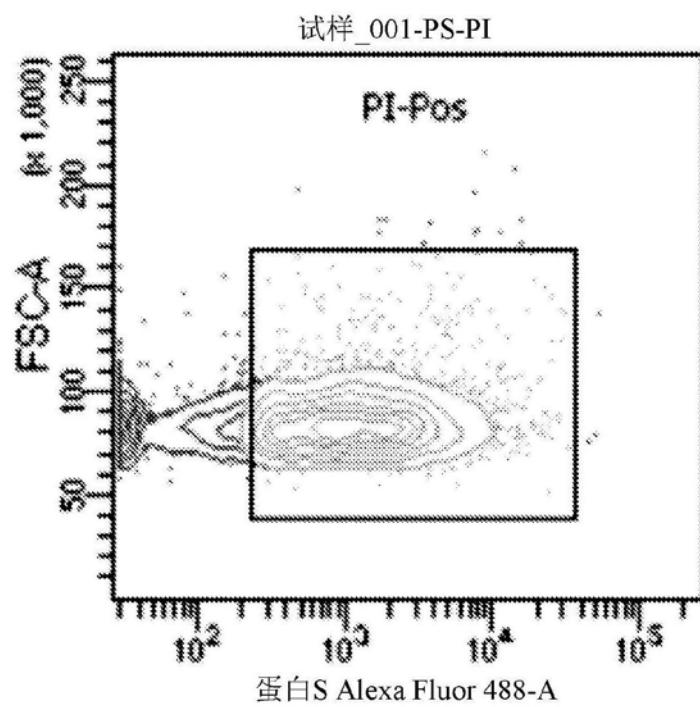


图23

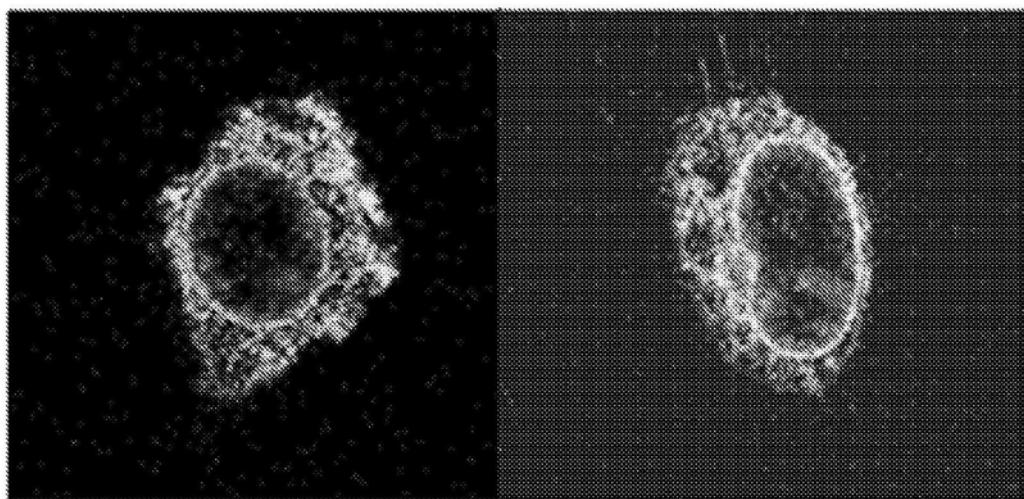


图24

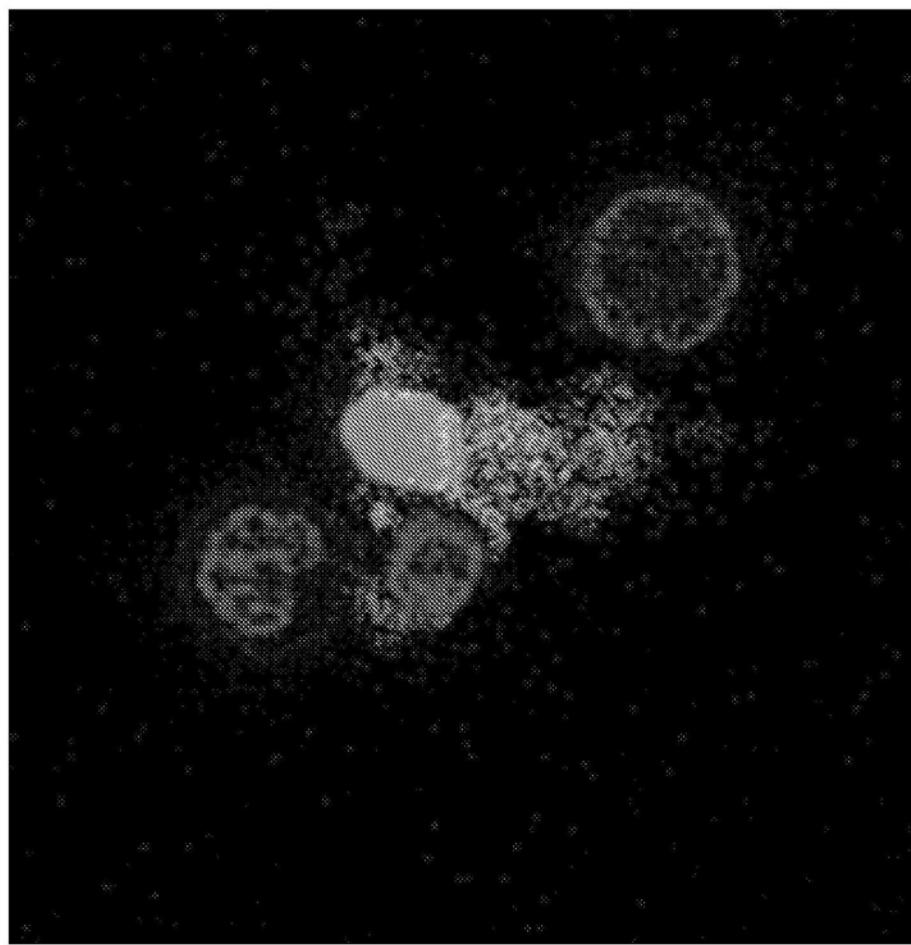


图25

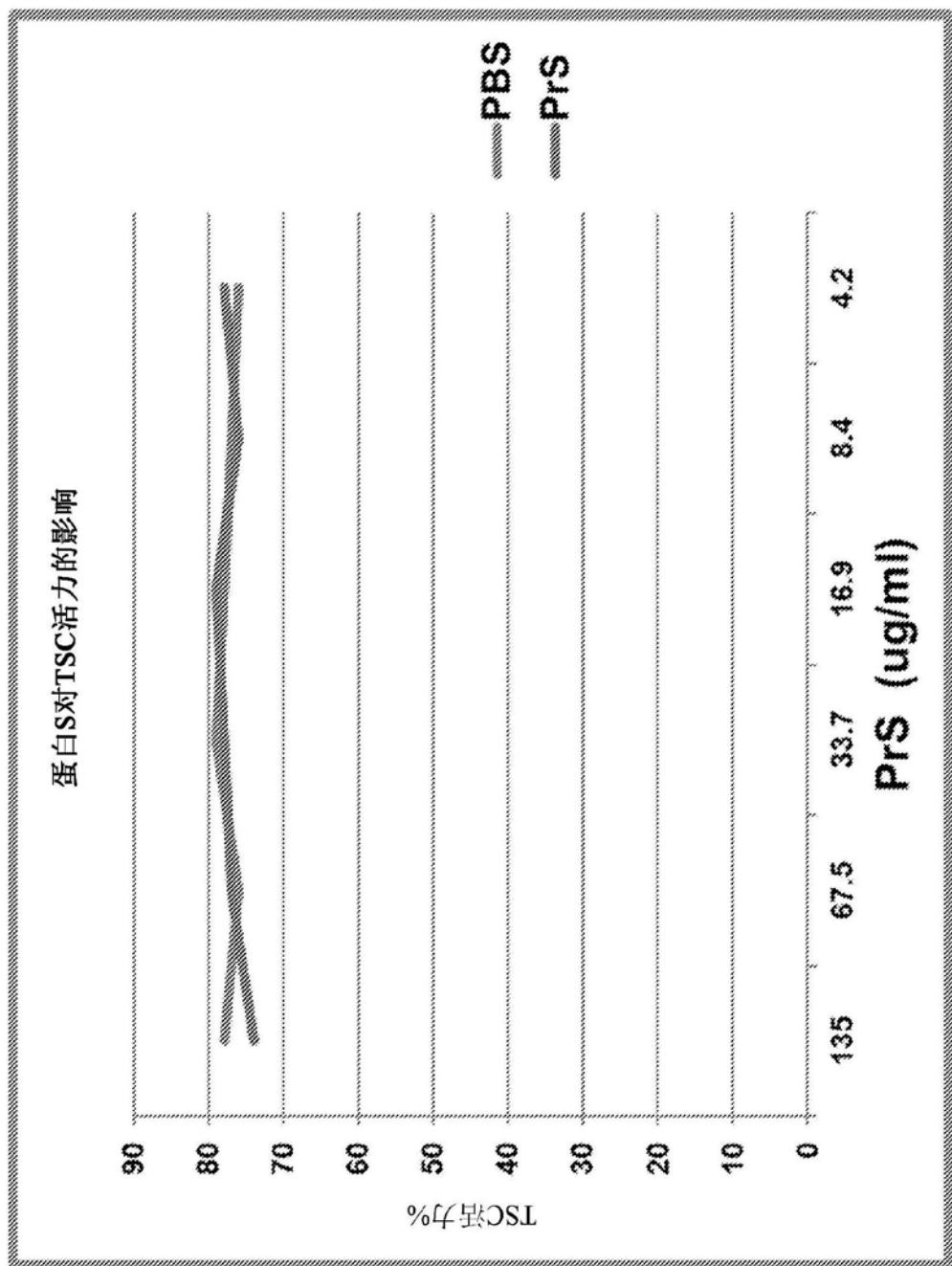


图26