



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113710234 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 26

(21) 申请号 202080024498.9

(22) 申请日 2020.02.07

(30) 优先权数据

62/803,023 2019.02.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/017194 2020.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/163705 EN 2020.08.13

(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

代理人 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/50 (2006.01)

A61K 47/62 (2006.01)

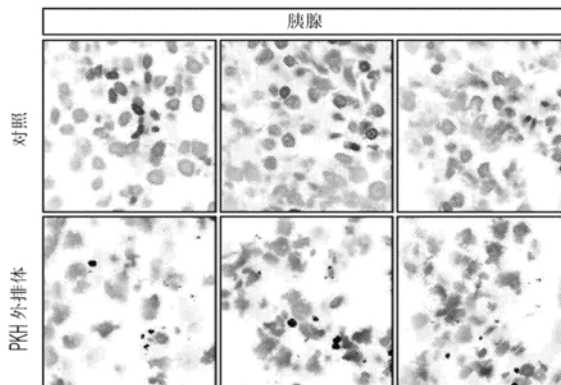
权利要求书2页 说明书21页 附图30页

(54) 发明名称

用于治疗衰老相关疾病和年龄相关器官功能障碍的含端粒酶的外排体

(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,其包含治疗性抗衰老剂。还提供了使用这样的组合物来治疗患有年龄相关病症的患者的方法。特别地,提供了包含编码端粒酶的RNA的外排体及其用于治疗年龄相关病症的方法。



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包含增强端粒酶复合体活性的治疗剂载物。
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所述的组合物,其中所述治疗剂载物是治疗性蛋白质、抗体、抑制性RNA、基因编辑系统或小分子药物。
6. 权利要求5所述的组合物,其中所述治疗性蛋白质对应于TERT蛋白。
7. 权利要求5所述的组合物,其中所述抗体结合胞内抗原。
8. 权利要求5所述的组合物,其中所述抗体是全长抗体、scFv、Fab片段、(Fab) 2、双抗体、三抗体或微抗体。
9. 权利要求5所述的组合物,其中所述抑制性RNA是siRNA、shRNA、miRNA或miRNA前体。
10. 权利要求9所述的组合物,其中所述siRNA敲低下调端粒酶活性的蛋白质的表达。
11. 权利要求9所述的组合物,其中所述基因编辑系统是CRISPR系统。
12. 权利要求11所述的组合物,其中所述CRISPR系统包含内切核酸酶和指导RNA(gRNA)。
13. 权利要求12所述的组合物,其中所述内切核酸酶和所述gRNA在所述外排体内的单个核酸分子上编码。
14. 权利要求11所述的组合物,其中所述CRISPR系统靶向TERT或TERC突变。
15. 药物组合物,其包含权利要求1至14中任一项所述的基于脂质的纳米粒以及赋形剂。
16. 权利要求15所述的组合物,其中所述组合物配制成用于肠胃外施用。
17. 权利要求16所述的组合物,其中所述组合物配制成用于静脉内、肌内、皮下或腹膜内注射。
18. 权利要求16所述的组合物,其还包含抗微生物剂。
19. 权利要求18所述的组合物,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。
20. 在有此需要的患者中治疗疾病或病症的方法,其包括向所述患者施用权利要求15至19中任一项所述的组合物。
21. 权利要求20所述的方法,其中施用导致所述治疗剂载物向所述患者中的细胞的递送。
22. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或病症是衰老相关疾病或病症。
23. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或病症是肺纤维化、先天性角化不良、再生障碍性贫血、肌营养不良、动脉粥样硬化、高血压、心脏病、癌症、卒中、糖尿病、糖尿病性溃疡、阿尔茨海默病、骨质疏松、黄斑变性、免疫衰老、心肌梗死或血管性痴呆。
24. 权利要求20所述的方法,其中所述施用是全身性施用。
25. 权利要求24所述的方法,其中所述全身性施用是静脉内施用。
26. 权利要求20所述的方法,其还包括向所述患者至少施用第二治疗。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述第二治疗包括手术治疗、化学治疗、放射治疗、冷冻治疗、激素治疗或免疫治疗。
28. 权利要求20所述的方法,其中所述患者是人。
29. 权利要求28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。
30. 权利要求29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。
31. 权利要求30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。
32. 权利要求29所述的方法,其中所述外排体从间充质细胞获得。
33. 权利要求32所述的方法,其中所述方法还被限定为将增强端粒酶复合体活性的治疗剂载体递送至所述患者的肝、脑和/或胰腺的方法。
34. 权利要求20所述的方法,其中所述组合物施用多于一次。
35. 将治疗剂递送至患者的肝、脑和/或胰腺组织的方法,所述方法包括向所述患者施用携带所述治疗剂的间充质细胞来源的外排体。
36. 权利要求35所述的方法,其中所述外排体对于所述患者是自体的。
37. 权利要求35所述的方法,其中所述治疗剂是治疗性蛋白质、抗体、抑制性RNA、基因编辑系统或小分子药物。
38. 权利要求35所述的方法,其中所述治疗剂增强端粒酶复合体的活性。
39. 权利要求38所述的方法,其中所述治疗剂是TERT蛋白。
40. 权利要求35所述的方法,其中所述外排体施用多于一次。
41. 权利要求35所述的方法,其中所述外排体是全身性施用的。
42. 权利要求35所述的方法,其中所述外排体是局部施用的。

## 用于治疗衰老相关疾病和年龄相关器官功能障碍的含端粒酶的外排体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月8日提交的美国临时申请号62/803,023的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

### 1. 技术领域

[0004] 本发明总体上涉及医学和肿瘤学领域。更特别地,其涉及用于通过施用携带载物(cargo)的外排体以提高端粒酶活性来治疗年龄相关病症的组合物和方法。

### 2. 背景技术

[0005] 端粒酶缺乏与全身性器官功能障碍相关并且与年龄依赖性病症相关。随着衰老,细胞失去端粒酶,这导致细胞的功能障碍和衰老。遗传研究已表明,端粒酶的再表达可提高细胞寿命并随年龄保持器官功能。然而,需要全身性治疗策略。

[0006] 发明概述

[0007] 因此,本文中提供了包含经改造以将端粒酶mRNA或经修饰端粒酶mRNA递送至细胞的外排体的组合物以及施用所述外排体的方法,以逆转年龄相关病症,例如,如器官缺陷。

[0008] 在一个实施方案中,本文中提供了组合物,其包含基于脂质的纳米粒,所述基于脂质的纳米粒包含增强端粒酶复合体活性的治疗剂载物。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。

[0009] 在一些方面中,治疗剂载物是治疗性蛋白质、抗体、抑制性RNA、基因编辑系统或小分子药物。在一些方面中,治疗性蛋白质对应于TERT蛋白。在一些方面中,抗体结合胞内抗原。在一些方面中,抗体是全长抗体、scFv、Fab片段、(Fab)<sub>2</sub>、双抗体(diabody)、三抗体(triobody)或微抗体(minibody)。在一些方面中,抑制性RNA是siRNA、shRNA、miRNA或miRNA前体(pre-miRNA)。在一些方面中,siRNA敲低下调端粒酶活性的蛋白质的表达。在一些方面中,基因编辑系统是CRISPR系统。在一些方面中,CRISPR系统包含内切核酸酶和指导RNA(guide RNA,gRNA)。在一些方面中,内切核酸酶和gRNA在外排体内的单个核酸分子上编码。在一些方面中,CRISPR系统靶向TERT或TERC突变。

[0010] 在一个实施方案中,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,所述组合物配制用于肠胃外施用。在一些方面中,所述组合物配制用于静脉内、肌内、皮下或腹膜内注射。在一些方面中,所述组合物还包含抗微生物剂。在一些方面中,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)。

[0011] 在一个实施方案中,本文中提供了在有此需要的患者中治疗疾病或病症的方法,其包括向患者施用本发明实施方案中任一个的组合。在一些方面中,施用导致治疗剂载体向患者中的细胞的递送。

[0012] 在一些方面中,疾病或病症是衰老相关疾病或病症。在一些方面中,疾病或病症是肺纤维化、先天性角化不良、再生障碍性贫血、肌营养不良、动脉粥样硬化、高血压、心脏病、癌症、卒中、糖尿病、糖尿病性溃疡、阿尔茨海默病、骨质疏松、黄斑变性、免疫衰老、心肌梗死或血管性痴呆。

[0013] 在一些方面中,施用是全身性施用。在一些方面中,全身性施用是静脉内施用。在一些方面中,组合物施用多于一次。

[0014] 在一些方面中,所述方法还包括向患者至少施用第二治疗。在一些方面中,第二治疗包括手术治疗、化学治疗、放射治疗、冷冻治疗、激素治疗或免疫治疗。

[0015] 在一些方面中,患者是人。在一些方面中,基于脂质的纳米粒是外排体,其中外排体对于患者是自体的。在一些方面中,外排体获自从患者获得的体液样品。在一些方面中,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。在一些方面中,外排体从间充质细胞获得。在一些方面中,还将所述方法限定为将增强端粒酶复合体活性的治疗剂载体递送至患者的肝、脑和/或胰腺的方法。

[0016] 在一个实施方案中,本文中提供了将治疗剂递送至患者的肝、脑和/或胰腺组织的方法,所述方法包括向患者施用携带治疗剂的间充质细胞来源的外排体。在一些方面中,外排体对于患者是自体的。在一些方面中,治疗剂是治疗性蛋白质、抗体、抑制性RNA、基因编辑系统或小分子药物。在一些方面中,治疗剂增强端粒酶复合体的活性。在一些方面中,治疗剂是TERT蛋白。在一些方面中,外排体施用多于一次。在一些方面中,外排体是全身性施用的。在一些方面中,外排体是局部施用的。

[0017] 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%,优选低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到指定组分的量的组合物。

[0018] 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。

[0019] 除非明确指出仅指代替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。

[0020] 在本申请通篇,术语“约”用于表示这样的值,其包括用于确定该值之采用的装置、方法的误差的固有变化,存在于研究对象之间的变化,或者在规定值的10%以内的值。

[0021] 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一些优选实施方案,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

[0022] 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。

[0023] 图1A至E.间充质干细胞来源的外排体在猴中的生物分布。图1A至B示出了胰腺的定位。图1C至D示出了肝的定位。图1E示出了脑的定位。

[0024] 图2A至K.图2A示出了体外转录的mRNA或modRNA的结构。图2B示出了在体外用hTERT mRNA和lipofectamine处理的BJ细胞中通过qPCR的hTERT mRNA表达。图2C至D示出了在体外用hTERT mRNA和lipofectamine处理的BJ细胞的端粒酶活性。图2E示出了在体外用hTERT modRNA和lipofectamine处理的BJ细胞中通过qPCR的hTERT modRNA表达。图2F示出了在体外用hTERT modRNA和lipofectamine处理的BJ细胞的端粒酶活性。图2G示出了显性负hTERT modRNA的转染不提高端粒酶活性。图2H示出了hTERT mRNA诱导细胞死亡,但modRNA不诱导细胞死亡。图2I示出了用lipofectamine长期hTERT modRNA处理BJ细胞对细胞衰老的作用。图2J示出了显性负hTERT modRNA的转染不改善细胞衰老。图2K示出了用lipofectamine长期hTERT modRNA处理BJ细胞对端粒信号的作用。

[0025] 图3A至B.hTERT mRNA进入外排体的电穿孔。图3A示出了在电穿孔之后外排体中的modRNA表达。图3B示出了对外源和内源hTERT的引物设计。

[0026] 图4A至E.用经hTERT mRNA电穿孔的外排体对BJ细胞的处理。图4A示出了用hTERT外排体处理之后BJ细胞中的mRNA表达。图4B示出了hTERT外排体处理对端粒酶活性的作用。图4C示出了hTERT外排体处理对衰老的作用。图4D示出了hTERT过表达的外排体提高了C12FDG信号。将BJ细胞用hTERT过表达的外排体处理两次,并随后收集以使用荧光底物(C12FDG)评价 $\beta$ -半乳糖苷酶信号。C12FDG MFI的降低表明较低的衰老程度。图4E示出了BJ hTERT细胞表现出较低的衰老信号。

[0027] 图5A至B.用hTERT外排体对U2OS细胞的处理(Exofect转染)。图5A示出了在用hTERT外排体处理之后U2OS细胞中的hTERT mRNA表达。图5B示出了在用hTERT外排体处理之后U2OS细胞中的端粒酶活性。

[0028] 图6A至E.hTERT过表达细胞系。图6A示出了293T hTERT过表达细胞表达更多的hTERT蛋白。图6B示出了293T hTERT细胞表达高的端粒酶活性。图6C示出了293T hTERT外排体表达更多的hTERT mRNA。图6D示出了hTERT过表达细胞具有较高的hTERT mRNA。图6E示出了BJ和U2OS hTERT过表达细胞表达更多的hTERT蛋白。

[0029] 图7.用293T hTERT外排体处理细胞。数据表明U2OS hTERT细胞表现出较高的端粒酶信号。

[0030] 图8A至J.tdTomato mRNA递送和tdTomato mRNA进入外排体的Exofect转染。图8A示出了通过FACS进行的通过lipofectamine将tdTomato质粒和mRNA转染到293T细胞中。图8B示出了通过免疫荧光进行的通过lipofectamine将tdTomato质粒和mRNA转染到293T细胞中。图8C示出了体外转录的tdTomato mRNA或modRNA的结构。图8D示出了通过FACS进行的通过外排体将tdTomato mRNA递送至293T细胞。图8E示出了通过FACS进行的用经Exofect和tdTomato mRNA/质粒处理的外排体对293T细胞的处理。图8F示出了通过FACS进行的用经Exofect和tdTomato mRNA处理的外排体对293T细胞的处理。图8G示出了通过免疫荧光进行

的用经Exofect和tdTomato mRNA处理的外排体对293T细胞的处理。图8H至I示出了Exofect和tdTomato mRNA递送对细胞生存力的作用。图8J示出了对使用Exofect通过外排体将mRNA递送至U2OS细胞的可视化。

[0031] 发明详述

[0032] 包含外排体和微囊泡的胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV) 是参与数种生理过程的纳米尺寸的胞间通讯载剂。由于其生物学特性和当注射到小鼠和猴中时进入其他细胞的能力,其可用于全身性递送治疗性化合物,例如mRNA、微RNA (microRNA)、siRNA、shRNA、CRISPR-Cas9基因编辑构建体、治疗性蛋白质、细胞因子、化学治疗药物、核酸以及细菌和病毒载体。用来自间充质细胞或293T细胞的外排体IP或IV注射健康小鼠和猴导致在数种器官(包括脑、肝、肺和胰腺)中治疗性外排体的定位/积累。

[0033] 本文中提供了使用外排体将功能性mRNA分子递送至细胞的方法。在将mRNA递送到具有功能益处的细胞中的方面,外排体是优异的。因此,外排体可用于将编码端粒酶的mRNA递送至细胞,以逆转年龄相关的器官功能障碍。

[0034] 端粒是位于染色体末端的重复DNA序列。足够长度的端粒形成环,其保护染色体的末端不被用作DNA修复过程中的底物。然而,端粒随时间而缩短,从而导致染色体末端的暴露,并且因此导致染色体不稳定,这可导致细胞衰老、凋亡或癌症。

[0035] I. 基于脂质的纳米粒

[0036] 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。

[0037] 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)。

[0038] A. 脂质体

[0039] “脂质体”是通用术语,包括通过产生封闭的脂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。

[0040] 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双层中或与脂双层缔合。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。容器的体积应比预期的脂质体混悬液的体积大十倍。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。

[0044] 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新悬浮而水合。然后可将水性脂质体分成等分试样,将每个放置于小瓶中,冻干并在真空下密封。

[0045] 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),并洗涤脂质体颗粒。将经洗涤的脂质体以合适的总磷脂浓度,例如约50mM至200mM重新悬浮。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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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(例如,胆固醇)的脂质。

[0050] 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。

[0051] B. 外排体

[0052] 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。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。

[0053] 外排体可在任何合适的样品类型例如如体液中被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,示例性样品可以从患有癌症的对象抽取的外周血。

[0054] 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。

[0055] 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屑,则可获得更高纯度的外排体。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。一种优选的方法是从体液或细胞培养物上清液中进行差速离心。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。

[0056] 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。

[0057] 使用超速离心途径的替代物,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,并使用正压驱动流体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。

[0058] 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性珠上。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。已知在癌细胞来源的外排体上发现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 $\beta$ -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的一种或更多种的抗体或适配体来分离。

[0059] 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。

[0060] 1. 用于从细胞培养物中收集外排体的示例性方案

[0061] 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基本培养基(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。

[0062] 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, $25 \times 89 mm$  Beckman Ultra-Clear),每管使用35mL。如果每个管的培养基体积小于35mL,则用PBS填充管的其余部分以达到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液管。如果期望的话,可将外排体沉淀重悬于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。

[0063] 最后,将外排体沉淀重悬于 $210 \mu L$  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。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。

[0064] 2. 用于从血清样品中提取外排体的示例性方案

[0065] 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 $11 mL$  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 $11 mL$  PBS中洗涤外排体沉淀。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,并将外排体沉淀重悬于 $100 \mu L$  PBS中以进行分析。

[0066] C. 用于外排体和脂质体的电穿孔的示例性方案

[0067] 将 $1 \times 10^8$ 个外排体(通过NanoSight分析测量)或 $100 nm$ 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( $1.15 mM$ 磷酸钾, $pH 7.2$ , $25 mM$ 氯化钾, $21\% Optiprep$ )中混合。使用 $4 mm$ 比色皿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。

[0068] II. 疾病的治疗

[0069] 本发明的某些方面提供了用表达或包含在细胞中提高端粒酶活性的治疗剂的外排体来治疗患者。本文中使用的“治疗剂”是可用于治疗衰老相关疾病或其他病症的原子、分子或化合物。治疗剂的一些实例包括但不限于:药物、化学治疗剂、治疗性抗体和抗体片段、毒素、放射性同位素、酶、核酸、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、基因编辑系统、螯合剂、硼化合物、光敏剂以及染料。

[0070] 与端粒缩短相关的遗传疾病的一些实例包括特发性肺纤维化、先天性角化不良和再生障碍性贫血。另一些已知与端粒缩短相关的疾病包括肌营养不良、动脉粥样硬化、高血压、心脏病、癌症、卒中、糖尿病、糖尿病性溃疡、阿尔茨海默病、骨质疏松、黄斑变性、免疫衰老、心肌梗死和血管性痴呆。

[0071] 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,其通过引用整体并入本文),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。因此,作为实例,抑制性RNA可用于本发明方法以调节端粒酶活性(例如,Menin、SIP1、pRB、p38、p53、p73、MKRN1、CHIP、Hsp70、雄激素类、TGF- $\beta$ 、Arc1、cAbl、Pinx1、CRM1、POT1、p19/Arf)。如果已通过任何来源发现了任何抑制性核酸是经验证的目的蛋白质的下调剂(downregulator),则这样的抑制性核酸均可应用于本发明的组合物和方法中。

[0072] 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过程是源性依赖性的,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的序列与待抑制基因序列之间显示出大于80%、85%、90%、95%、98%或甚至100%的同一性。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源性越大,不相关基因的表达就越不太可能会受到影响。

[0073] 因为已知外排体包含完成mRNA转录和蛋白质翻译所必需的机制(参见PCT/US2014/068630,其通过引用整体并入本文),可将编码治疗性蛋白质的mRNA或DNA核酸转染到外排体中。或者,可将治疗性蛋白质本身电穿孔到外排体中或直接并入脂质体中。示例性治疗性RNA包括端粒酶RNA组分(telomerase RNA component,TERC)。示例性治疗性蛋白质包括但不限于:端粒酶逆转录酶(TERT(NP\_937983.2或NP\_001180305.1))、TCAB1、角化不良蛋白(Dyskerin)、Gar1、Nhp2、Nop10、RHAU、解旋酶、UPF1、HSP90、PKC、Shp-2、NF $\kappa$ B p65、TPP1、ATM、DAT、TRF1、TRF2、Rap1、Rif1、TIN2、NBS、MRE17、RAD50、EGF、IGF-1、FGF-2、VEGF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-13、IL-15和Akt。

[0074] 可期望引入到病变细胞的胞内空间的一种特定类型蛋白质是可特异性或选择性地与胞内抗原结合的抗体(例如,单克隆抗体)。这样的抗体可破坏胞内蛋白质的功能和/或破坏胞内蛋白质-蛋白质相互作用。这样的单克隆抗体的一些示例性靶标包括但不限于:Menin、SIP1、pRB、p38、p53、p73、MKRN1、CHIP、Hsp70、雄激素类、TGF- $\beta$ 、Arc1、cAbl、Pinx1、CRM1、POT1和p19/Arf。除单克隆抗体之外,还考虑了其任何抗原结合片段,例如scFv、Fab片段、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、肽抗体(peptibodV)、双抗体、三抗体或微抗体。任何这样的抗体或抗体片段均可以是糖基化的或无糖基化的(aglycosylated)。

[0075] 外排体也可改造成包含基因编辑系统,例如CRISPR/Cas系统,其在端粒酶复合体中校正遗传缺陷,例如TERT或TERC中的突变。一般而言,“CRISPR系统”总体上是指涉及CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或对其活性进行指导的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如,tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr伴侣(tracr-mate)序列(包括“同向重复序列(direct repeat)”,以及在内源性CRISPR系统背景下经tracrRNA加工的部分同向重复序列)、指导序列(在内源性CRISPR系统的背景下也称为

“间隔区”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。在一些方面中,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列具有特异性的crRNA与固定的tracrRNA的融合体)引入到细胞中。一般而言,使用互补碱基配对,gRNA的5'末端处的靶位点将Cas核酸酶靶向至靶位点,例如基因。靶位点可基于其紧邻前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif,PAM)序列(例如通常为NGG或NAG)的5'的位置来选择。在该方面中,通过对指导RNA的前20、19、18、17、16、15、14、14、12、11或10个核苷酸进行修饰以对应于靶DNA序列来将gRNA靶向到所期望的序列。一般而言,CRISPR系统的特征在于促进靶序列位点处CRISPR复合物形成的元件。通常来说,“靶序列”通常是指指导序列被设计为具有互补性的序列,其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则并非必须需要完全互补性。被改造成包含这样的系统的外排体中的CRISPR系统可发挥在靶细胞内编辑基因组DNA的功能,或者该系统可在外排体本身内编辑DNA。涉及外排体作为基因编辑系统的递送手段的用途的另一些方面,参见美国申请No.62/599,340,其通过引用整体并入本文。

[0076] 除了基于蛋白质和基于核酸的治疗剂之外,外排体可用于递送单独的或与任何基于蛋白质或基于核酸的治疗剂组合的小分子药物。考虑用于本发明实施方案的示例性小分子药物包括但不限于:TA-65(Harley et al.,*Rejuvenation Research*,14:45-56,2011)、雌激素、红细胞生成素、白藜芦醇、环黄芪醇(TAT2)、TA-65、TAT153和冈田酸。

[0077] 本文中使用的术语“对象”是指对其进行主题方法的任何个体或患者。通常来说,对象是人,尽管本领域技术人员将理解,对象可以是动物。因此,另一些动物,包括哺乳动物,例如啮齿动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠),猫,狗,兔,农场动物(包括牛、马、山羊、绵羊、猪等)以及灵长类(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩)均包括在对象的定义之内。

[0078] “治疗”及其变化形式是指出于获得疾病或健康相关病症的治疗益处的目的而向对象施用或应用治疗剂或者对对象进行程序或模式(modality)。例如,治疗可包括施用携带载物的外排体、化学治疗、免疫治疗或放射治疗,进行手术,或其任意组合。

[0079] 本申请通篇使用的术语“治疗益处”或“治疗有效”是指对于该病症的医学治疗而言促进或增强对象的福祉的任何事物。这包括但不限于降低疾病体征或症状的频率或严重程度。例如,癌症的治疗可涉及例如降低肿瘤的侵袭力、降低癌症的生长速率或预防转移。癌症的治疗还可指延长患有癌症的对象的存活。

[0080] 本文中使用的术语“接触的”和“暴露的”当应用于细胞时用于描述将治疗剂递送至靶细胞或将其置于与靶细胞直接并置的过程。为了实现端粒延长,例如,将一种或更多种试剂以有效增强端粒酶功能的量递送至细胞。

[0081] 针对治疗患者的有效响应或患者的“响应性”是指给予处于疾病或障碍之风险中或者患有疾病或障碍的患者的临床或治疗性益处。这样的益处可包括细胞或生物学响应、完全响应、部分响应、稳定的疾病(无进展或复发)或者伴有之后复发的响应。可预测和监测治疗结果,和/或可通过本文中所述的方法鉴定或选择受益于这样的治疗的患者。

[0082] 对于疾病的治疗,治疗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。

[0083] 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独特的组合物或制剂接触。同样,考虑了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。

[0084] 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,可将主题治疗组合物和另一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组合物和另一治疗剂,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一治疗剂,或者反之亦然。在分开施用方案中,主题治疗组合物和另一治疗剂可相距数分钟、或相距数小时或相距数天施用。

[0085] III. 药物组合物

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 在预期临床应用的情况下,可能有必要以适于旨在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(视情况而定)于动物,例如如人时,不产生不良、变应性或其他不良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。

[0089] 进一步根据本发明的某些方面,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、肠胃外载体,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;凝胶剂;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、半固体即糊剂,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。

[0090] 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组合物或药物组合物中。根据本发明的某些方面,以任何方便和实用的方式,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。

[0091] 本发明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、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)。

[0092] 外排体可配制成用于肠胃外施用,例如配制成用于通过静脉内、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;也可制备适合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。

[0093] 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。

[0094] 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,配制成用于肠胃外施用,例如,可注射溶液,或用于递送至肺的气雾剂、或者配制成用于消化施用,例如药物释放胶囊等。

[0095] 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发明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,以及其中可推论出的任何范围。在从本文中所述数字可推论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,以及其中可推论出的任何范围。在从本文中所述数字可推论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。



[0096] 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。

[0097] 在某些实施方案中,药物组合物可包含例如至少约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%,以及其中可推论出的任何范围。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。

[0098] 在另一些非限制性实例中,剂量还可包括每次施用药约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,以及其中可推论出的任何范围。在从本文中所述数字可推论出的范围的一些非限制性实例中,基于上述数字,可施用药约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。

[0099] IV. 外排体载体物

[0100] A. 核酸和载体

[0101] 在本发明的某些方面中,可公开编码治疗性蛋白质或抗体的核酸序列。根据所使用的表达系统,可基于常规方法选择核酸序列。例如,可针对在某个系统中的表达对各个基因或其变体进行密码子优化。多种载体也可用于表达目的蛋白质。示例性载体包括但不限于质粒载体、病毒载体、转座子或基于脂质体的载体。

[0102] B. 重组蛋白质

[0103] 一些实施方案涉及重组蛋白质和多肽,例如,如治疗性抗体。在一些方面中,治疗性抗体可以是特异性或选择性地与胞内蛋白质结合的抗体。在另一些方面,可修饰蛋白质或多肽以提高血清稳定性。因此,当本申请提及“经修饰的蛋白质”或“经修饰的多肽”的功能或活性时,本领域普通技术人员将理解,这包括例如,相对于未经修饰的蛋白质或多肽具有另外的优势的蛋白质或多肽。特别考虑了关于“经修饰的蛋白质”的实施方案可相对于“经修饰的多肽”来实施,并且反之亦然。

[0104] 本文中使用的蛋白质或肽通常是指但不限于大于约200个氨基酸至从基因翻译的全长序列的蛋白质;大于约100个氨基酸的多肽;和/或约3至约100个氨基酸的肽。为了方便起见,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

[0105] 本文中使用的“氨基酸残基”是指本领域已知的任何天然存在的氨基酸,任何氨基酸衍生物或任何氨基酸模拟物。在某些实施方案中,蛋白质或肽的残基是连续的,没有任何非氨基酸中断氨基酸残基的序列。在另一些实施方案中,该序列可包含一个或更多个非氨基酸部分。在一些具体实施方案中,蛋白质或肽的残基序列可被一个或更多个非氨基酸部分打断。



[0106] 因此,术语“蛋白质或肽”涵盖包含天然存在的蛋白质中发现的20种常见氨基酸中的至少一种或至少一种经修饰或非天然氨基酸的氨基酸序列。

[0107] C. 抑制性RNA

[0108] siRNA(例如,siNA)是本领域公知的。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中描述,其所有均通过引用整体并入本文。

[0109] 在siRNA内,核酸的组分不需要全部是相同的类型或同质的(例如,siRNA可包含核苷酸和核酸或核苷酸类似物)。通常来说,siRNA形成双链结构;双链结构可由部分或完全互补的两个单独的核酸产生。在本发明的某些实施方案中,siRNA可包含仅单个核酸(多核苷酸)或核酸类似物,并且通过与其自身互补形成双链结构(例如,形成发夹环)。siRNA的双链结构可包含16、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多个连续核碱基(nucleobase),包括其中的所有范围。siRNA可包含17至35个连续核碱基,更优选18至30个连续核碱基,更优选19至25个核碱基,更优选20至23个连续核碱基、或20至22个连续核碱基、或21个连续核碱基,其与互补核酸(其可以是相同核酸的另一部分或单独的互补核酸)杂交以形成双链结构。

[0110] 可用于实施本发明方法的本发明的试剂包括但不限于siRNA。通常来说,双链RNA(double-stranded RNA,dsRNA)(其在本文中可替代地称为小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA))的引入诱导强效且特异性的基因沉默,这是一种称为RNA干扰或RNAi的现象。RNA干扰已被称为“共抑制”、“转录后基因沉默”、“有义抑制(sense suppression)”和“压制(quelling)”。RNAi是一种有吸引力的生物技术工具,因为它提供了敲除特定基因活性的手段。

[0111] 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的序列与待抑制基因序列之间显示出大于80%、85%、90%、95%、98%或甚至100%的同一性。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。

[0112] 另外,siRNA的尺寸是重要的考虑因素。在一些实施方案中,本发明涉及siRNA分子,其包含至少约19至25个核苷酸并且能够调节基因表达。在本发明的上下文中,siRNA在长度上优选小于500、200、100、50或25个核苷酸。更优选地,siRNA在长度上为约19个核苷酸至约25个核苷酸。

[0113] 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而言重要的复制、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。

[0114] 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,一种预设计siRNA的商业来源是Ambion®,Austin, Tex.另

一种是Qiagen® (Valencia, Calif.)。可应用于本发明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发明的公开内容,另外的siRNA可被设计并用于实施本发明的方法是应理解的。

[0115] siRNA还可包含一个或更多个核苷酸的改变。这样的改变可包括非核苷酸材料的添加,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。本发明的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(internucleoside linkage)。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siRNA。

#### [0116] D. 基因编辑系统

[0117] 一般而言,“CRISPR系统”总体上是指涉及CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或对其活性进行指导的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如, tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr伴侣序列(包括“同向重复序列”,以及在内源性CRISPR系统背景下经tracrRNA加工的部分同向重复序列)、指导序列(在内源性CRISPR系统的背景下也称为“间隔区”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0118] CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统可包含非编码RNA分子(指导)RNA,其序列特异性地与DNA结合;以及Cas蛋白(例如,Cas9),其具有核酸酶功能(例如,两个核酸酶结构域)。CRISPR系统的一个或更多个元件可来源于I型、II型或III型CRISPR系统,例如来源于包含内源性CRISPR系统的特定生物体,例如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0119] 在一些方面中,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列具有特异性的crRNA与固定的tracrRNA的融合体)引入到细胞中。一般而言,使用互补碱基配对,gRNA的5'末端处的靶位点将Cas核酸酶靶向至靶位点,例如基因。靶位点可基于其紧邻前间区序列邻近基序(PAM)序列(例如通常为NGG或NAG)的5'的位置来选择。在该方面中,通过对指导RNA的前20、19、18、17、16、15、14、14、12、11或10个核苷酸进行修饰以对应于靶DNA序列来将gRNA靶向到所期望的序列。一般而言,CRISPR系统的特征在于促进靶序列位点处CRISPR复合物形成的元件。通常来说,“靶序列”通常是指指导序列被设计为具有互补性的序列,其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则并非必须需要完全互补性。

[0120] CRISPR系统可在靶位点处诱导双链断裂(double stranded break,DSB),随后如本文中所述进行破坏。在另一些实施方案中,被认为是“切口酶”的Cas9变体用于在靶位点处使单链产生切口。可使用成对的切口酶,例如以提高特异性,每种酶均由不同的gRNA靶向序列对来指导,以使得在同时引入切口时,引入5'突出端。在另一些实施方案中,将无催化活性的Cas9与异源效应物结构域例如转录阻遏物或激活物融合,以影响基因表达。

[0121] 靶序列可包含任何多核苷酸,例如DNA或RNA多核苷酸。靶序列可位于细胞的核或胞质中,例如在细胞的细胞器内。通常来说,可用于重组为包含靶序列的靶基因座的序列或

模板被称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面中，外源模板多核苷酸可被称为编辑模板。在一些方面中，重组是同源重组。

[0122] 通常来说，在内源性CRISPR系统的背景下，CRISPR复合物(包含与靶序列杂交并与一种或更多种Cas蛋白复合的指导序列)的形成导致靶序列中或其附近(例如，距靶序列1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。可包含野生型tracr序列的全部或一部分(例如，野生型tracr序列的约或多于约20、26、32、45、48、54、63、67、85或更多个核苷酸)或者由其组成的tracr序列也可形成CRISPR复合物的一部分，例如通过沿tracr序列的至少一部分与可操作地连接至指导序列的tracr伴侣序列的全部或部分进行杂交。tracr序列与tracr伴侣序列具有足够的互补性以进行杂交并参与CRISPR复合物的形成，例如当进行最佳比对时，沿tracr伴侣序列的长度至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。

[0123] 可将驱动CRISPR系统的一个或多个元件表达的一个或多个载体引入到细胞中，以使得CRISPR系统的元件表达指导一个或多个靶位点处CRISPR复合物的形成。组件也可作为蛋白质和/或RNA递送至细胞。例如，Cas酶、与tracr伴侣序列连接的指导序列以及tracr序列可各自可操作地连接至单独载体上的单独调节元件。或者，可将由相同或不同调节元件表达的两个或多个元件组合在单一载体中，同时一个或多个另外的载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何组件。载体可包含一个或多个插入位点，例如限制性内切核酸酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中，一个或多个插入位点位于一个或多个载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。当使用多个不同的指导序列时，可使用单一表达构建体以将CRISPR活性靶向到细胞内的多个不同的相应靶序列。

[0124] 载体可包含可操作地连接至编码CRISPR酶(例如Cas蛋白)的酶编码序列的调节元件。Cas蛋白的一些非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4，其同源物或其经修饰形式。这些酶是已知的；例如，酿脓链球菌(*S. pyogenes*) Cas9蛋白的氨基酸序列可见于SwissProt数据库于登录号Q99ZW2下。

[0125] CRISPR酶可以是Cas9(例如来自酿脓链球菌或肺炎链球菌(*S. pneumonia*))。CRISPR酶可指导在靶序列的位置处，例如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内的一条或两条链的切割。载体可编码相对于相应的野生型酶突变的CRISPR酶，以使得突变的CRISPR酶缺乏切割包含靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如，来自酿脓链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸至丙氨酸的替换(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转换为切口酶(切割单链)。在一些实施方案中，Cas9切口酶可与指导序列(例如两个指导序列)组合使用，所述指导序列分别靶向DNA靶标的有义和反义链。该组合允许这两条链均产生切口并用于诱导NHEJ或HDR。

[0126] 在一些实施方案中，对编码CRISPR酶的酶编码序列进行密码子优化以在特定细胞，例如真核细胞中表达。真核细胞可以是特定生物体的那些或者来源于所述特定生物体，所述生物体例如哺乳动物，包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、狗或非人灵长类。一般而言，密

密码子优化是指在维持天然氨基酸序列的同时,通过用目的宿主细胞的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个密码子来修饰核酸序列以在该宿主细胞中增强表达的过程。多种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏倚。密码子偏倚(生物体之间密码子选用的差异)通常与信使RNA(messenger RNA,mRNA)的翻译效率相关,而信使RNA(mRNA)的翻译效率继而被认为尤其取决于所翻译密码子的特性和特定转移RNA(transfer RNA,tRNA)分子的可用性。所选择tRNA在细胞中的优势通常反映了肽合成中最频繁使用的密码子。因此,可基于密码子优化来定制基因以在给定生物体中进行最佳基因表达。

[0127] 一般而言,指导序列是与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并且将CRISPR复合物与靶序列直接序列特异性地结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,指导序列与其对应的靶序列之间的互补性程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更高。

[0128] 最佳比对可通过使用用于比对序列的任何合适的算法来确定,所述算法的一些非限制性实例包括史密斯-沃特曼算法(Smith-Waterman algorithm);内德勒曼-温施算法(Needleman-Wunsch algorithm);基于伯劳斯-惠勒变换(Burrows-Wheeler Transform)的算法(例如,伯劳斯-惠勒比对器(Burrows Wheeler Aligner));Clustal W;Clustal X;BLAT;Novoalign(Novocraft Technologies,ELAND(Illumina, San Diego, Calif.));SOAP(可在soap.genomics.org.cn上获得)以及Maq(可在maq.sourceforge.net上获得)。

[0129] CRISPR酶可以是包含一个或更多个异源蛋白质结构域的融合蛋白的一部分。CRISPR酶融合蛋白可包含任何另外的蛋白质序列,以及任选地在任何两个结构域之间的接头序列。可与CRISPR酶融合的蛋白质结构域的一些实例包括但不限于表位标签、报道基因序列和具有以下活性中的一种或更多种的蛋白质结构域:甲基化酶活性、去甲基化酶活性、转录激活活性、转录阻遏活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的一些非限制性实例包括组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感血凝素(influenza hemagglutinin,HA)标签、Myc标签、VSV-G标签和硫氧还蛋白(thioredoxin,Trx)标签。报道基因的一些实例包括但不限于谷胱甘肽-5-转移酶(glutathione-5-transferase,GST)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase,CAT) $\beta$ 半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein,CFP)、黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein,YFP)以及自发荧光蛋白,包括蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein,BFP)。CRISPR酶可与编码结合DNA分子或结合其他细胞分子的蛋白质或蛋白质片段的基因序列融合,所述蛋白质或蛋白质片段包括但不限于麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein,MBP)、S标签、Lex A DNA结合结构域(DNA binding domain,DBD)融合体、GAL4A DNA结合结构域融合体以及单纯疱疹病毒(herpes simplex virus,HSV)BP16蛋白质融合体。可形成包含CRISPR酶的一部分的另外结构域描述于US 20110059502中,其通过引用并入本文。

[0130] V. 试剂盒和诊断

[0131] 在本发明的多个方面中,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转染具有治疗性载物的外排体的真实或虚拟程序。

## VI. 实施例

[0132] 包括以下实施例以示出本发明的一些优选实施方案。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。

[0133] 实施例1-间充质干细胞来源的外排体在猴中的生物分布

[0134] 使用三只雄性成年(6kg体重)恒河猴。一只静脉内施用PHK-67标记的外排体;一只静脉内施用DiR标记的外排体;以及一只腹膜内施用DiR标记的外排体。在施用外排体之前,从每只猴收集5mL全血。如通过NanoSight后标记所评估的,外排体施用由包含680亿个外排体的2.5mL组成。在施用外排体之后24小时,使恒河猴安乐死。尝试收集尿。如下收集血液:2×5mL全血、2×5mL EDTA、2×5mL肝素。收集器官并进行福尔马林固定和石蜡包埋用于H&E染色,在液氮中快速冷冻,OCT包埋并在干冰上缓慢冷却,或保持新鲜用于IVIS成像。从股骨收集骨髓。成像结果示出外排体定位于胰腺(图1A至B)、肝(图1C至D)和脑(图1E)。

[0135] 实施例2-使用外排体的tdTomato mRNA递送

[0136] 作为原理证明,用编码tdTomato的质粒DNA或RNA(图8C)转染293T细胞。转染之后24小时使用FACS(图8A)和免疫荧光(图8B)测定经转染的细胞。接下来,用经tdTomato mRNA电穿孔的外排体处理293T细胞并在24小时之后使用FACS测定(图8D)。还用经Exofect和tdTomato mRNA或质粒DNA处理的外排体转染293T细胞。24小时之后通过FACS测定细胞的tdTomato表达(图8E&F)和细胞生存力(图8H&I)。还通过免疫荧光测定细胞的tdTomato表达(图8G)。最后,使用U2OS细胞对使用Exofect通过外排体递送mRNA进行可视化(图8J)。

[0137] 实施例3-用于抗衰老治疗的端粒酶外排体

[0138] 作为原理证明,在96小时的时间进程内,使用lipofectamine用体外转录的hTERT mRNA(图2A)转染BJ细胞。在该时间进程期间,从该细胞分离mRNA,并通过qPCR评估hTERT mRNA的水平。hTERT mRNA水平在24小时内保持相对恒定(图2B)。同样在该时间进程期间,将蛋白质分离并测试端粒酶活性。相对端粒酶活性在转染之后24小时内保持升高(图2C&D)。

[0139] 在96小时的时间进程内,还使用lipofectamine用体外转录的经修饰hTERT mRNA(hTERT modRNA)转染BJ细胞。在该时间进程期间,从该细胞分离mRNA,并通过qPCR评估hTERT mRNA的水平。hTERT mRNA水平在24小时内保持相对恒定(图2E)。同样在时间进程期间,将蛋白质分离并测试端粒酶活性。相对端粒酶活性在转染之后24小时内保持升高(图2F)。值得注意的是,显性负hTERT modRNA没有提高端粒酶活性(图2G)。

[0140] 通过转染细胞24或48小时并测定培养物的细胞死亡来测试hTERT mRNA和hTERT modRNA对细胞生存力的作用。发现hTERT mRNA诱导细胞死亡,但hTERT modRNA不诱导细胞死亡(图2H)。

[0141] 通过在三周内使用lipofectamine用hTERT modRNA处理细胞四次来测试hTERT modRNA对细胞衰老的作用。Lipofectamine单独用作对照。最后收集细胞以评价 $\beta$ -半乳糖苷酶表达。用hTERT modRNA处理降低了细胞衰老水平,但用显性负hTERT modRNA处理不降低细胞衰老水平(图2I&J)。

[0142] 通过在三周内使用lipofectamine用hTERT modRNA处理细胞四次来测试hTERT modRNA对如通过FISH所检测到的端粒信号的作用。Lipofectamine单独用作对照。最后收集细胞并使用PNA-FISH评价端粒信号。对细胞进行成像,并使用软件基于信号积分密度评价端粒信号。用hTERT modRNA处理提高了显示出更高端粒信号的细胞的相对频率(图2K)。

[0143] 接下来,使用经hTERT modRNA电穿孔的外排体研究了BJ细胞。在电穿孔(使用图3B中所示的引物进行)之后,外排体中的modRNA表达表明这更有效(图3A)。在0小时和48小时用含有hTERT modRNA的外排体处理BJ细胞。细胞在72小时收集并测试hTERT mRNA和modRNA水平(图4A)。还测试了细胞的端粒酶活性(图4B)和衰老(图4C至E)。

[0144] 使用Exofect,用经hTERT modRNA转染的外排体处理U2OS细胞,并在24小时之后测试hTERT mRNA表达(图5A)和端粒酶活性(图5B)。

[0145] 在293T细胞中过表达hTERT(图6A)。发现hTERT过表达293T细胞表达更高的端粒酶活性(图6B)并且表达更多的hTERT mRNA(图6C)。hTERT还在BJ和U2OS细胞中过表达,这也显示出更高水平的hTERT mRNA(图6D)和蛋白质(图6E)。从hTERT过表达293T细胞分离的外排体用于处理BJ和U2OS细胞。经处理的U2OS细胞表现出更高的端粒信号(图7)。

[0146] \*\*\*

[0147] 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。尽管已经以一些优选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。更具体地,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。

[0148] 参考文献

[0149] 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。

[0150] 美国专利4,870,287

[0151] 美国专利5,739,169

[0152] 美国专利5,760,395

[0153] 美国专利5,801,005

[0154] 美国专利5,824,311

[0155] 美国专利5,830,880

[0156] 美国专利5,846,945

- [0157] Alvarez-Erviti et al., Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29:341-345, 2011.
- [0158] Baietti et al., Syndecan-syntenin-ALIX regulated the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.*, 14:677-685, 2012.
- [0159] Clayton et al., Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *European Journal of Immunology*, 33:522-531, 2003.
- [0160] Combes et al., A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma. *Thromb. Haemost.*, 77:220, 1997.
- [0161] Cooper et al., Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders*, 29:1476-1485, 2014.
- [0162] Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Research*, 33:1671-1677, 2005.
- [0163] El-Andaloussi et al., Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:347-357, 2013.
- [0164] El-Andaloussi et al., Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nature Protocols*, 7:2112-2126, 2012.
- [0165] Esteller, *Nat Review Genet* 8:286-298, 2007.
- [0166] Feinberg and Fogelstein, *Nature* 301:89-92, 1983.
- [0167] Gomes-da-Silva et al., Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *Accounts of Chemical Research*, 45:1163-1171, 2012.
- [0168] Johnsen et al., A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles-endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846:75-87, 2014.
- [0169] Jones and Paylin, *Cell* 128:683-692, 2007.
- [0170] Kowal et al., Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29:116-125, 2014.
- [0171] Luga et al., Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151:1542-1556, 2012.
- [0172] Ma et al., Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429:318-322, 2004.
- [0173] Marcus and Leonard, *FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6:659-680, 2013.
- [0174] Melo et al., Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523:177-182, 2015.
- [0175] Robertson, *Nat Review Genet* 6:597-610, 2005.

- [0176] Siegel et al.,Cancer statistics,2014.CA:A cancer journal for clinicians,64:9-29,2014.
- [0177] Simoes et al.,Cationic liposomes for gene delivery.Expert Opinion on Drug Delivery,2:237-254,2005.
- [0178] They et al.,Exosomes:composition,biogenesis and function.Nature Reviews Immunology,2:569-579,2002.
- [0179] Valadi et al.,Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.Nature Cell Biology,9:654-659,2007.
- [0180] van den Boorn et al.,Exosomes as nucleic acid nanocarriers.Advanced Drug Delivery Reviews,65:331-335,2013.
- [0181] van der Meel et al.,Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field.Journal of Controlled Release,195:72-85,2014.
- [0182] Wahlgren et al.,Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes.Nucleic Acids Research,40:e130, 2012.
- [0183] Xue et al.,Small RNA combination therapy for lung cancer.Proceedings of the National Academy of Sciences USA,111:E3553-3561,2014.



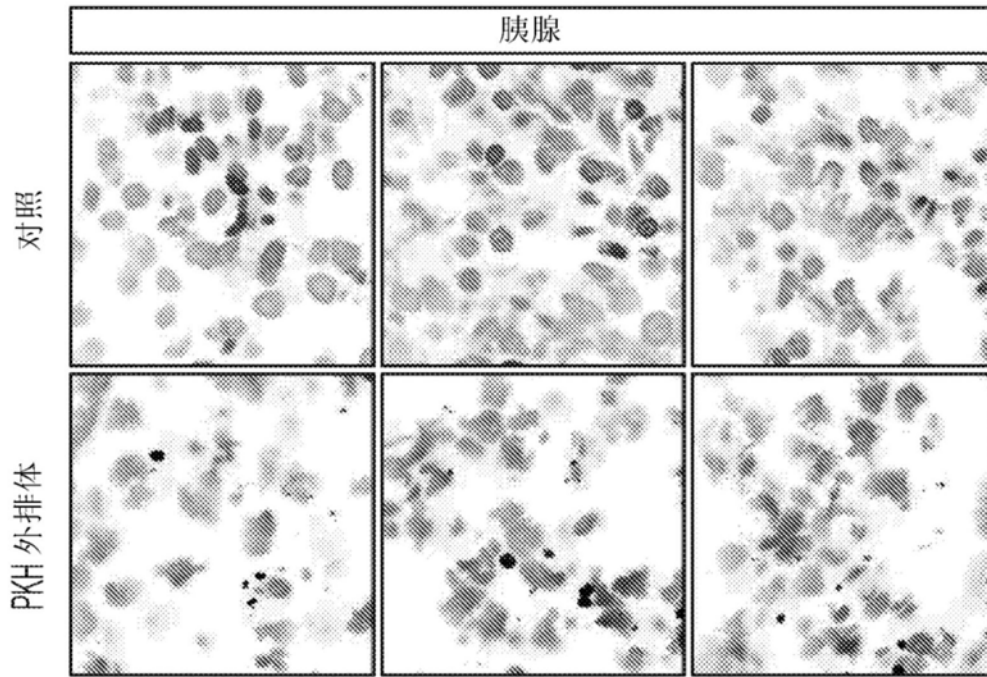


图1A

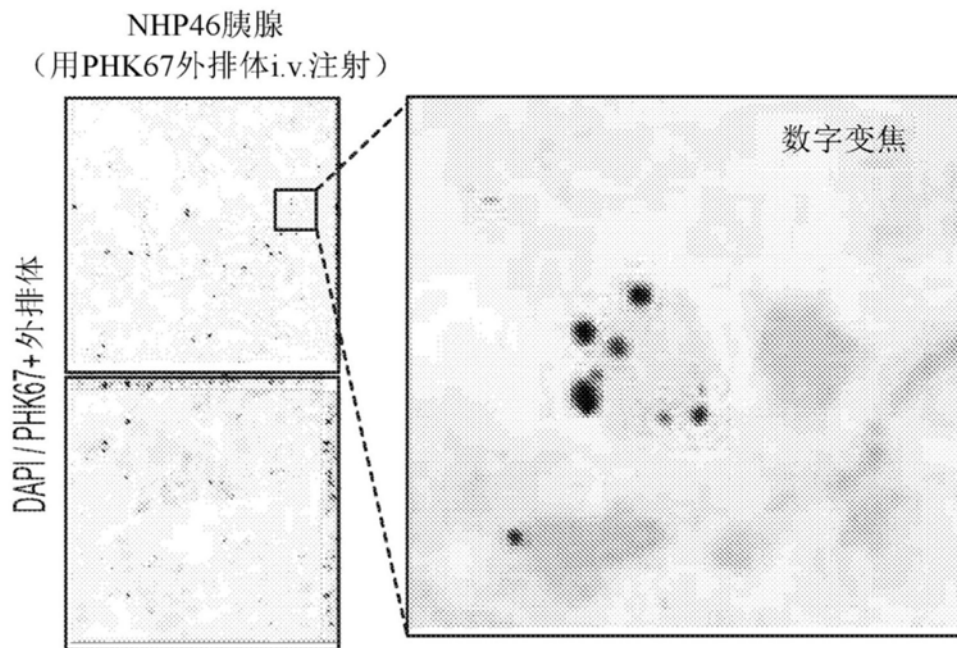


图1B

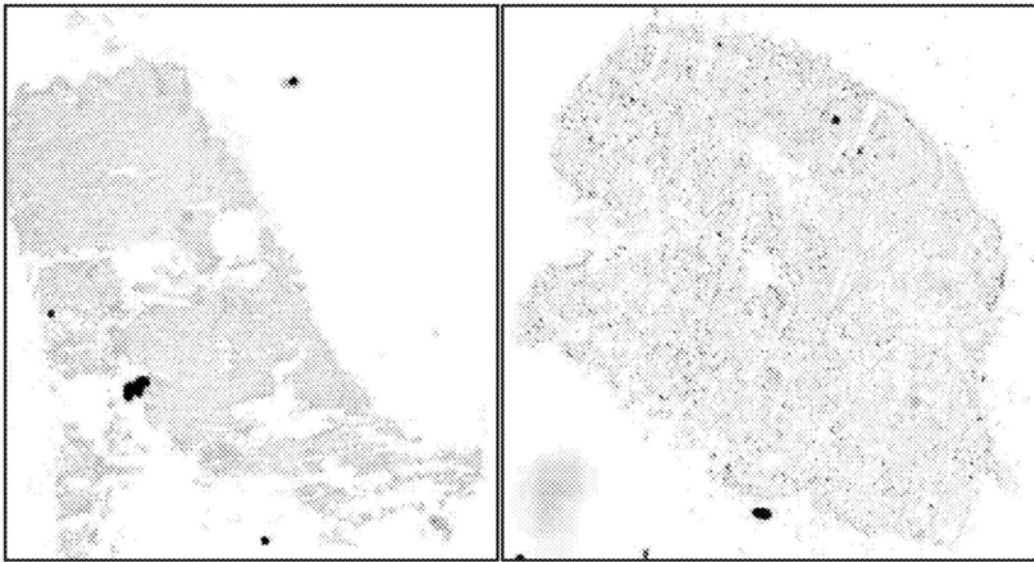


图1C

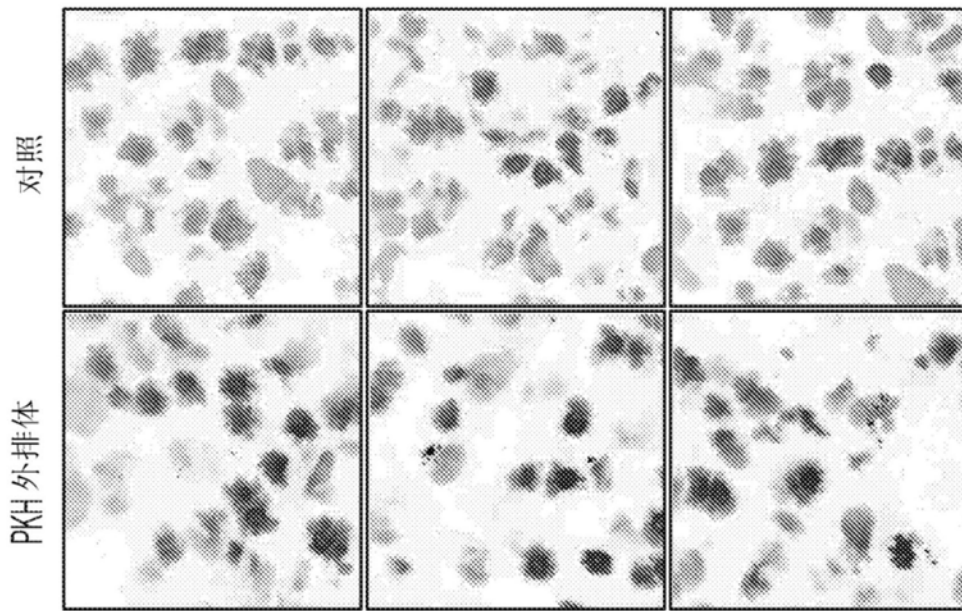


图1D

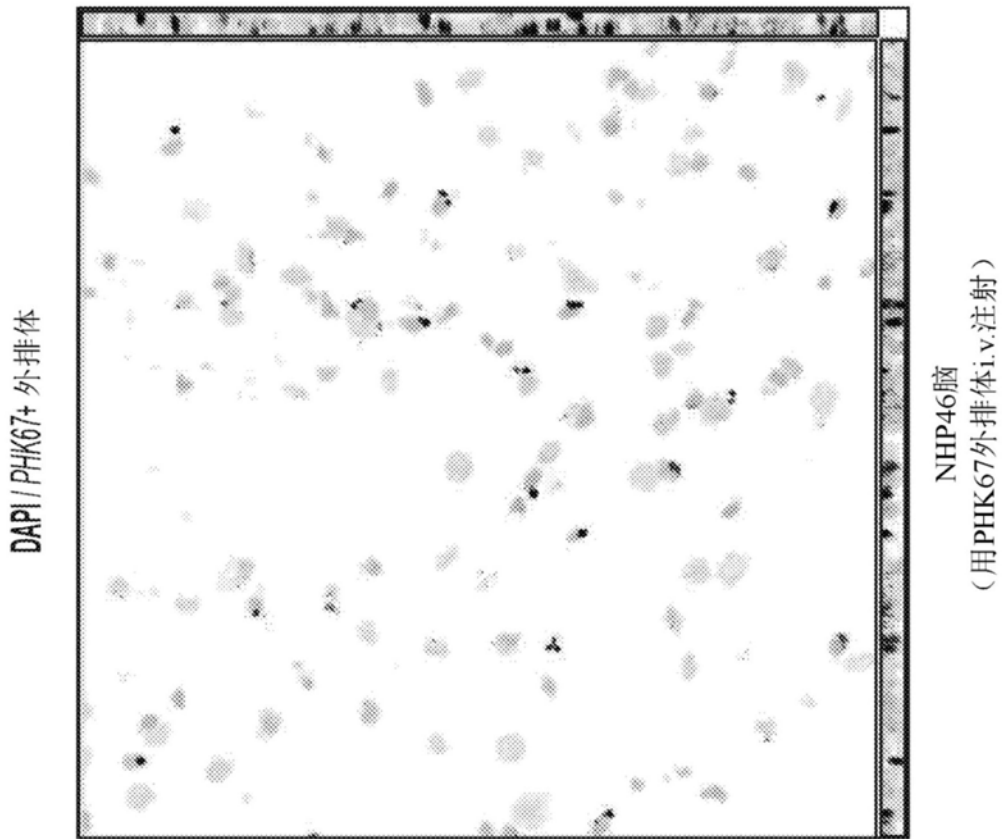


图1E



图2A

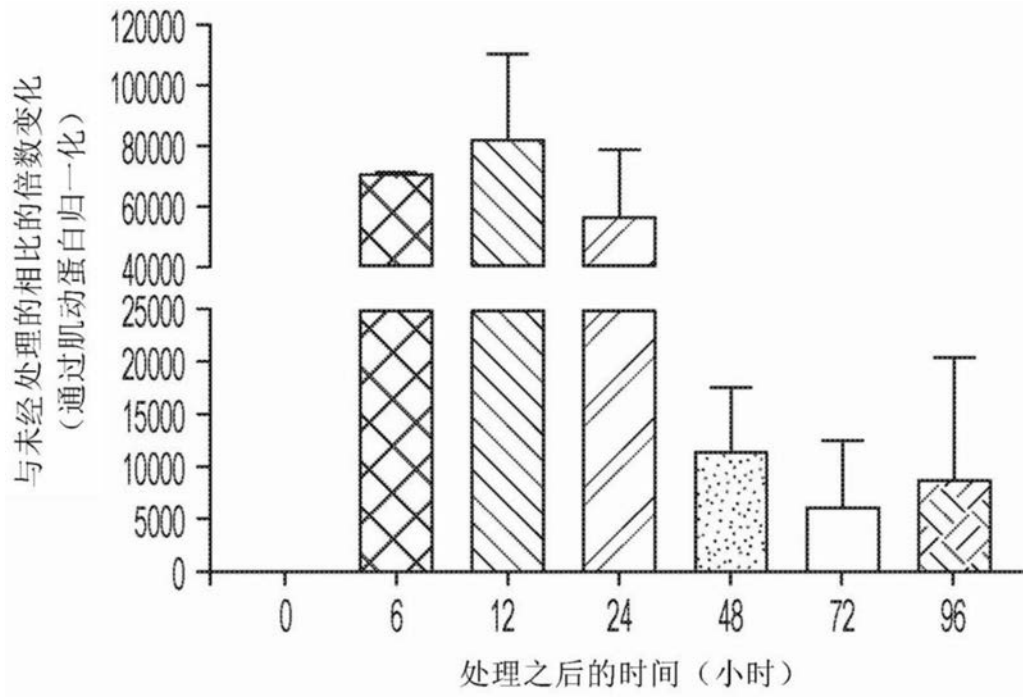


图2B

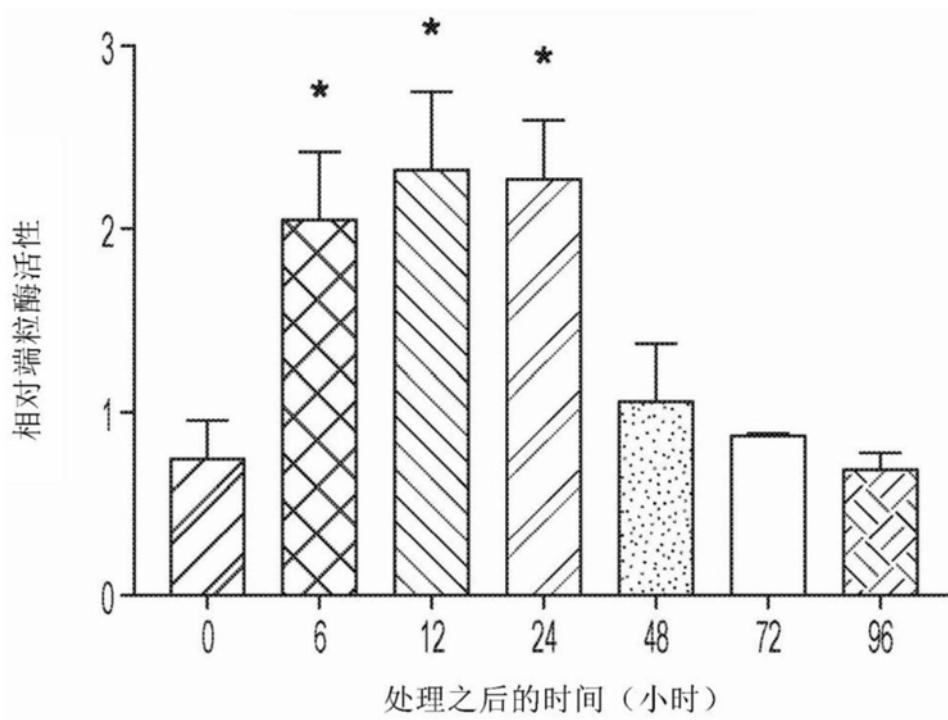
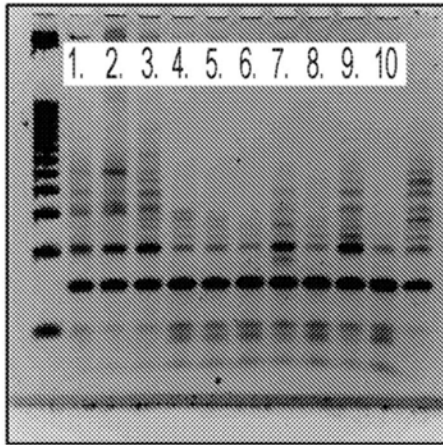
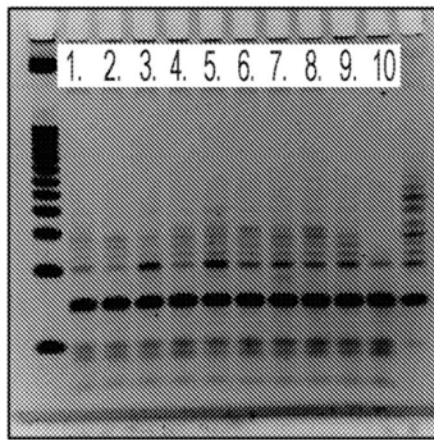


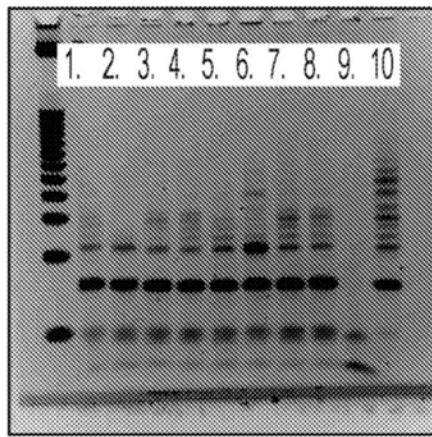
图2C



1. 6小时 - hTERT
2. 6小时 - hTERT (热灭活)
3. 12小时 - hTERT
4. 12小时 hTERT (热灭活)
5. 12小时 - DN-hTERT
6. 12小时 - DN-hTERT (热灭活)
7. 24小时 - lipo
8. 24小时 - lipo (热灭活)
9. 24小时 - hTERT
10. 24小时 - hTERT (热灭活)



1. 24小时 - DN-hTERT
2. 24小时 - DN-hTERT (热灭活)
3. 48小时 - lipo
4. 48小时 - lipo (热灭活)
5. 48小时 - hTERT
6. 48小时 - hTERT (热灭活)
7. 48小时 - DN-hTERT
8. 48小时 - DN-hTERT (热灭活)
9. 72小时 - hTERT
10. 24小时 - hTERT (热灭活)



1. 72小时 - DN-hTERT
2. 72小时 - DN-hTERT (热灭活)
3. 96小时 - lipo
4. 96小时 - lipo (热灭活)
5. 96小时 - hTERT
6. 96小时 - hTERT (热灭活)

图2D

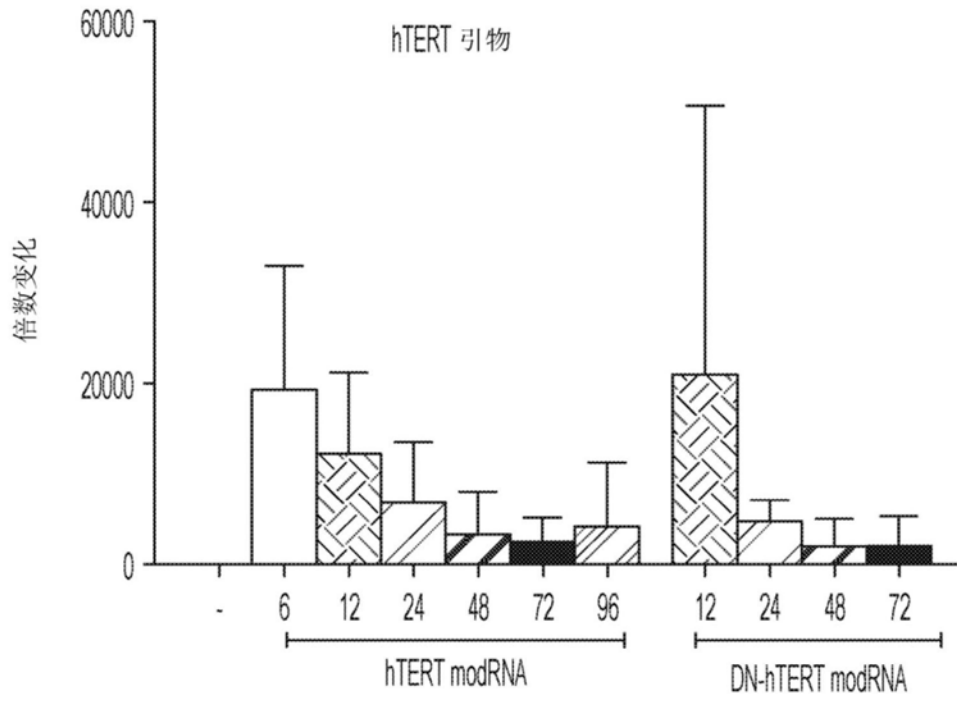


图2E

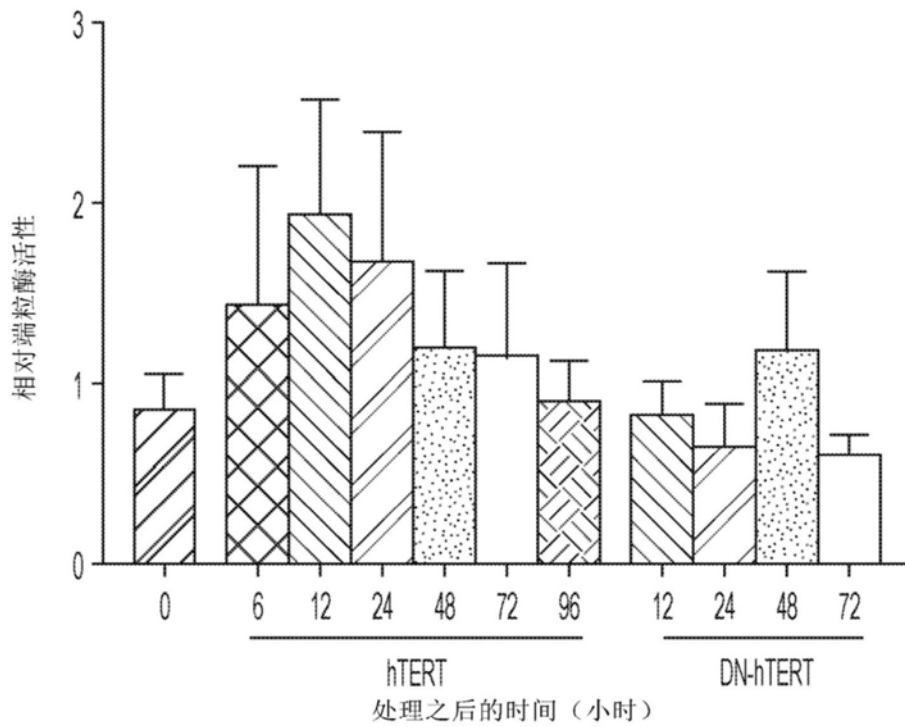


图2F

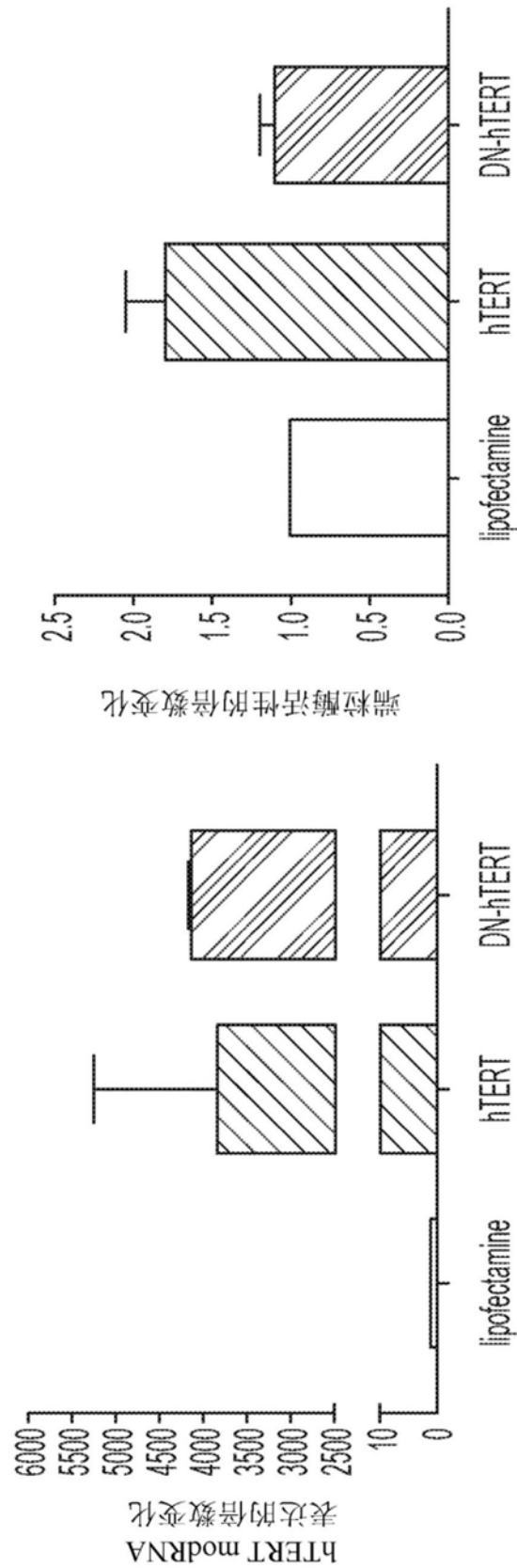


图2G

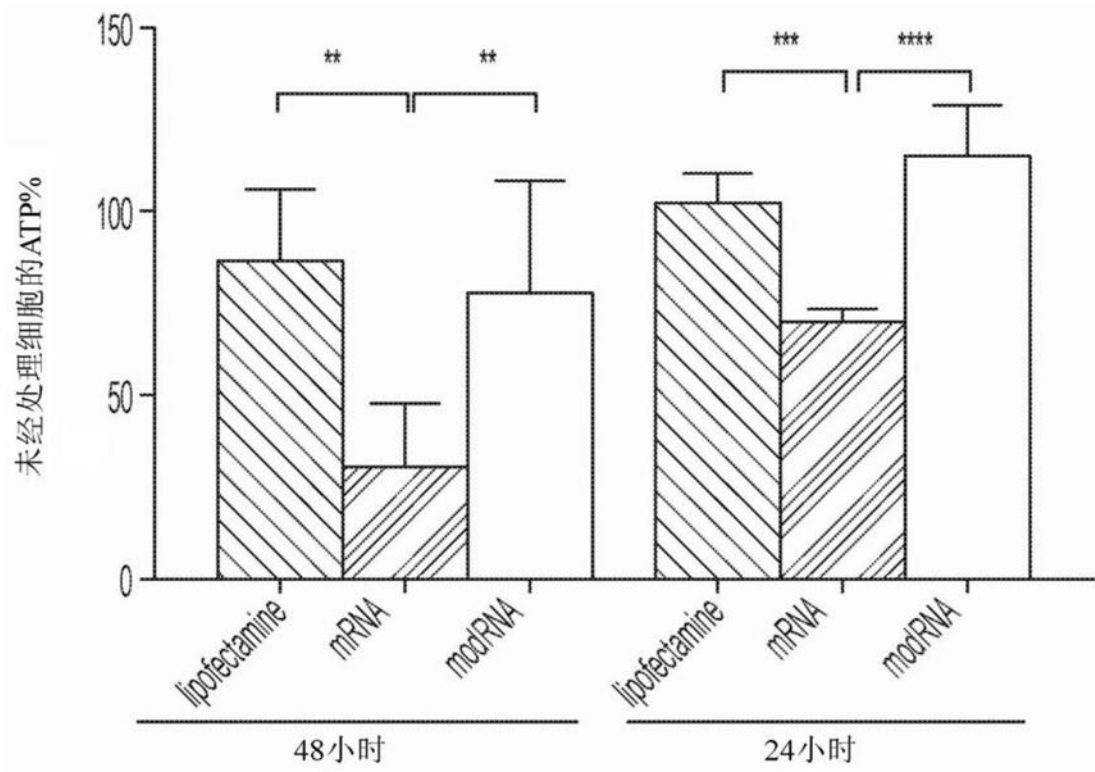


图2H

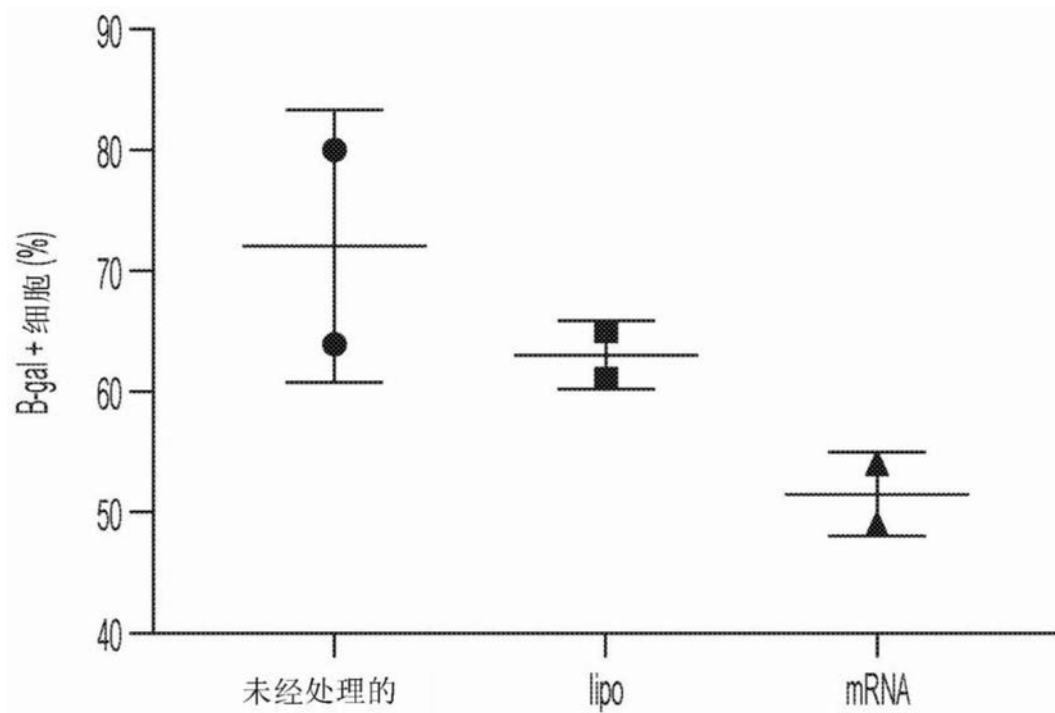


图2I



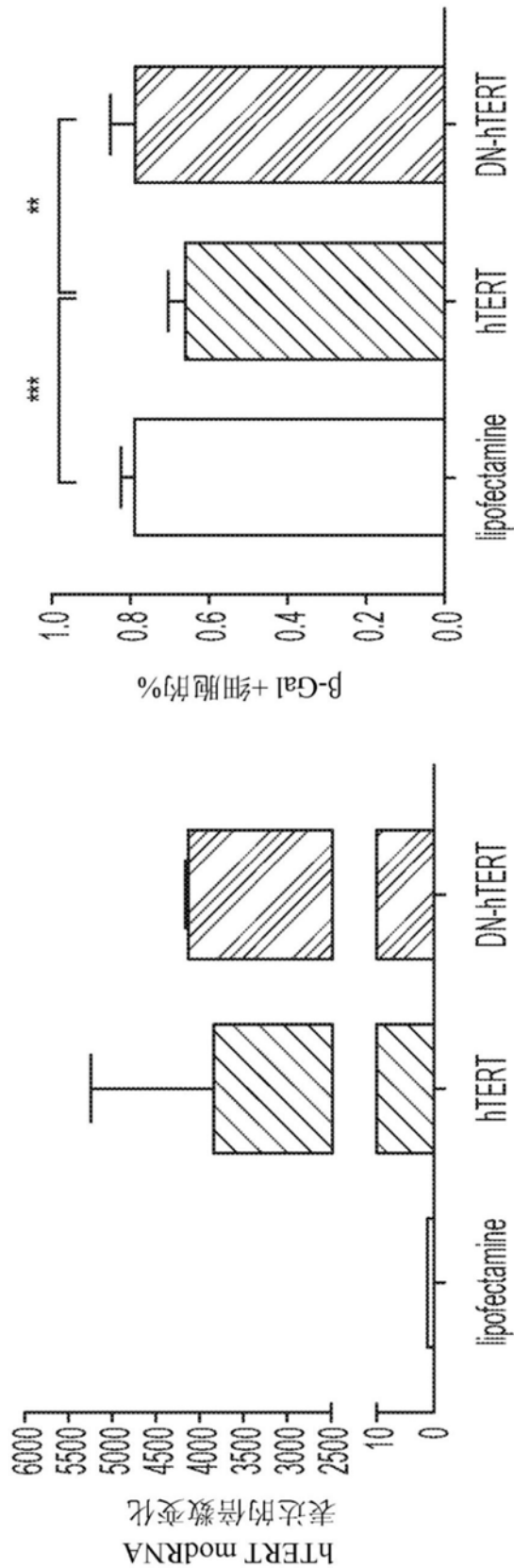


图2J

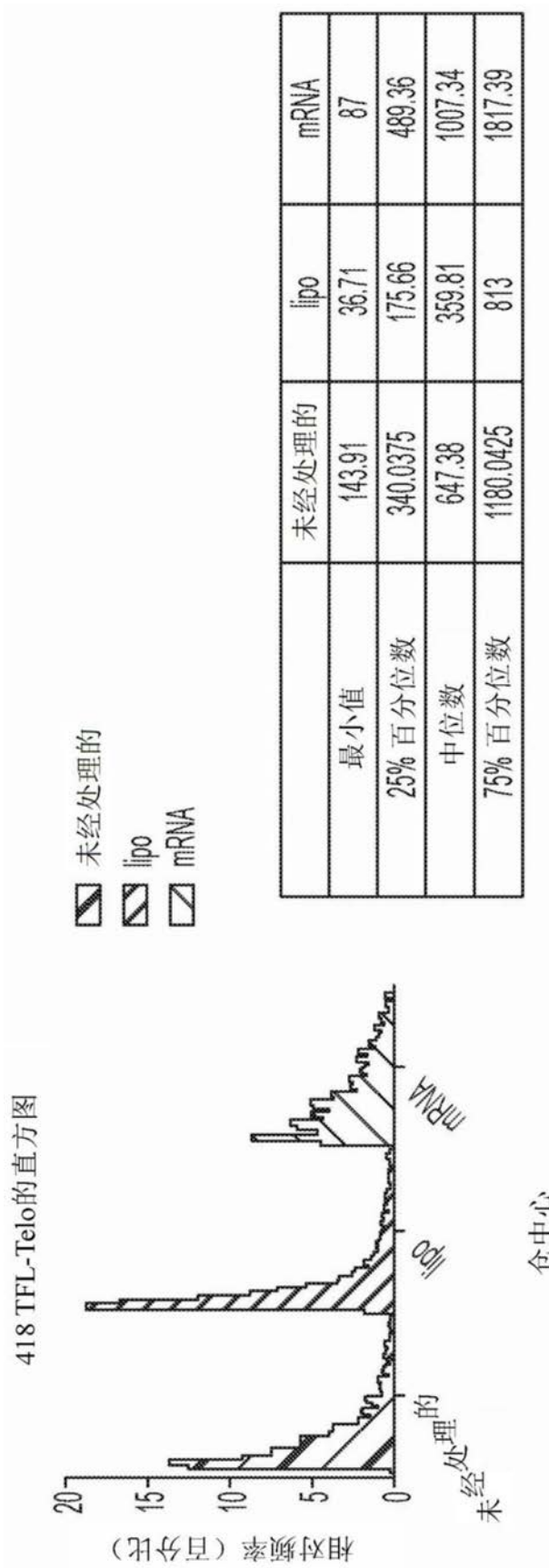


图2K

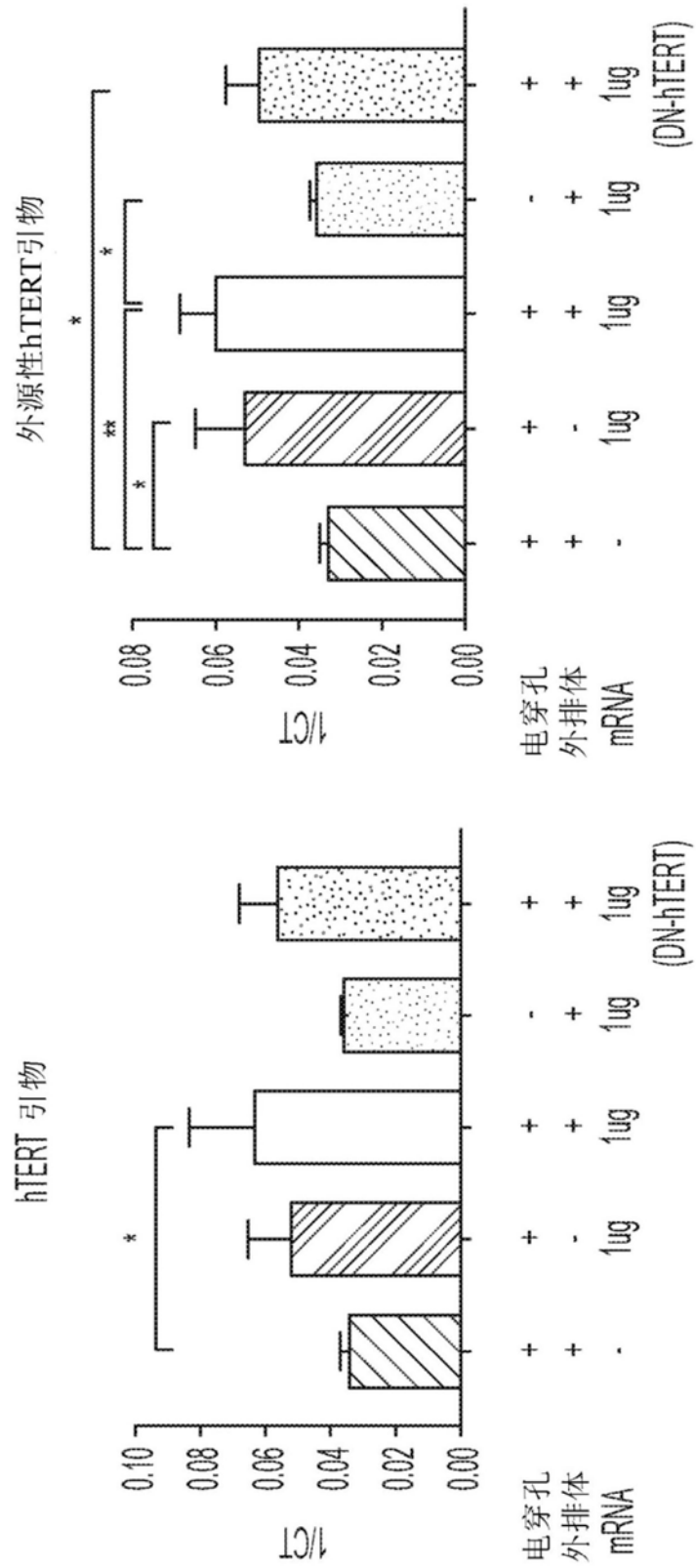


图3A

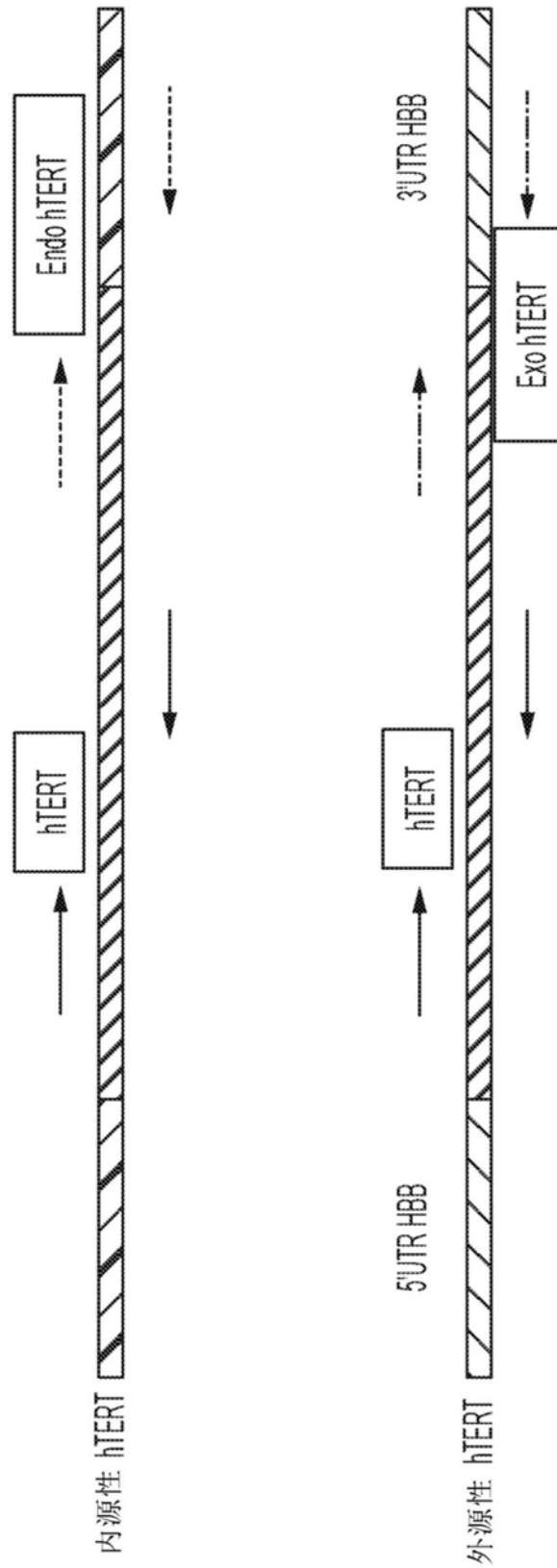


图3B

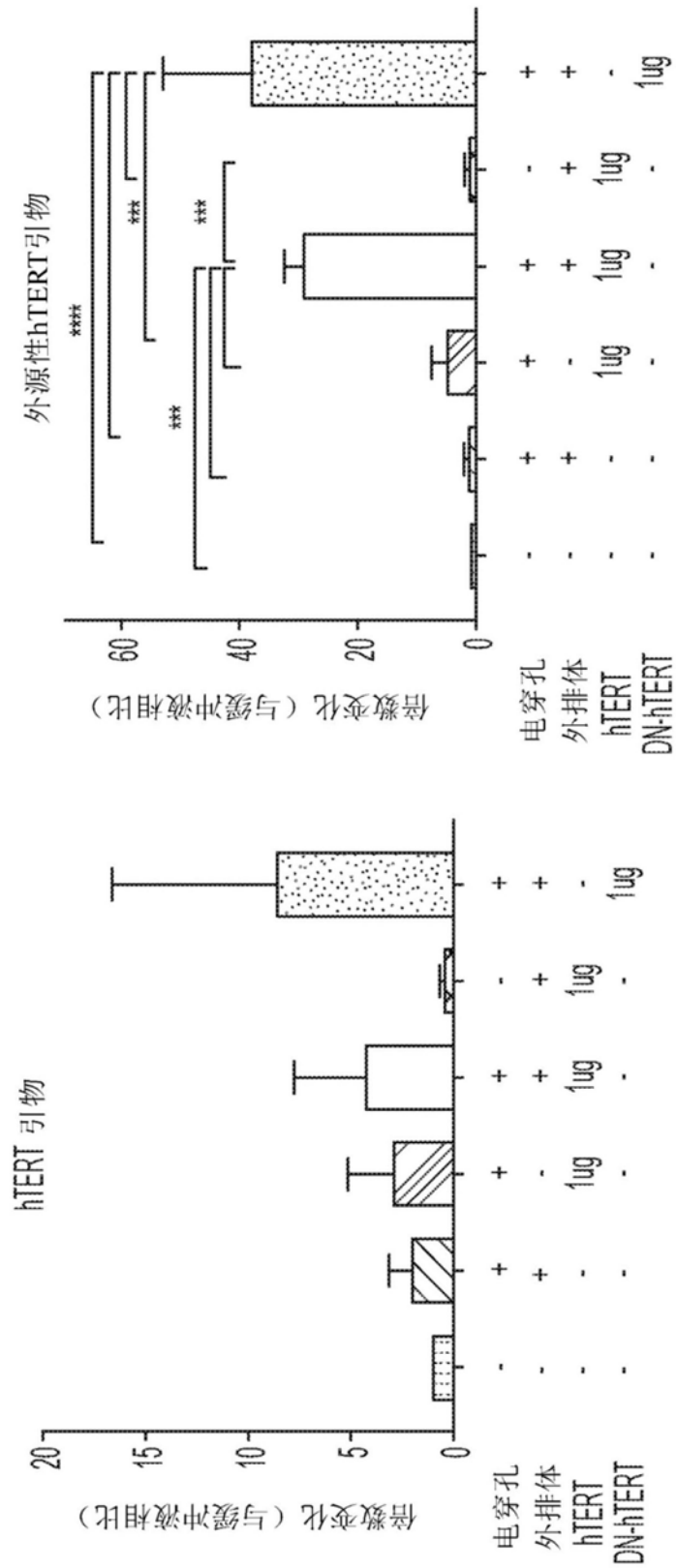


图4A

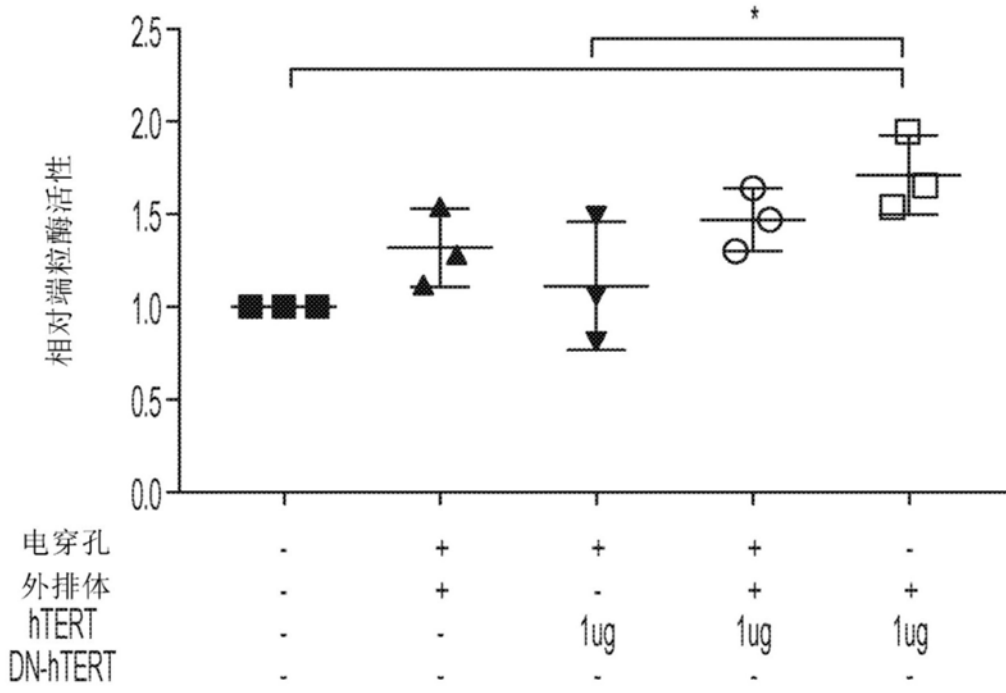


图4B

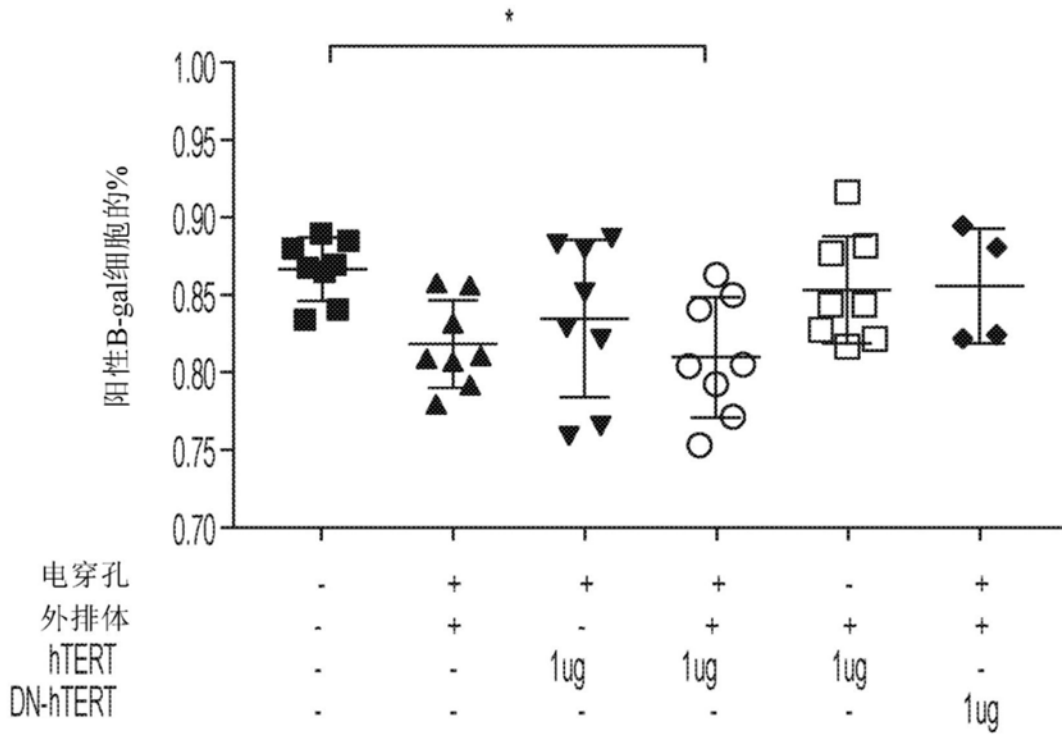


图4C

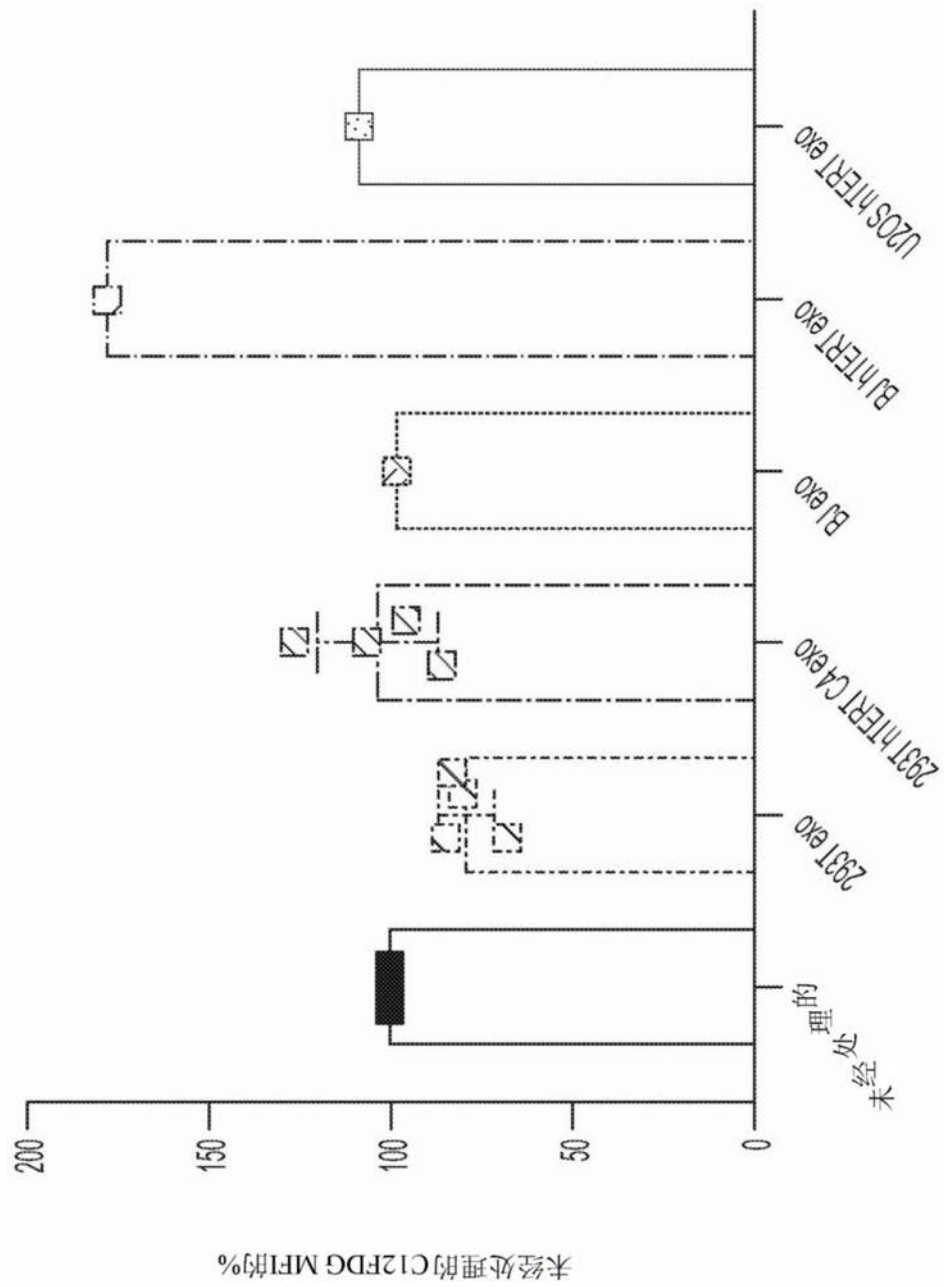


图4D

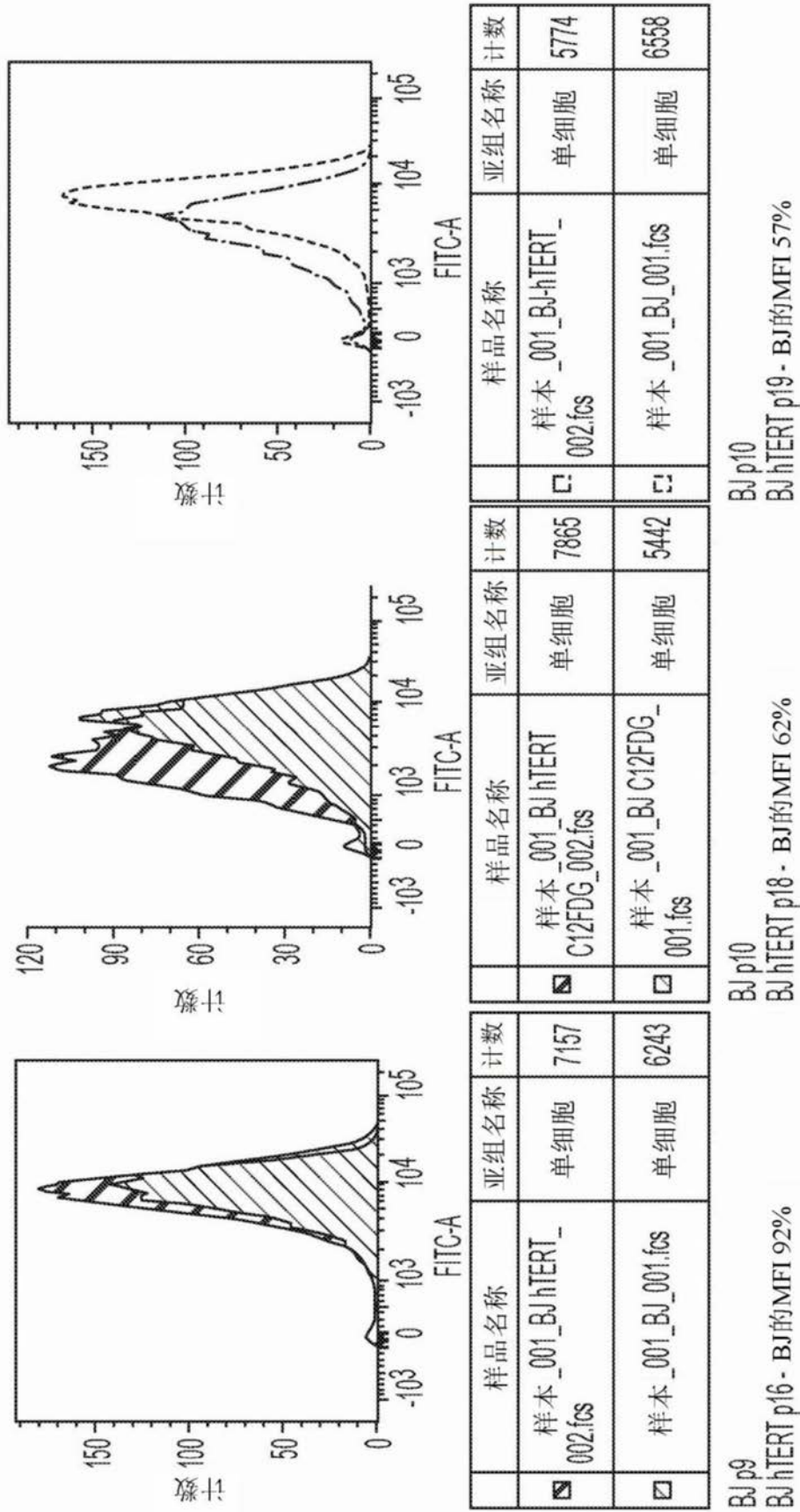


图4E



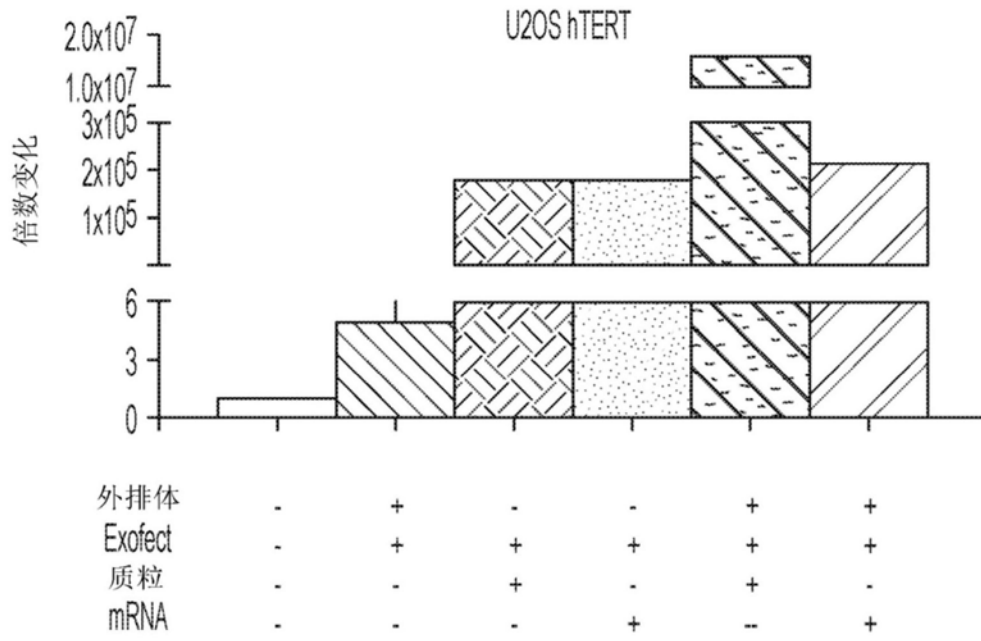


图5A

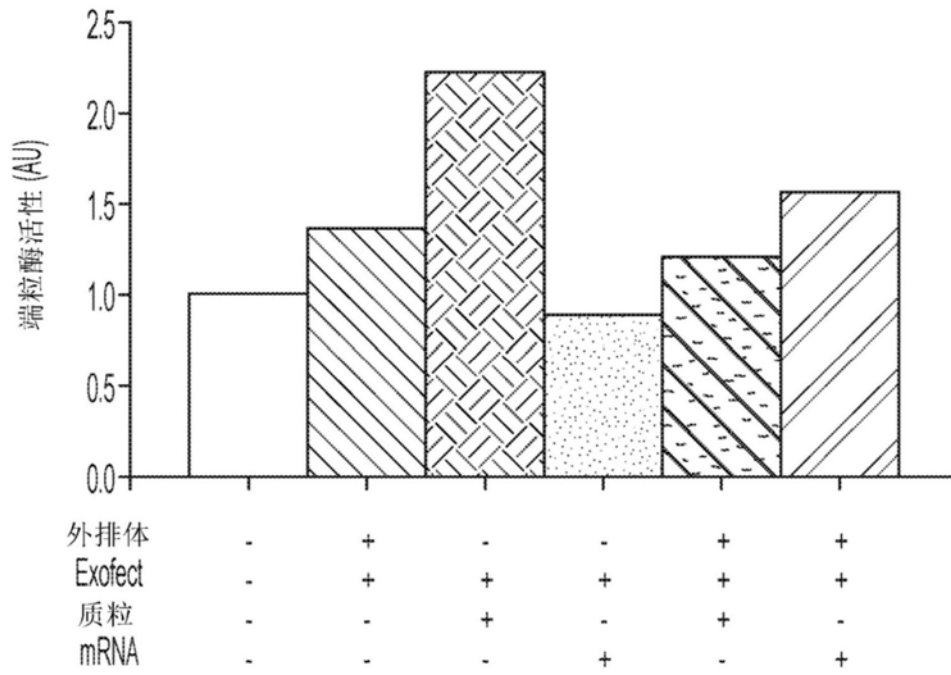


图5B

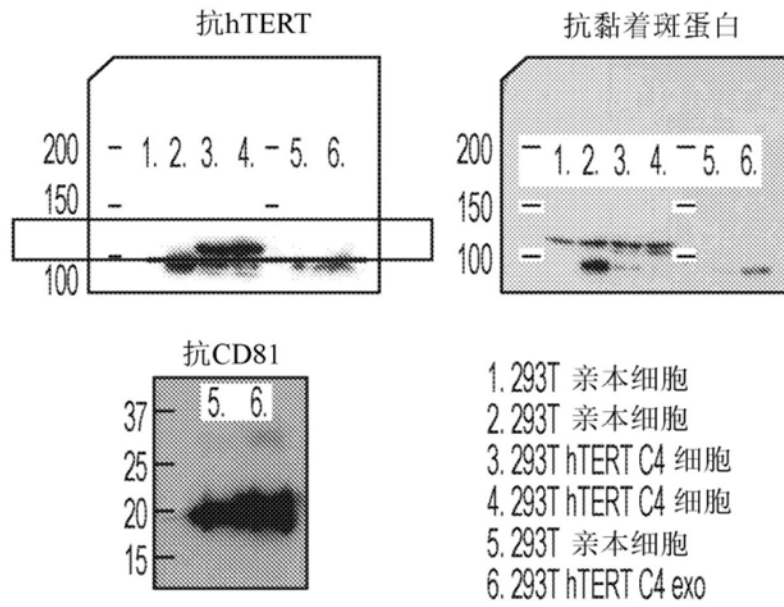


图6A

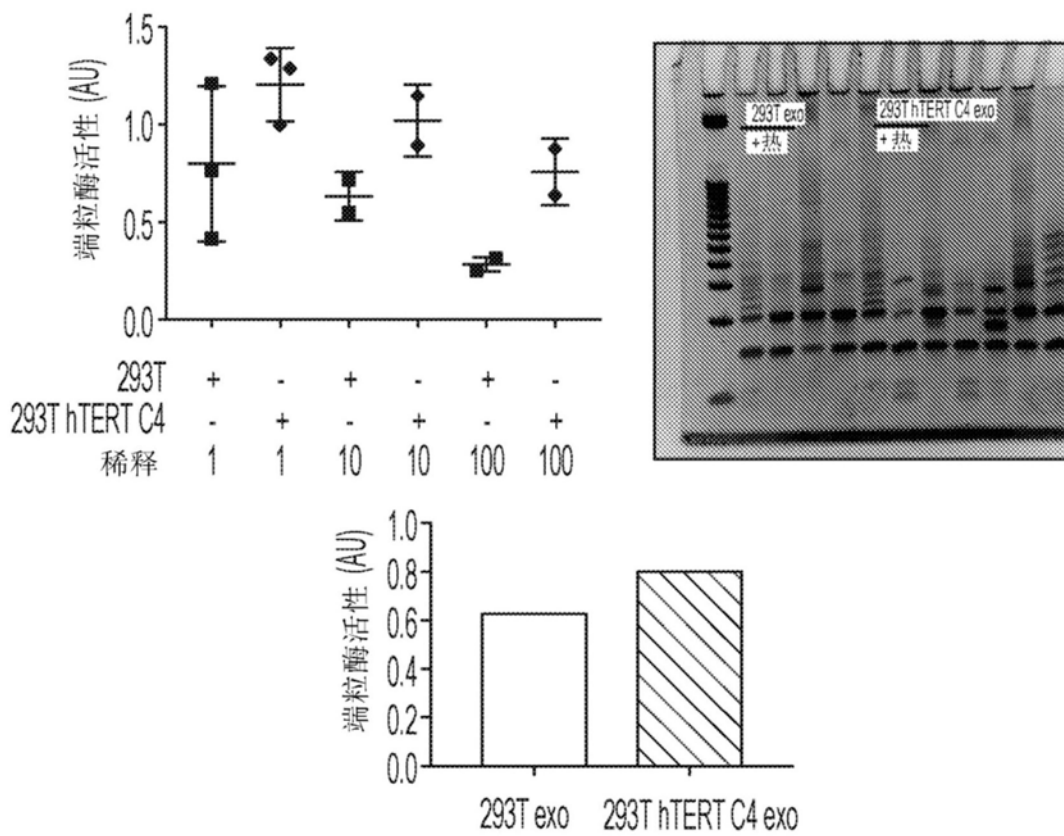


图6B

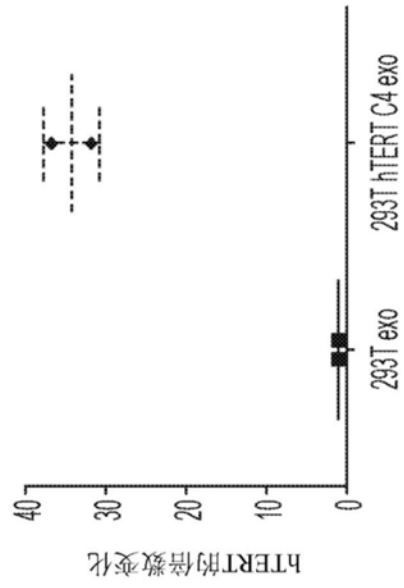


图6C

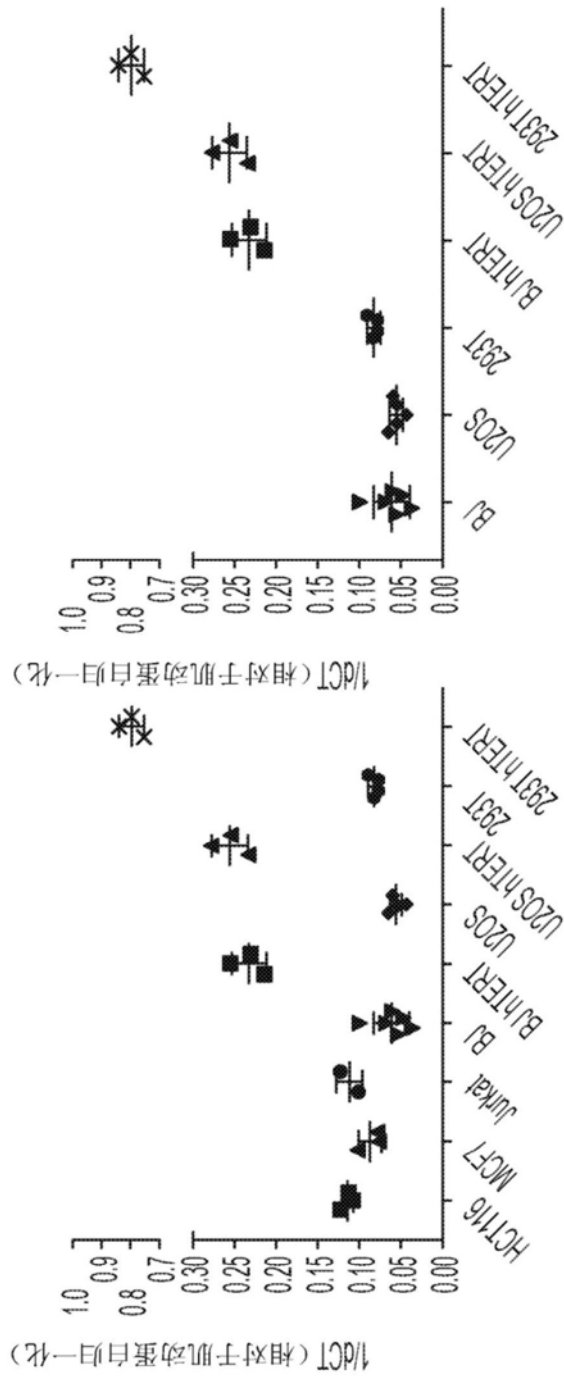


图6D

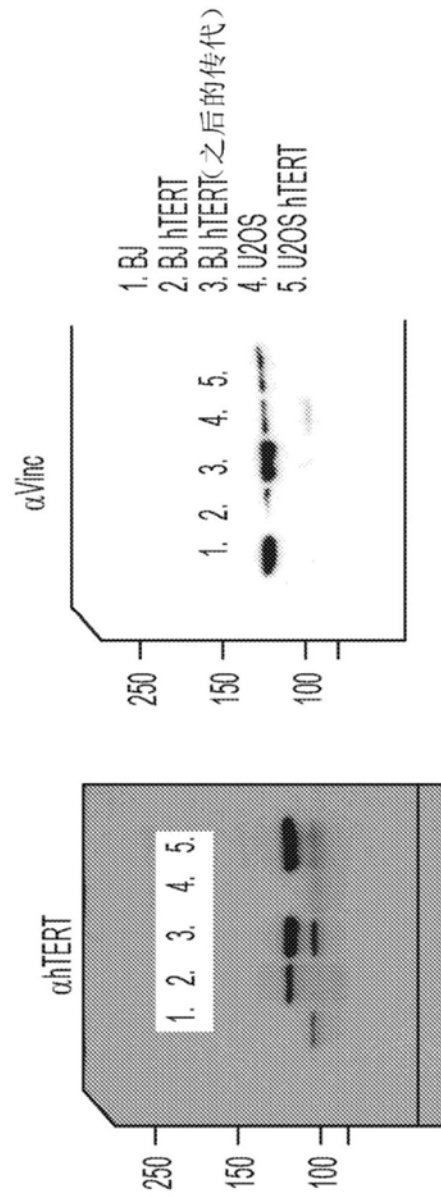


图6E

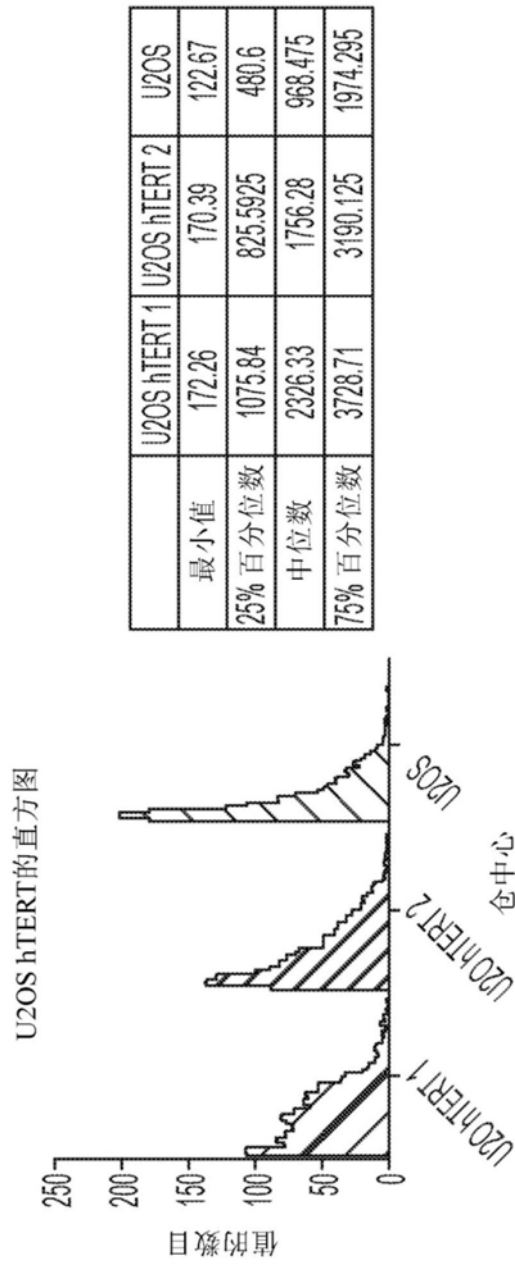


图7

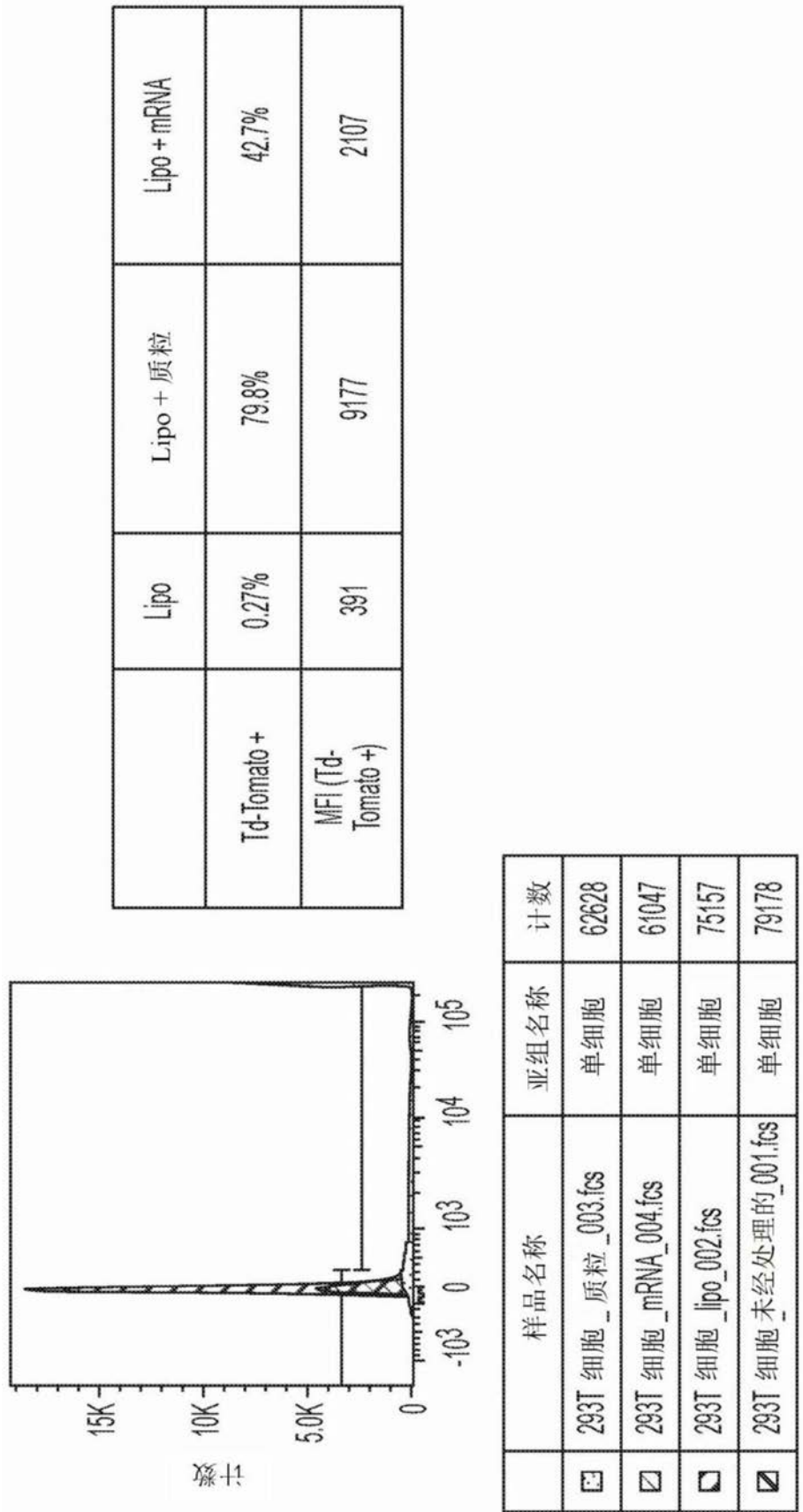


图8A

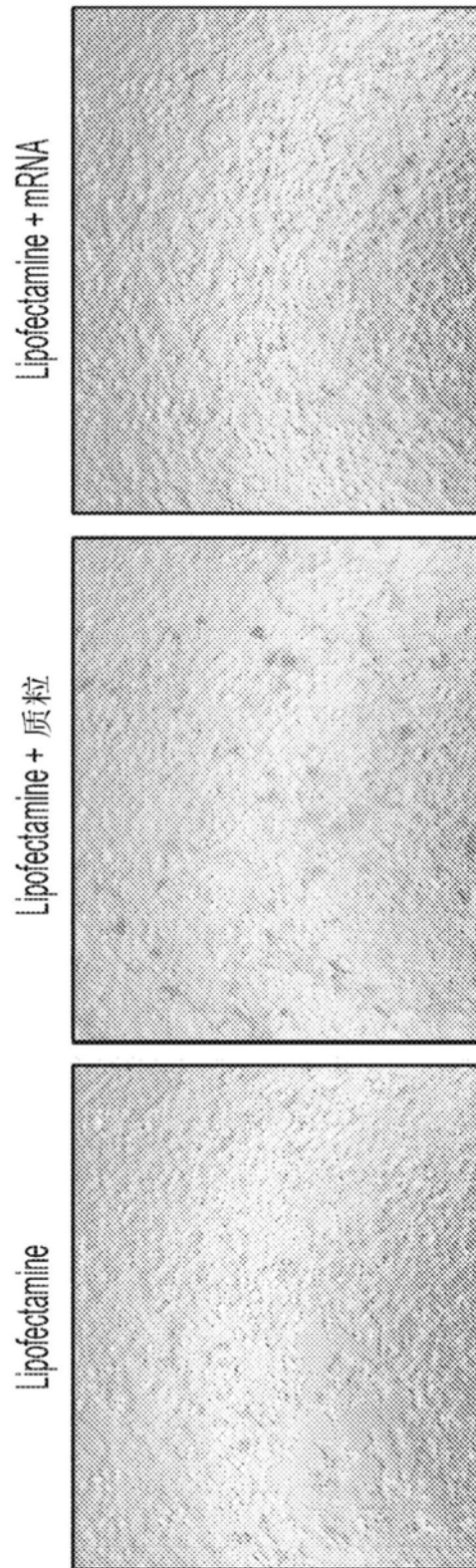


图8B





图8C

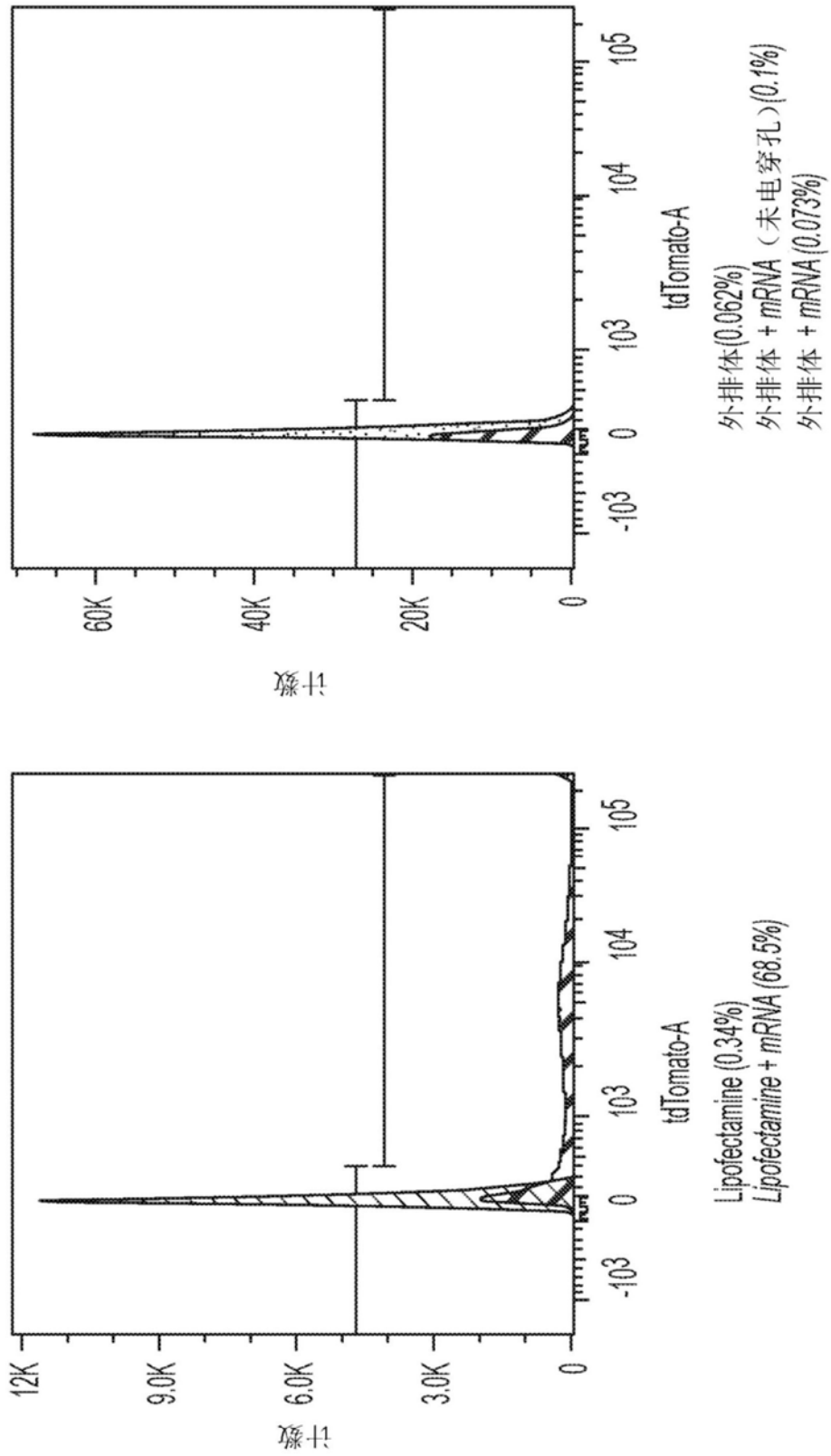


图8D

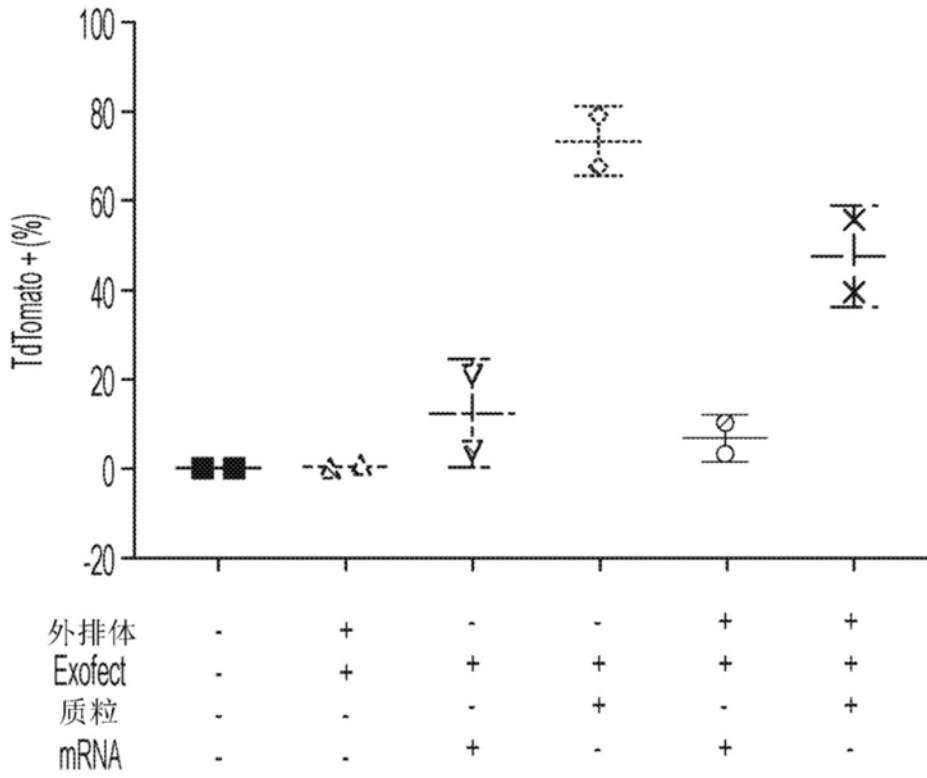


图8E

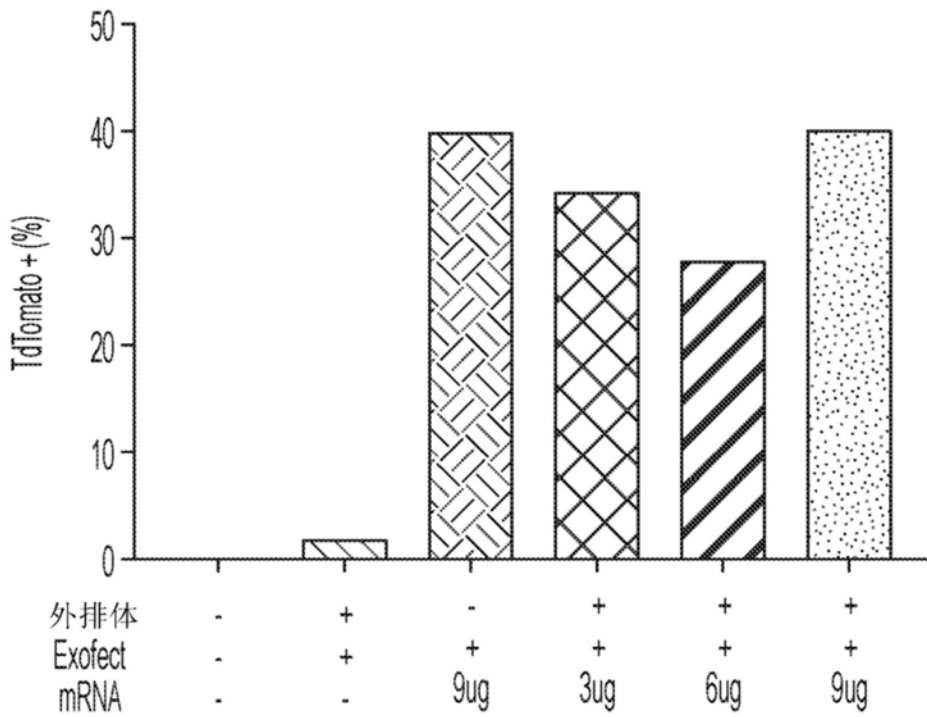


图8F

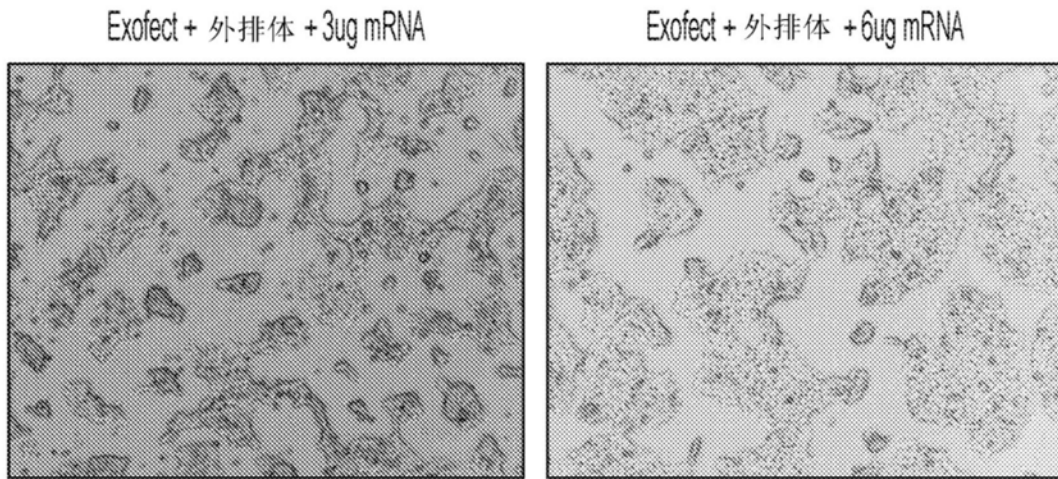


图8G

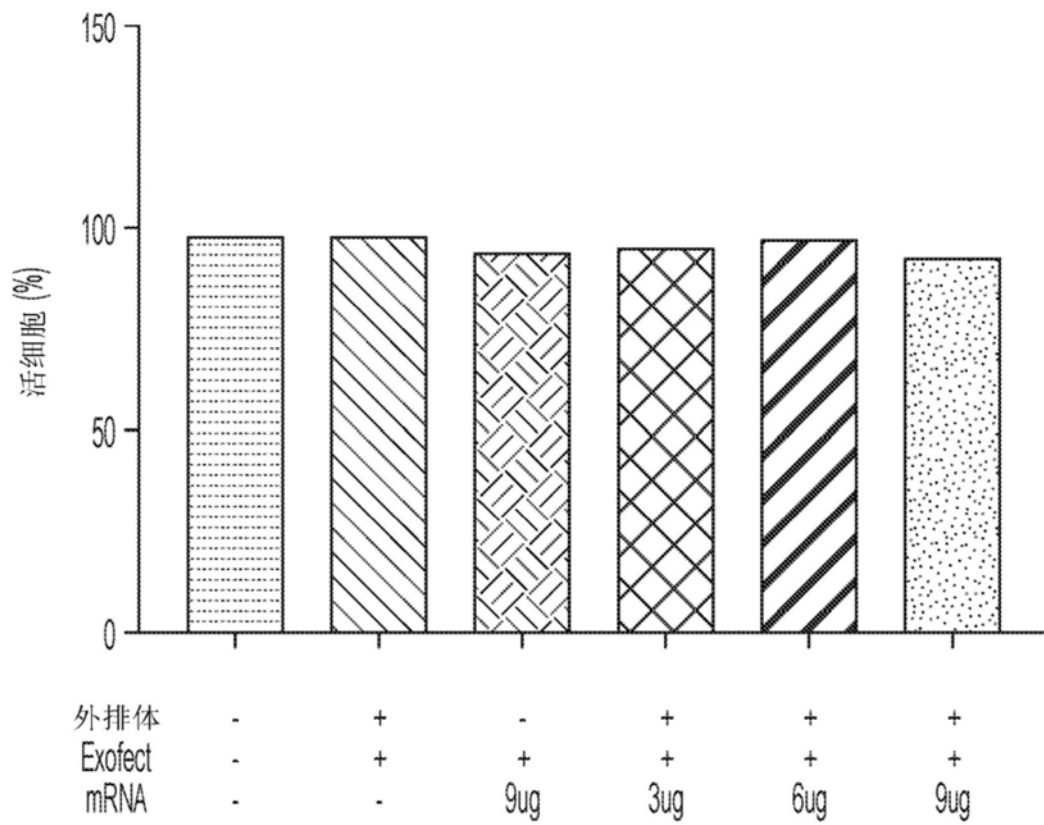


图8H

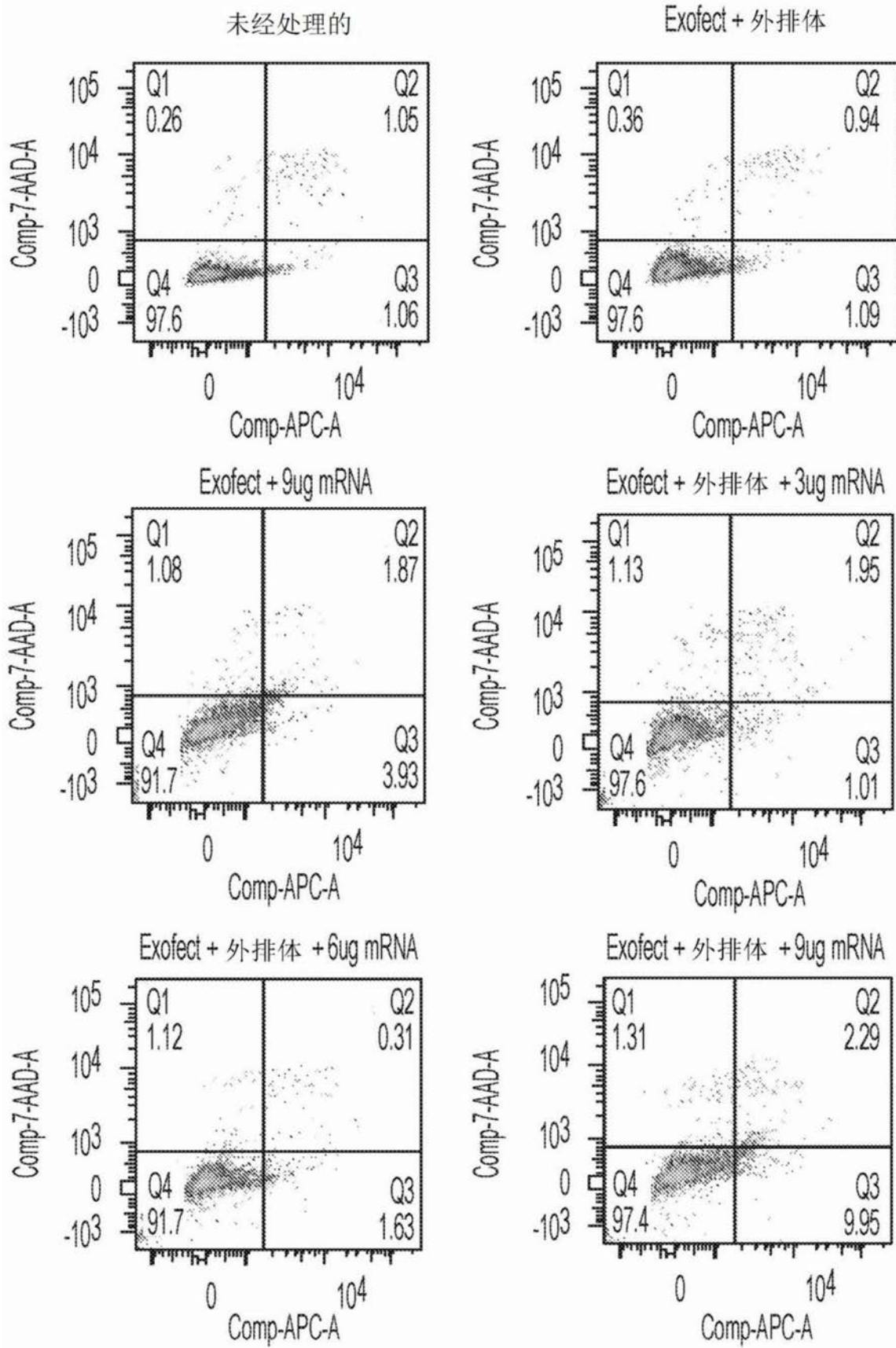


图8I

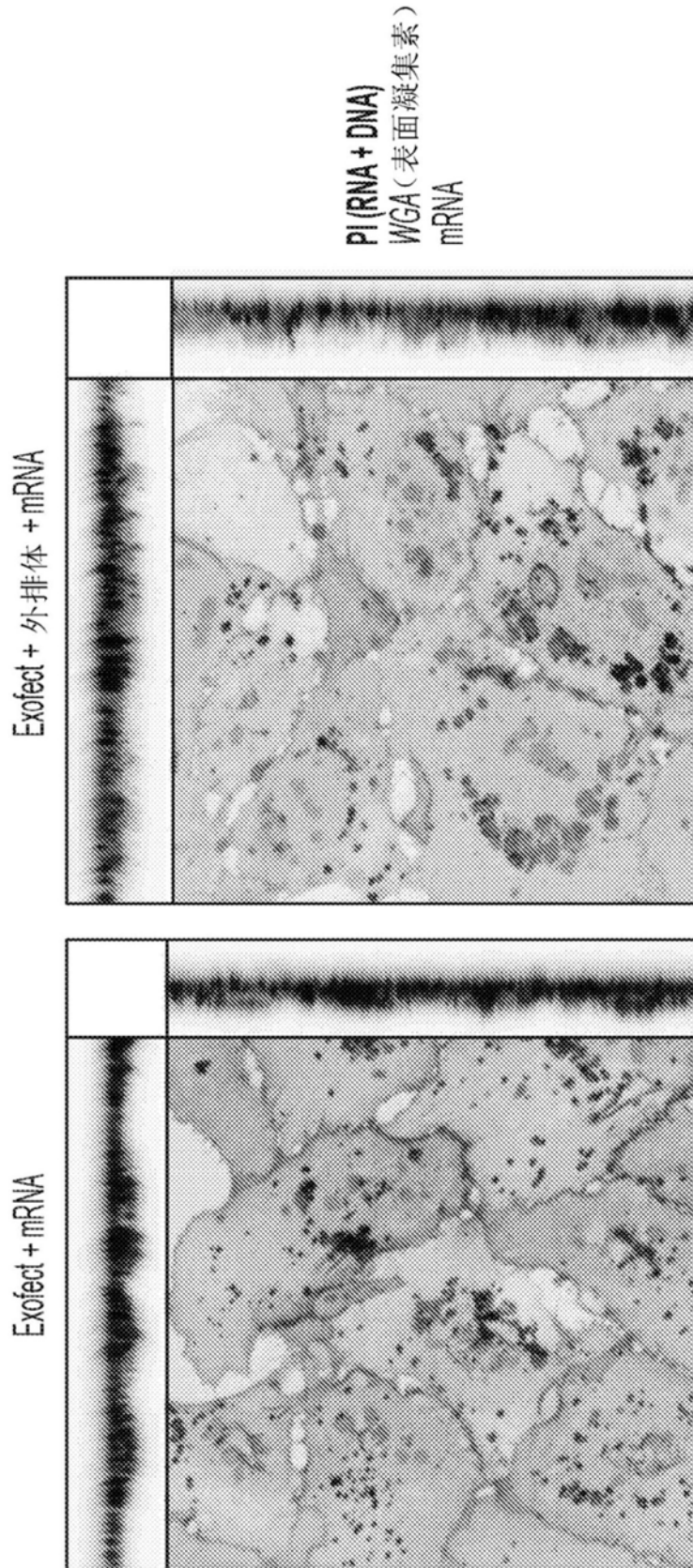


图8J