



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118021941 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 14

(21) 申请号 202211362440.2

A61P 35/04 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.02

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72) 发明人 梁伟 曾文峰 田红健 王子昊
黄峰

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 柴春玲

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 35/13 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

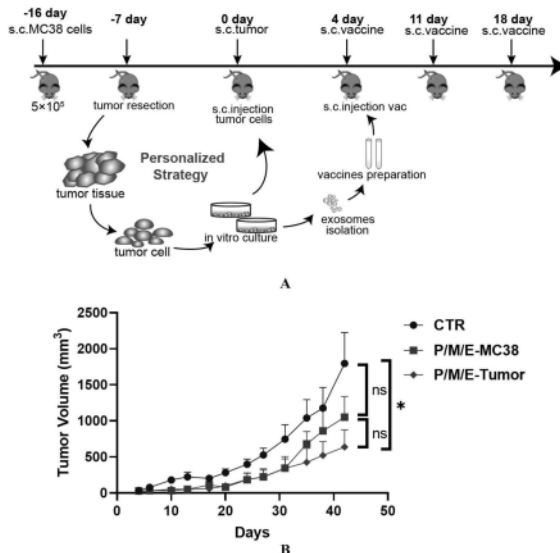
权利要求书2页 说明书22页 附图10页

(54) 发明名称

一种改造的外泌体制剂、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种改造的外泌体制剂、其制备方法及应用,所述的制剂包含:(1)浓度大于50ug/ml二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(PEG-DSPE);(2)蛋白浓度大于10ug/ml的肿瘤外泌体成分;(3)有效量的用于刺激免疫反应的免疫佐剂分子;本发明还涉及所述的改造的肿瘤外泌体制剂在制备抗肿瘤药物或个体化抗肿瘤制剂中的应用。



1. 一种改造的肿瘤外泌体制剂,所述的制剂包含:
 - (1) 浓度大于50ug/ml二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(PEG-DSPE)组分;
 - (2) 蛋白浓度大于10ug/ml的肿瘤外泌体组分;
 - (3) 有效量的用于刺激免疫反应的免疫佐剂分子。
2. 根据权利要求1所述的改造的肿瘤外泌体制剂,其特征在于,所述的PEG-DSPE的纯度 $\geq 95\%$,其中的PEG链的分散度 ≤ 1.1 ;
优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为1000~5000Da;更优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为1500~2500Da;最优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为2000Da(PEG2000-DSPE)。
3. 根据权利要求1或2所述的改造的肿瘤外泌体制剂,其特征在于,所述的蛋白浓度指制剂中所有的肿瘤外泌体中所包含的蛋白浓度,优选的,使用BCA法对肿瘤外泌体的蛋白浓度进行定量。
4. 根据权利要求1-3任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂,其特征在于,所述的免疫佐剂分子包括但不限于,MPLA、QS21、PolyI:C;优选为MPLA;
优选的,所述的免疫佐剂分子的用量为0.1~10ug/ml。
5. 根据权利要求1-4任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂,其特征在于,所述的改造的肿瘤外泌体制剂中,
PEG-DSPE、免疫佐剂分子、肿瘤外泌体中的总蛋白三种成分的质量比为:100:0.1~5:2~50;
优选的,所述的PEG-DSPE、免疫佐剂分子、肿瘤外泌体中的总蛋白三种成分的质量比为:100:0.5~2:5~20。
6. 根据权利要求1-5任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂,其特征在于,所述的肿瘤外泌体来源于体外培养的肿瘤系或自肿瘤组织中分离的原代肿瘤细胞;
所述的肿瘤外泌体使用密度梯度离心、差速离心、体积排阻、免疫分离、聚合物沉淀法制备,或使用商品化的试剂盒制备。
7. 权利要求1-6任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂的制备方法,其包括如下步骤:
 - (1) 将PEG-DSPE和免疫佐剂分子混匀后去除溶剂,制成PEG-DSPE和免疫佐剂混合物;
 - (2) 向上述混合物中加入定量好的肿瘤外泌体溶液,常温下充分混匀即得所述改造的肿瘤外泌体制剂。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,还包括,
 - (3) 对所述改造的肿瘤外泌体制剂进行除菌过滤。
9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,
步骤(1)所述的制备不含溶剂成分的PEG-DSPE和免疫佐剂混合物的方法为,将PEG-DSPE和免疫佐剂分子溶于有机溶剂中并混匀,然后除去有机溶剂;
优选的,在惰性气体的保护下,使用减压蒸馏法,在低于70°C下去除有机溶剂。
10. 权利要求1-6任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂在制备抗肿瘤药物中的应用。
11. 权利要求1-6任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂在制备个体化抗肿瘤制剂中的应用;优选的,所述的个体化抗肿瘤制剂中,所述的肿瘤外泌体来自于需要接受个体化治疗的患者自体的肿瘤组织或肿瘤细胞。

12. 含有权利要求1-6任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂的药物或药物组合物。

13. 含有权利要求1-6任一所述的改造的肿瘤外泌体制剂的个体化药物制剂, 优选的, 所述的个体化药物制剂中, 所述的肿瘤外泌体来自于需要接受个体化治疗的患者自体的肿瘤组织或肿瘤细胞。

一种改造的外泌体制剂、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体的,涉及一种改造的外泌体制剂、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 进入肿瘤免疫治疗时代以来,多种免疫检查点抑制剂(包括抗体和小分子)、CAR-T细胞治疗和治疗性肿瘤疫苗进入临床试验,并在很多实体瘤和恶性血液癌症中发挥了显著的治疗作用。然而,患者的药物反应率和治愈率均处于较低的水平,而且在治疗过程中还时常产生原发性或继发性抵抗效性,削弱免疫治疗的效果。研究显示,有限的免疫治疗效果与肿瘤抗原的缺失或贫乏相关,同时肿瘤组织内部的免疫抑制性特征也是抑制免疫治疗发挥功效的一道障碍[1-3]。DC细胞是人体内专业的抗原呈递细胞,能够激活辅助T细胞,继而帮助CD8阳性T细胞活化,发挥抗肿瘤功效[4]。此外,DC还能通过辅助性T细胞或B细胞分泌抗体的方式强化NK细胞的抗肿瘤功能[5]。尽管DC疫苗(将DC细胞分离出来后,体外孵育肿瘤抗原,并促进其成熟,再回输到患者体内)在临床上体现出一些治疗优势,但是并非所有的患者都能很好的响应该疗法。究其原因,还是在肿瘤抗原的低免疫原性,免疫逃逸和肿瘤引起的免疫抑制等因素[6,7]。

[0003] 所有细胞,包括原核细胞和真核细胞均可以释放细胞外囊泡。细胞外囊泡中直径为40-160nm的被称为外泌体(平均直径100nm)。外泌体发源于细胞的内涵体,在分泌出细胞之前与各种细胞器进行相互作用,因此其内部含有多种细胞质及细胞器来源的内含物,包括DNA、RNA、脂类分子、代谢产物、细胞质和细胞膜上的各种蛋白质等等[8]。以往认为外泌体的功能是处理细胞废弃的物质,而近期的研究显示外泌体具有非常丰富的功能,而且不同细胞产生的外泌体携带不同的内容物,这种异质性直接导致外泌体功能导向性的差异[8]。

[0004] 肿瘤细胞分泌的外泌体(简称为“肿瘤外泌体”)能被应用于肿瘤的免疫治疗主要基于其自身的几个特点:首先,肿瘤外泌体携带了肿瘤细胞(分泌该外泌体的母细胞)自身的肿瘤抗原,能够激活肿瘤特异性T细胞,引起抗肿瘤免疫应答[9,10];其次,肿瘤外泌体表面携带大量组织相容性复合物(MHC-I和MHC-II),而这些分子是抗原肽结合所必须的结构性分子[11],同时能够避免产生免疫排斥反应;此外,肿瘤外泌体表面还有大量促进其与受体细胞结合并被吞噬的蛋白,例如MFGE8(milk fat globulin-E8),rab7, LAMP1(liposome-associated membrane protein 1),CD9,CD81,Annexin II,CD54和CD63[12-14];最后,肿瘤外泌体还具有结构稳定的特点,其双层脂膜能够保护其内含物免受各种核酸酶或者蛋白酶的侵扰,适用于小分子、核酸类药物的递送系统[15]。

[0005] 近年来已经有研究证实了肿瘤外泌体作为肿瘤治疗性疫苗的可行性,包括临床前模型[16]和临床试验[17]。肿瘤外泌体仅具备有限的免疫原性,但针对肿瘤微环境中其它免疫细胞类群会产生免疫抑制性,也会限制其效能的发挥。而且,肿瘤外泌体能够通过抑制凋亡、促进产生药物抗性、帮助肿瘤细胞扩散-迁移-定殖、促进血管新生、肿瘤免疫逃脱以

及免疫抑制等手段参与了肿瘤发生发展的各个阶段[8]。因此,单独使用肿瘤外泌体进行免疫治疗时,往往无法产生令人满意的抗肿瘤免疫活性,这也解释了为什么该疗法目前仍未在临床获批使用。

[0006] 为了解决上述问题,目前发展出很多针对分泌肿瘤外泌体的母细胞的改造策略,例如增加肿瘤外泌体的热休克蛋白含量,提供佐剂效果[18,19];增加某种肿瘤特异性抗原的表达量,以此增加肿瘤外泌体中肿瘤特异性抗原的丰度及免疫原性[20];添加超抗原到肿瘤外泌体中,利用超抗原与MHC II分子形成稳定复合物的特性,促进肿瘤外泌体对DC细胞的激活作用[21];通过在肿瘤细胞中高表达控制MHC II分子的转录因子CIITA,增加肿瘤外泌体上MHC II分子的丰度,提高抗原肽的呈递效率及有效的肿瘤抗原肽的丰度[22];整合一些病毒融合蛋白到肿瘤外泌体中,促进DC细胞对其的摄取量[23];肿瘤细胞中高表达细胞因子,增加肿瘤外泌体中细胞因子的含量以及肿瘤外泌体的免疫原性[24];肿瘤细胞中高表达一些对产生免疫抑制性有关基因具有负调控作用的miRNA,那么肿瘤外泌体也会包含这些miRNA,当这些肿瘤外泌体被免疫细胞摄取后将通过miRNA的机制避免产生很强的免疫抑制性,进而提升免疫原性[25]。

[0007] 此外,还有一种策略:通过将肿瘤外泌体在体外与DC共培养,将肿瘤特异性抗原交给DC来呈递,之后再以DC疫苗的形式来治疗肿瘤。这样可以避免游离的肿瘤外泌体引起的免疫抑制性以及激活更有效的免疫反应[7]。

[0008] 综上所述,由于携带大量肿瘤细胞的特异性抗原,肿瘤外泌体具有作为抗肿瘤疫苗开发的潜力,但是肿瘤外泌体能抑制肿瘤微环境,甚至引流淋巴结中免疫细胞功能的天然属性限制了它的临床转化应用。尽管提出了多种基于改造肿瘤细胞(分泌外泌体的母细胞)的策略,但是此类方案耗时长,价格昂贵且操作流程上难以统一,不便于在临床实践中的推广。

[0009] 基于此,提出本发明

[0010] [参考文献]

[0011] 1.M.Naseri,M.Bozorgmehr,M.Zoller,E.Ranaei Pirmardan,Z.Madjd,Tumor-derived exosomes:the next generation of promising cell-free vaccines in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 9,1779991(2020);published online EpubJun 16(10.1080/2162402X.2020.1779991).

[0012] 2.H.Zhang,J.Chen,Current status and future directions of cancer immunotherapy.*Journal of Cancer* 9,1773-1781(2018)10.7150/jca.24577).

[0013] 3.G.A.Rabinovich,D.Gabrilovich,E.M.Sotomayor,Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells.*Annual review of immunology* 25, 267-296 (2007)10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609).

[0014] 4.K.Palucka,J.Banchereau,Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines.*Immunity* 39, 38-48(2013);published online EpubJul 25(10.1016/j.immuni.2013.07.004).

[0015] 5.W.W.van Willigen,M.Bloemendal,W.R.Gerritsen,G.Schreibelt,I.J.M.de Vries,K.F.Bol, Dendritic Cell Cancer Therapy:Vaccinating the Right Patient at the Right Time.*Frontiers in immunology* 9,2265(2018)10.3389/fimmu.2018.02265).

- [0016] 6. B. Mastelic-Gavillet, K. Balint, C. Boudousquie, P. O. Gannon, L. E. Kandalaft, Personalized Dendritic Cell Vaccines—Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Frontiers in immunology* 10, (2019); published online Epub 2019-April-11 (10.3389/fimmu.2019.00766).
- [0017] 7. J. D. Elster, D. K. Krishnadas, K. G. Lucas, Dendritic cell vaccines: A review of recent developments and their potential pediatric application. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12, 2232-2239 (2016); published online Epub Sep (10.1080/21645515.2016.1179844).
- [0018] 8. R. Kalluri, V. S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367, (2020); published online Epub Feb 7 (10.1126/science.aau6977).
- [0019] 9. F. André, N. E. C. Schartz, N. Chaput, C. Flament, G. Raposo, S. Amigorena, E. Angevin, L. Zitvogel, Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20, A28-A31 (2002); published online Epub 2002/12/19/ ([https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00384-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00384-5)).
- [0020] 10. J. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Théry, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, L. Zitvogel, Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine* 7, 297-303 (2001); published online Epub 2001/03/01 (10.1038/85438).
- [0021] 11. J. Bauzá-Martinez, A. J. R. Heck, W. Wu, HLA-B and cysteinylated ligands distinguish the antigen presentation landscape of extracellular vesicles. *Commun Biol* 4, 825-825 (2021) 10.1038/s42003-021-02364-y).
- [0022] 12. J. M. Escola, M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, H. J. Geuze, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 20121-20127 (1998); published online Epub Aug 7 (10.1074/jbc.273.32.20121).
- [0023] 13. A. E. Morelli, A. T. Larregina, W. J. Shufesky, M. L. G. Sullivan, D. B. Stolz, G. D. Papworth, A. F. Zahorchak, A. J. Logar, Z. Wang, S. C. Watkins, L. D. Faló, Jr, A. W. Thomson, Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266 (2004) 10.1182/blood-2004-03-0824).
- [0024] 14. S. Hao, O. Bai, J. Yuan, M. Qureshi, J. Xiang, Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8+CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. *Cellular & molecular immunology* 3, 205-211 (2006); published online Epub Jun (
- [0025] 15. G. H. Nam, Y. Choi, G. B. Kim, S. Kim, S. A. Kim, I. S. Kim, Emerging Prospects of Exosomes for Cancer Treatment: From Conventional Therapy to Immunotherapy. *Advanced materials* 32, e2002440 (2020); published online Epub Dec

(10.1002/adma.202002440) .

[0026] 16.X.Gu,U.Erb,M.W.Büchler,M.Zöller.Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice.International journal of cancer 136,E74-84 (2015);published online EpubFeb 15(10.1002/ijc.29100) .

[0027] 17.F.Andre,N.E.Schartz,M.Movassagh,C.Flament,P.Pautier,P.Morice,C.Pomel,C.Lhomme, B.Escudier,T.Le Chevalier,T.Tursz,S.Amigorena,G.Raposo,E.Angevin,L.Zitvogel,Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes.Lancet(London,England)360,295-305(2002); published online EpubJul 27 (10.1016/s0140-6736(02)09552-1) .

[0028] 18.Y.Zeng,H.Feng,M.W.Graner,E.Katsanis,Tumor-derived,chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity.Blood 101,4485-4491 (2003)10.1182/blood-2002-10-3108) .

[0029] 19.H.Feng,Y.Zeng,L.Whitesell,E.Katsanis,Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity.Blood 97,3505-3512(2001);published online EpubJun 1 (10.1182/blood.v97.11.3505) .

[0030] 20.S.Nath,P.Mukherjee,MUC1:a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression.Trends in molecular medicine 20,332-342(2014);published online EpubJun (10.1016/j.molmed.2014.02.007) .

[0031] 21.F.Xiu,Z.Cai,Y.Yang,X.Wang,J.Wang,X.Cao,Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived exosomes.Journal of molecular medicine(Berlin,Germany)85,511-521(2007);published online EpubMay (10.1007/s00109-006-0154-1) .

[0032] 22.R.Meazza,A.Comes,A.M.Orengo,S.Ferrini,R.S.Accolla,Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells.European journal of immunology 33,1183-1192(2003); published online EpubMay(10.1002/eji.200323712) .

[0033] 23.V.V.Temchura,M.Tenbusch,G.Nchinda,G.Nabi,B.Tippler,M.Zelenyuk,O.Wildner,K. Uberla,S.Kuate,Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus.Vaccine 26,3662-3672(2008);published online EpubJul 4 (10.1016/j.vaccine.2008.04.069) .

[0034] 24.Y.Yang,F.Xiu,Z.Cai,J.Wang,Q.Wang,Y.Fu,X.Cao,Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2gene-modified tumor cells.Journal of cancer research and clinical oncology 133,389-399(2007); published online EpubJun(10.1007/s00432-006-0184-7) .

[0035] 25.S.Ohno,M.Takanashi,K.Sudo,S.Ueda,A.Ishikawa,N.Matsuyama,K.Fujita,T.Mizutani,T. Ohgi,T.Ochiya,N.Gotoh,M.Kuroda,Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells.Molecular

therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 21,185-191(2013); published online EpubJan(10.1038/mt.2012.180).

[0036] 26.Z.Liu,C.Zhou,Y.Qin,Z.Wang,L.Wang,X.Wei,Y.Zhou,Q.Li,H.Zhou,W.Wang,Y.-X.Fu,M. Zhu,W.Liang,Coordinating antigen cytosolic delivery and danger signaling to program potent cross-priming by micelle-based nanovaccine.Cel Discovery 3,17007(2017);published online Epub2017/04/04(10.1038/celldisc.2017.7).

发明内容

[0037] 本发明首先涉及一种改造的肿瘤外泌体制剂,所述的制剂包含:

[0038] (1) 浓度大于50ug/ml二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(PEG-DSPE);

[0039] (2) 蛋白浓度大于10ug/ml的肿瘤外泌体成分;

[0040] (3) 有效量的用于刺激免疫反应的免疫佐剂分子;

[0041] 所述的PEG-DSPE的纯度 $\geq 95\%$,其中的PEG链的分散度 ≤ 1.1 ;

[0042] 优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为1000~5000Da;更优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为1500~2500Da;最优选的,所述的PEG-DSPE分子中的PEG链长为2000Da(PEG2000-DSPE);

[0043] 所述的PEG-DSPE也可以使用其他类型的聚乙二醇化磷脂进行代替,具体的,

[0044] 聚乙二醇化磷脂结构中,

[0045] 磷脂部分的脂肪酸链包含的碳原子数为10~24个,脂肪酸链可以是饱和的,也可以是部分饱和的,优选为为月桂酸(12碳)、肉豆蔻酸(14碳)、棕榈酸(16碳)、硬脂酸或油酸或亚油酸(18碳)、廿酸(20碳)、山俞酸(22碳)、木焦油酸(lignocerate)(24碳);

[0046] 聚乙二醇化磷脂的磷脂部分可以是磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、二磷脂酰甘油、溶血磷脂胆碱(LPC)、溶血乙醇胺磷脂(LPE)等;优选为磷脂酰乙醇胺,尤其是二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺。

[0047] 所述的蛋白浓度指制剂中所有的肿瘤外泌体中所包含的蛋白浓度,优选的,使用BCA法对肿瘤外泌体的蛋白浓度进行定量;

[0048] 所述的免疫佐剂分子包括但不限于,MPLA(Monophosphoryl lipid A,单磷酰脂质A)、QS21(Quillaja saponaria,皂树皂苷)、PolyI:C(聚肌胞苷酸);优选为MPLA;

[0049] 优选的,所述的免疫佐剂分子的用量为0.1~10ug/ml。

[0050] 进一步的,所述的改造的肿瘤外泌体制剂中,PEG-DSPE、免疫佐剂分子、肿瘤外泌体中的总蛋白三种成分的质量比为:100:0.1~5:2~50;优选的,所述的PEG-DSPE、免疫佐剂分子、肿瘤外泌体中的总蛋白三种成分的质量比为:100:0.5~2:5~20。

[0051] 所述的肿瘤外泌体来源于体外培养的肿瘤系或自肿瘤组织中分离的原代肿瘤细胞;

[0052] 所述的肿瘤外泌体使用密度梯度离心、差速离心、体积排阻、免疫分离、聚合物沉淀法制备,或使用商品化的试剂盒制备;

[0053] 本发明还涉及所述的改造的肿瘤外泌体制剂的制备方法,其包括如下步骤:

[0054] (1) 制备不含溶剂成分的PEG-DSPE和免疫佐剂混合物;

[0055] (2) 向上述混合物中加入定量好的肿瘤外泌体溶液,常温下充分混匀即得所述改造的肿瘤外泌体制剂;

[0056] 以及可选的,

[0057] (3) 对所述改造的肿瘤外泌体制剂进行除菌过滤。

[0058] 优选的,步骤(1)所述的制备不含溶剂成分的PEG-DSPE和免疫佐剂混合物的方法为,将PEG-DSPE和免疫佐剂分子溶于有机溶剂中并混匀,然后除去有机溶剂;更优选的,在惰性气体的保护下,使用减压蒸馏法,在低于70℃下去除有机溶剂。

[0059] 本发明还涉及所述的改造的肿瘤外泌体制剂在制备药物中的应用,所述的药物是抗肿瘤药物。

[0060] 本发明还涉及所述的改造的肿瘤外泌体制剂在制备个体化抗肿瘤制剂中的应用;优选的,所述的个体化抗肿瘤制剂中,所述的肿瘤外泌体来自于需要接受个体化治疗的患者自体的肿瘤组织或肿瘤细胞。

[0061] 本发明还涉及含有所述的改造的肿瘤外泌体制剂的药物或药物组合物。

[0062] 本发明还涉及含有所述的改造的肿瘤外泌体制剂的个体化药物制剂,所述的个体化药物制剂中,所述的肿瘤外泌体来自于需要接受个体化治疗的患者自体的肿瘤组织或肿瘤细胞。

[0063] 本发明还涉及使用所述的改造的肿瘤外泌体制剂治疗肿瘤的应用;优选的,使用来自于患者自体的肿瘤组织或肿瘤细胞,制备所述的改造的肿瘤外泌体制剂。

[0064] 本发明的有益效果在于:

[0065] (1) 聚乙二醇化磷脂(PEG2000-DSPE,以下简称PP)改造的肿瘤外泌体与游离的肿瘤外泌体相比,入胞的途径也发生了改变,PP改造肿瘤外泌体能直接进入内质网(图6),便于引起更强的肿瘤抗原特异性T细胞应答(图7,8,9,10和11);而与此对应的,游离的肿瘤外泌体被DC细胞内吞之后,快速进入溶酶体,其所含抗原将由MHC II途径呈递[14,19,20]。

[0066] (2) 在野生型小鼠中,给予PP改造的肿瘤外泌体能引起肿瘤抗原特异性CTL反应,而且在荷瘤小鼠中PP改造的肿瘤外泌体同样展现出良好的抗肿瘤效应。

[0067] (3) PP改造的肿瘤外泌体还能改善肿瘤微环境中的免疫细胞浸润情况,增加DC、巨噬细胞、具有抗肿瘤活性的CD4⁺,CD8⁺T细胞的比例,为与其它抗肿瘤免疫治疗方案的联用奠定了良好的基础。

[0068] (4) 治疗方案具有一定普适性:只要使用的肿瘤外泌体来源于同样的组织来源,那么即使基因突变频率或特点不一致,也应具有一定的治疗效果。

[0069] (5) 针对个体特异性有很好的疗效:在体内免疫编辑的作用下,或者接受了能够引起基因突变的治疗方式,包括并不仅限于放射治疗、化疗、免疫治疗等之后,部分肿瘤组织来源的外泌体用于制备PP改造的肿瘤外泌体对剩余肿瘤组织具有治疗作用,甚至可以预防肿瘤的远端器官转移。

附图说明

[0070] 图1、不同表面活性剂对骨髓来源DC产生的细胞毒性【体外实验】。纵坐标显示经不

同表面活性剂处理48小时后DC细胞的活性(MTT法),横坐标显示不同表面活性剂的浓度。

[0071] 图2、PP改造的肿瘤外泌体的制备和表征。A、冷冻电子显微镜照片展示肿瘤外泌体(左图),缺乏MPLA对照品(中图)和PP改造的肿瘤外泌体(右图)的形貌特征;B、动态光散射结果展示肿瘤外泌体(黑色曲线)和PP改造的肿瘤外泌体(灰色曲线)的平均直径分布情况。

[0072] 图3、PP改造的肿瘤外泌体促进DC细胞对抗原的呈递能力【体外实验】。纵坐标显示经不同处理的DC细胞表面所呈递出的OVA蛋白特异性抗原肽(SIINFEKL)与MHC-I分子(H-2K^b)形成的复合体的数量——由平均荧光强度(MFI)表示。

[0073] 图4、PP改造的肿瘤外泌体增加DC细胞表面共刺激分子的表达水平【体外实验】。纵坐标显示经不同处理的DC细胞表面代表激活标志的共刺激分子CD80(左图)和CD86(右图)的表达量——由平均荧光强度(MFI)表示。

[0074] 图5、PP改造的肿瘤外泌体增加DC细胞分泌细胞因子的水平【体外实验】。纵坐标显示经不同处理的DC细胞培养上清中经ELISA法检测得到的TNF- α 、IL-2和IL-12的浓度(pg/ml),以及IFN- β 的实时定量PCR结果(相对于 β -actin管家基因的相对表达量)。

[0075] 图6、PP改造能改变肿瘤外泌体被DC细胞摄取后的路径【体外实验】。A、共聚焦显微镜照片展示PKH-67标记的肿瘤外泌体(EXO)或PP改造的肿瘤外泌体(PP/EXO)(绿色-Green)分别与DC2.4细胞内的溶酶体(Lysosome)(左侧)以及内质网(ER)(红色-Red)的共定位情况;B、共聚焦显微镜照片展示CFSE标记的肿瘤外泌体(EXO)或PP改造的肿瘤外泌体(PP/EXO)(绿色-Green)分别与DC2.4细胞内的溶酶体(Lysosome)(左侧)以及内质网(ER)(红色-Red)的共定位情况。

[0076] 图7、PP改造的肿瘤外泌体促进抗原特异性OT I CD8⁺T细胞的增殖【体外实验】。纵坐标显示经不同处理的DC细胞激活OT I CD8⁺T细胞增殖的不同比例。

[0077] 图8、PP改造的肿瘤外泌体引起强烈抗原特异性的CTL反应——小鼠结肠癌模型(MC38)【体内实验】。经不同组别的外泌体免疫后的小鼠淋巴结T细胞经肿瘤特异性抗原肽(Rp118,Reps-1和Adpgk)体外再刺激产生的IFN- γ 斑点(ELISpot实验)的照片(左图)和IFN- γ 斑点的计数统计结果(右图)。

[0078] 图9、PP改造的肿瘤外泌体引起强烈抗原特异性的CTL反应——小鼠黑色素瘤模型(B16F10)【体内实验】。经不同组别的外泌体免疫后的小鼠淋巴结T细胞经肿瘤特异性抗原肽(Trp-2)体外再刺激产生的IFN- γ 斑点(ELISpot实验)的照片(左图)和IFN- γ 斑点的计数统计结果(右图)。

[0079] 图10、PP改造的肿瘤外泌体引起强烈抗原特异性的CTL反应——小鼠三阴性乳腺癌模型(4T1)【体内实验】。经不同组别的外泌体免疫后的小鼠淋巴结T细胞经肿瘤特异性抗原肽(Sptbn和Wdr33)体外再刺激产生的IFN- γ 斑点(ELISpot实验)的照片(左图)和IFN- γ 斑点的计数统计结果(右图)。

[0080] 图11、PP改造的肿瘤外泌体引起强烈抗原特异性的CTL反应——小鼠宫颈癌模型(TC-1,带有HPV病毒抗原E6、E7)【体内实验】。经不同组别的外泌体免疫后的小鼠淋巴结T细胞经肿瘤特异性抗原肽(E7-20)体外再刺激产生的IFN- γ 斑点(ELISpot实验)的照片(左图)和IFN- γ 斑点的计数统计结果(右图)。

[0081] 图12、PP改造的肿瘤外泌体的抗肿瘤作用——小鼠结肠癌模型(MC38)【体内实

【体内实验】。小鼠接瘤后经不同组别的外泌体治疗,肿瘤生长曲线(左图)和小鼠生存期(右图)。

[0082] 图13、PP改造的肿瘤外泌体的抗肿瘤作用——小鼠黑色素瘤模型(B16F10)【体内实验】。小鼠接瘤后经不同组别的外泌体治疗,肿瘤生长曲线(左图)和小鼠生存期(右图)。

[0083] 图14、PP改造的肿瘤外泌体的抗肿瘤作用——小鼠宫颈癌模型(TC-1,带有HPV病毒抗原E7)【体内实验】。小鼠接瘤后经不同组别的外泌体治疗,肿瘤生长曲线。

[0084] 图15、PP改造的肿瘤外泌体的抗肿瘤转移作用——小鼠黑色素瘤模型(B16F10)【体内实验】。经不同组别的外泌体提前免疫后,小鼠经尾静脉接瘤,13天后观察小鼠肺部黑色素瘤细胞形成的转移结节的代表性照片(A)及统计数据(B)。

[0085] 图16、PP改造的肿瘤外泌体增强抗肿瘤相关免疫细胞的浸润——小鼠黑色素瘤模型(B16F10)【体内实验】。

[0086] 图17、PP改造的肿瘤外泌体制备技术模拟实现个体化肿瘤治疗——小鼠结肠癌模型(MC38)【体内实验】。A、实验流程示意图;B、肿瘤生长曲线。

具体实施方式

[0087] 小鼠模型:

[0088] OTI转基因小鼠模型:该小鼠模型的特点是其CD8阳性T细胞的T细胞受体(TCR)经基因编辑,能特异性识别抗原呈递细胞表面MHC-I/OVA₂₅₇₋₂₆₄(SIINFEKL)抗原复合物,并被特异性激活,增殖。

[0089] 实施例一、不同表面活性剂对骨髓来源DC细胞(树突状细胞)的毒性

[0090] 细胞培养及处理方法:

[0091] 骨髓来源DC的获取:

[0092] 取6-8周龄C57BL/6小鼠,解剖获取长骨和胫骨,将骨髓吹出,ACK 2ml处理1分钟裂解红细胞,无血清培养基中和后离心,重悬获得小鼠骨髓细胞悬液,以 3×10^6 细胞/皿种于10cm培养皿中。完全培养基(含10% FBS、50 μ M巯基乙醇的RPMI 1640)加入20ng/ml重组小鼠源GM-CSF培养(按第0天计算)。第3天补加10ml完全培养基(含20ng/ml重组小鼠源GM-CSF)。培养至第6天,收集未贴壁细胞作为未成熟的骨髓来源DC细胞。经流式鉴定CD11c⁺的DC细胞纯度达90%以上,可用于后续实验。

[0093] 实验方案:不同表面活性剂对骨髓来源DC产生的细胞毒性

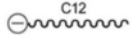


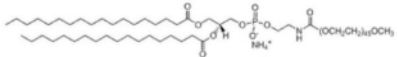
[0094] 为了打破肿瘤外泌体的脂质囊泡结构,需要引入表面活性剂。但是,表面活性剂(表一)具有破坏细胞膜的作用,鉴于我们的目的是将改造后的肿瘤外泌体用于肿瘤个性化疫苗的研究和应用,而作为疫苗的首要条件就是需要安全。因此,我们接下来利用MTT实验考察了这些表面活性剂是否能够对骨髓来源的DC细胞产生细胞毒性。

[0095] 小鼠骨髓来源的DC细胞以30万/孔铺于96孔板中,加入不同浓度的SDS、TritonX-100、Tween80和PEG2000-DSPE(PP)溶液。37 $^{\circ}$ C培养24h后,向孔中加入20 μ l的5mg/ml的MTT溶液,继续培养6h。之后加入MTT裂解液,吹打混匀后,放入酶标仪中检测其在570nm和630nm(参比波长)处的吸收值。

[0096] 结果如图1所示:首先,所有剂量的PEG2000-DSPE对DC细胞基本没有产生毒性,但SDS和TritonX-100在25 μ g/ml时便对细胞产生了巨大的细胞毒性。Tween80在浓度超过50 μ g/ml时对细胞液开始产生毒性。

[0097] 以上结果说明,从安全性角度出发PEG2000-DSPE是最佳选择。而Tween80需要控制在安全用量(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以下,SDS和TritonX-100则由于细胞毒性太大,不适用于肿瘤外泌体的改造。

[0098] 表1、不同表面活性剂的基本信息

表面活性剂名称	结构	分子量(Da)
SDS (sodium dodecyl sulfate)		288
[0099] Triton X-100		625
Tween 80		1320
PEG2000-DSPE		2800

[0100] 实施例二、PP改造的肿瘤外泌体的制备和表征

[0101] 细胞培养及处理方法

[0102] 小鼠结肠癌模型MC38细胞系的培养:使用DMEM培养基(含10%胎牛血清)。将MC38肿瘤细胞冻存管从液氮保存罐中取出,立即放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中快速溶解,然后将细胞悬液移入含10ml培养基的离心桶中,350g离心5分钟后去除上清,用新鲜培养基重悬后,将细胞转移到细胞培养瓶中,加入10-15ml培养基混悬沉淀细胞,调整细胞浓度后,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中,每天观察细胞状态并及时更换新鲜培养基。

[0103] (1) 接瘤:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:3的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 待用。每只小鼠皮下接瘤 2.5×10^5 细胞。

[0104] (2) 收集肿瘤外泌体(EXO)实验:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:3的比例进行传代培养。传代培养时,换用含有10%无外泌体的胎牛血清的培养基继续培养,48小时后,收取上清,直接用于外泌体提取或者冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

[0105] 肿瘤外泌体(EXO)的获取

[0106] 肿瘤细胞培养在含有10%已去除外泌体的胎牛血清(血清经100,000g,2小时离心后保留上清部分)的培养基中48小时后,收集细胞培养上清。

[0107] (1) 4000rpm离心2小时去除上清中的细胞碎片。

[0108] (2) 利用100kDa的超滤管以4000rpm、30分钟/次的速度收集上清中大于100kDa的组份。

[0109] (3) 收集的组份以5:1(v:v)加入外泌体提取试剂(EXOTC10A-1,SBI),充分混合后4 $^{\circ}\text{C}$ 放置至少12小时。

[0110] (4) 待12小时后沉淀出现,3000rpm离心30分钟,分离出沉淀物,即为粗提外泌体。使用的PBS重悬后,经BCA法测定蛋白质浓度,并以此标定外泌体的含量,分装后置于-80 $^{\circ}\text{C}$

保存,备用。

[0111] (5) 密度梯度离心:将粗体外泌体置于10%、20%、40%、60%的不连续密度梯度蔗糖溶液中,进行2 小时的超速离心(100,000g),之后小心吸取位于10-20%层的白色物质,用PBS稀释后再次超速离心将外泌体沉淀于底部,即为精提外泌体。使用适量PBS重悬后,经BCA法测定蛋白质浓度,并以此标定外泌体的含量,-80℃保存备用。

[0112] 以下各组实施例中:除电子显微镜实验和动态光散射实验使用精提外泌体之外,其它实验均使用粗提外泌体。后续文中将统一称为肿瘤外泌体(EXO)。

[0113] 聚乙二醇化磷脂(PP)改造的肿瘤外泌体的制备(以小鼠结肠癌MC38细胞系分泌的外泌体为例):

[0114] (1) 将已经通过BCA蛋白法定量的肿瘤外泌体,用无菌水稀释成500ug/ml的肿瘤外泌体(EXO)储液;

[0115] (2) 将MPLA粉末溶解于甲醇/氯仿(1:2,v:v)混合溶液中,配制成浓度为1mg/ml的MPLA储液;

[0116] (3) 称取15mg PP粉末加入3ml氯仿溶解,配制成浓度为5mg/ml的PP储液;

[0117] (4) 按照表2-1的处方制备10ml PP改造的肿瘤外泌体(简称为PP/MPLA/EXO),具体步骤如下:

[0118] a) 取1ml PP储液,50ul MPLA储液混合均匀;

[0119] b) 使用氮气吹干的方法,除去有机溶剂;

[0120] c) 加入1ml EXO储液,充分混匀,获得无色透明的PP改造的肿瘤外泌体溶液;

[0121] d) 经0.22um滤膜过滤除菌。

[0122] 使用前用无菌水稀释10倍,制成总体积为10ml,蛋白含量为50ug/ml EXO浓度的PP改造的肿瘤外泌体溶液。

[0123] 表2-1:PP改造的肿瘤外泌体处方

PEG2000-DSPE储液浓度	MPLA储液浓度	肿瘤外泌体(EXO)储液浓度
5000ug/ml	50ug/ml	500ug/ml

[0125] 成分缺失对照品的制备(以小鼠结肠癌MC38细胞系分泌的外泌体为例):

[0126] 完整的PP改造的肿瘤外泌体(PP/MPLA/EXO)由三个成分组成,功能实验中需要成分缺失的对照,包括缺失MPLA和缺失聚乙二醇化磷脂(PP)的对照品。

[0127] (1) 无MPLA对照品(简称为PP/EXO)的制备:

[0128] a) 将已经通过BCA蛋白法定量的肿瘤外泌体,用无菌水稀释成500ug/ml的肿瘤外泌体(EXO)储液;

[0129] b) 称取15mg PP粉末加入3ml氯仿溶解,配制成浓度为5mg/ml的PP储液;

[0130] c) 按照表2-2的处方制备10ml无MPLA对照品(简称为PP/EXO),具体步骤参考上述PP改造的肿瘤外泌体(PP/MPLA/EXO)的制备。

[0131] 表2-2:无MPLA对照品(简称为PP/EXO)处方

PP储液浓度	肿瘤外泌体(EXO)储液浓度
5000ug/ml	500ug/ml

[0133] 使用前用无菌水稀释10倍制成总体积为10ml,蛋白含量为50ug/ml EXO浓度的无MPLA的对照品(简称为PP/EXO)溶液。

[0134] (2) 无PP对照品 (简称MPLA/EXO) 的制备:

[0135] 将MPLA粉末溶解于甲醇/氯仿 (1:2, v:v) 混合溶液中, 配制成浓度为1mg/ml的MPLA储液;

[0136] 按照表2-3的处方将50u1 MPLA储液和1ml EXO储液进行物理混合制备10ml无PP对照品 (简称 MPLA/EXO)。

[0137] 表2-3: 无PP对照品 (简称MPLA/EXO) 处方

[0138]	MPLA储液浓度	肿瘤外泌体 (EXO) 储液浓度
	50ug/ml	500ug/ml

[0139] 使用前用无菌水稀释10倍, 制成总体积为10ml, 蛋白含量为50ug/ml EXO浓度的无PP对照品 (简称 为MPLA/EXO) 溶液。

[0140] 实验方案 (一) 冷冻电镜观察PP改造的肿瘤外泌体的形态表征

[0141] (1) 按照前述方法制备PP改造的肿瘤外泌体;

[0142] (2) 实验共分为3组, 分别为:

[0143] a) 肿瘤外泌体组 (EXO)

[0144] b) PP改造的肿瘤外泌体组 (PP/MPLA/EXO)

[0145] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0146] (3) 冷冻电镜样品制备: 将2.5 μ l样品加载到H₂/O₂辉光放电预处理30秒的碳网格 (Quantifoil 300目, R1.2/1.3) 上。在23°C和95%湿度下, 使用Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) 将多余样品在2级力下用 滤纸吸附6秒, 之后迅速放入液体乙烷中快速冷冻, 转移到液氮中储存;

[0147] (4) 将铜网置于透射电子显微镜 (Talos L120C 120kV) 下观察;

[0148] 实验结果显示, 肿瘤外泌体的平均直径在100nm左右, 符合文献报道的外泌体直径分布范围 (30-150 nm)。而PP改造的肿瘤外泌体直径在10-20nm左右 (图2A), 说明经过PP改造的肿瘤外泌体会变得更小且 更均匀。同时, 我们发现PP/EXO组和PP/MPLA/EXO组之间的样品形态并未表现出很大的差别, 因此MPLA 不影响聚乙二醇化磷脂对肿瘤外泌体结构上的改造。

[0149] 实验方案 (二) PP改造的肿瘤外泌体的动态光散射结果

[0150] (1) 按照前述方法制备PP改造的肿瘤外泌体;

[0151] (2) 实验共分为2组, 分别为:

[0152] a) 肿瘤外泌体组 (EXO)

[0153] b) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0154] (3) 用水将各组样品稀释后置于纳米粒度电位仪 (Zetasizer Nano ZS) 中进行检测。

[0155] (4) 实验结果显示, 肿瘤外泌体的粒径分布在50-200nm范围内, 与文献报道的外泌体直径范围 (30-150nm) 基本一致。鉴于MPLA不影响聚乙二醇化磷脂对肿瘤外泌体结构上的改造, 动态光散射实验 仅采用无MPLA对照品 (PP/EXO) 进行测试, 结果显示PP/EXO组的平均粒径分布在10nm附近 (图2B), 进一步映证了冷冻电镜的结果。

[0156] 实验方案 (三) PP改造的肿瘤外泌体稳定性 (4°C保存一个月)

[0157] (1) 按照前述方法制备PP改造的肿瘤外泌体以及单一成分缺省对照组;

- [0158] (2) 实验共分为3组,分别为:
- [0159] a) 无MPLA对照组 (PP/EXO)
- [0160] b) 无PP对照组 (MPLA/EXO)
- [0161] c) PP改造的肿瘤外泌体 (PP/MPLA/EXO)
- [0162] (4) 将各组样品放入4℃冰箱保存一个月,并于保存前和保存后进行拍照观察;
- [0163] (5) 实验结果显示,经过一个月的放置,各组均未出现溶液变浑浊的现象,说明该处方制备的PP改造的肿瘤外泌体性质基本稳定,在4℃的保存条件下,一个月之内不会变质。
- [0164] 实施例三、PP改造的肿瘤外泌体增强骨髓来源DC细胞(树突状细胞)的功能
- [0165] 细胞培养及处理方法:
- [0166] 骨髓来源DC的获取可参考实施例一。
- [0167] 肿瘤外泌体(EXO)的获取,PP改造的肿瘤外泌体(MC38来源)及相应对照品的制备同实施例二。
- [0168] 实验方案(一):PP改造的肿瘤外泌体促进DC细胞对抗原的呈递能力
- [0169] (1) 使用含有50ug/ml的肿瘤外泌体(以BCA蛋白定量)及PP改造的肿瘤外泌体处理骨髓来源的DC细胞,同时加入0.5mg/ml OVA全长蛋白的PBS溶液,24小时后,使用PE标记的抗小鼠的MHC I-SIINFEKL 抗原复合物(简称p-MHC I)的荧光抗体进行流式细胞术检测,考察各处理组中DC细胞该荧光的强度,以指示抗原-MHC-I复合物在细胞表面的数量。
- [0170] (2) 实验共分为5个处理组,分别为:
- [0171] a) 不处理组 (CTR)
- [0172] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)
- [0173] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)
- [0174] d) 无PP对照组 (MPLA/EXO)
- [0175] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)
- [0176] (3) 结果显示:
- [0177] 单独肿瘤外泌体组,无MPLA对照组,无PP对照组与不处理组类似,p-MHC I的水平并未改变;
- [0178] PP改造的肿瘤外泌体处理组的p-MHC I水平发生了显著升高(图3),说明PP改造的肿瘤外泌体能提升DC细胞对于抗原的处理和呈递能力。
- [0179] 实验方案(二):PP改造的肿瘤外泌体增加DC细胞表面共刺激分子的表达水平
- [0180] (1) 使用含有50ug/ml的肿瘤外泌体(以BCA蛋白定量)及PP改造的肿瘤外泌体处理骨髓来源的DC细胞,12小时后,使用荧光抗体检测DC细胞表面代表成熟的分子标记物,CD80和CD86的表达水平。
- [0181] (2) 实验共分为5个处理组,分别为:
- [0182] a) 不处理组 (CTR)
- [0183] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)
- [0184] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)
- [0185] d) 无PP对照组 (MPLA/EXO)
- [0186] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)

[0187] (3)结果显示:

[0188] 单独肿瘤外泌体组,无MPLA对照组,无PP对照组与不处理组类似,CD80和CD86的表达水平并未改变;

[0189] PP改造的肿瘤外泌体处理组能显著升高这两个分子标记物的表达水平(图4),说明PP改造的肿瘤外泌体能促进DC细胞的成熟,更好的执行免疫功能。

[0190] 实验方案(三):PP改造的肿瘤外泌体增加DC细胞分泌细胞因子的水平

[0191] (1)使用含有50ug/ml的肿瘤外泌体(以BCA蛋白定量)及PP改造的肿瘤外泌体处理骨髓来源的DC细胞,分别于2小时,24小时后,收集细胞培养上清,利用ELISA和q-RT-PCR的方法考察各处理组中DC细胞分泌TNF- α , IL-2、IL-12的分泌水平以及干扰素IFN- β 的表达情况。

[0192] (2)实验共分为5个处理组,分别为

[0193] a) 不处理组(CTR)

[0194] b) 肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0195] c) 无MPLA对照组(PP/EXO)

[0196] d) 无PP对照组(MPLA/EXO)

[0197] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0198] (3)结果显示:

[0199] 单独肿瘤外泌体组,无MPLA对照组和无PP对照组,与不处理组类似,TNF- α , IL-2、IL-12的分泌水平没有任何改变。仅无PP对照组的TNF- α 的分泌水平略有升高,可能与MPLA自身的作用有关;

[0200] PP改造的肿瘤外泌体处理组能显著提升DC细胞分泌TNF- α , IL-2、IL-12的水平(图5)。同时,一型干扰素IFN- β 的表达趋势也一样。这些结果说明,PP改造的肿瘤外泌体能使DC细胞分泌大量激活抗肿瘤免疫反应的细胞因子,帮助DC细胞活化下游的T细胞。

[0201] 实施例四、PP改造肿瘤外泌体将其内容物递送至DC细胞的内质网(ER)

[0202] 细胞培养及处理方法:

[0203] MC38细胞系来源的肿瘤外泌体(EXO)的获取和PP改造肿瘤外泌体及相应对照品的制备同实施例二。

[0204] DC2.4细胞的培养:使用RPMI1640培养基(含10%胎牛血清,1 \times L-谷氨酰胺,1 \times 必需氨基酸溶液,1 \times HEPES缓冲液和5 μ M β -巯基乙醇)。将肿瘤细胞冻存管从液氮保存罐中取出,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中快速溶解,然后将细胞悬液移入含10ml培养基的离心桶中,350g离心5分钟后去除上清,用新鲜培养基重悬后,将细胞转移到细胞培养瓶中,加入10-15ml培养基混悬沉淀细胞,调整细胞浓度后,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中,每天观察细胞状态并及时更换新鲜培养基。

[0205] 实验方案(一):标记外泌体膜的方式考察PP改造的肿瘤外泌体进入DC2.4细胞后的路径

[0206] (1)PKH67标记肿瘤外泌体的膜成分:取8管新鲜提取的肿瘤外泌体(以BCA法定量,每管约含有9mg肿瘤外泌体),向每个EP管中加入350 μ l试剂盒配备的稀释液,轻轻吹打,使外泌体形成溶液。之后在避光条件下,再准备8个装有350 μ l稀释液的EP管,每管加入1.5 μ l PKH67染料,混合均匀。之后将含有PKH67染料的稀释液按照体积比1:1加入到含有肿瘤外

泌体溶液的EP管中,轻轻吹打混匀。室温(25℃)染色5分钟。再加入400u1无外泌体的胎牛血清,中和1分钟。之后,将染色完成的外泌体转移到新的BECKMAN 1.5 ml管中(#357448)。将8个EP管配平后,置于超高速离心机中,100,000g,室温(25℃)离心25分钟后,弃去上清,用1ml PBS洗一遍后,再次离心(条件与之前保持一致)并弃去上清。每2个EP管加入100u1无菌水溶解合为1管肿瘤外泌体溶液(经再次BCA定量,约12mg,即溶液浓度为120mg/ml)。PKH67标记成功的肿瘤外泌体溶液4℃避光保存。

[0207] (2) 制备PKH67标记的PP改造的肿瘤外泌体:参照实施例1的处方配制,区别在于使用的外泌体为本实施例前述步骤(1)中的PKH67标记的外泌体;

[0208] (3) 处理DC2.4细胞:将DC2.4细胞以 1×10^5 /孔种于15mm共聚焦显微镜用细胞培养小皿,过夜待细胞贴壁。第二天,用配制好的PKH67标记的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体处理DC2.4细胞,之后,按照设定时间分别加入100nM Lyso-Tracker-Red (37℃,10分钟)或1uM ER-Tracker-Red (37℃,30分钟)染料对细胞的溶酶体和内质网进行染色,最终外泌体处理时间保持在1小时。上机前,将培养基换为无荧光染料培养基,之后用荧光共聚焦显微镜观察;

[0209] (4) 实验共分为4组,分别为:

[0210] a) 肿瘤外泌体(绿色)与溶酶体(红色)共定位组

[0211] b) 肿瘤外泌体(绿色)与内质网(红色)共定位组

[0212] c) PP改造的肿瘤外泌体(绿色)与溶酶体(红色)共定位组

[0213] d) PP改造的肿瘤外泌体(绿色)与内质网(红色)共定位组

[0214] (5) 实验结果显示:

[0215] 经过1小时的处理,肿瘤外泌体主要与溶酶体共定位,而PP改造的肿瘤外泌体则主要与内质网共定位(图6A),初步说明PP的改造能够改变肿瘤外泌体的细胞内目的地。但是鉴于PKH67标记的是肿瘤外泌体的膜结构,因此无法确定PP改造的肿瘤外泌体的内容物(特别是抗原)的确能够到达内质网。为了解决这个问题,我们进一步使用能够标记蛋白的CFSE染料来标记肿瘤外泌体的内含物,仍然通过荧光共聚焦显微镜观察其与溶酶体和内质网的共定位情况。

[0216] 实验方案(二):标记外泌体蛋白的方式考察PP改造的肿瘤外泌体进入DC2.4细胞后的路径

[0217] (1) CFSE标记肿瘤外泌体的蛋白成分:吸取20mg肿瘤外泌体储液(基于BCA蛋白定量)于1.5ml EP管中,加入PBS调整体积至500u1,加入2u1 10mM CFSE储液(使终浓度达到4uM),室温避光染色10分钟。之后加入500u1含20% FBS的PBS中和反应,转移到超速离心管中,100,000g,4度离心30min。弃上清,沉淀用PBS洗一遍后,用适量PBS重悬,BCA定量后,-80℃保存,备用。

[0218] (2) 制备CFSE标记的PP改造的肿瘤外泌体:参照实施例1的处方配制,区别在于使用的外泌体为本实施例前述步骤(1)中的CFSE标记的外泌体;

[0219] (3) 处理DC2.4细胞:将DC2.4细胞以 1×10^5 /孔种于15mm共聚焦显微镜用细胞培养小皿,过夜待细胞贴壁。第二天,用配制好的PKH67标记的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体处理DC2.4细胞,之后,按照设定时间分别加入100nM Lyso-Tracker-Red (37℃,10分钟)或1uM ER-Tracker-Red (37℃,30分钟)染料对细胞的溶酶体和内质网进行染色,最终外泌

体处理时间保持在1小时。上机前,将培养基换为 无荧光染料的培养基,之后用荧光共聚焦显微镜观察;

[0220] (4) 实验共分为4组,分别为:

[0221] a) 肿瘤外泌体 (绿色) 与溶酶体 (红色) 共定位组

[0222] b) 肿瘤外泌体 (绿色) 与内质网 (红色) 共定位组

[0223] c) PP改造的肿瘤外泌体 (绿色) 与溶酶体 (红色) 共定位组

[0224] d) PP改造的肿瘤外泌体 (绿色) 与内质网 (红色) 共定位组

[0225] (5) 实验结果显示:

[0226] 经过1小时的处理,与PKH67标记类似,CFSE标记的肿瘤外泌体主要与溶酶体共定位,而PP改造的 CFSE标记的肿瘤外泌体则主要与内质网共定位(图6B)。充分说明经过PP改造,肿瘤外泌体内包含的蛋白 分子(特别是其携带的抗原分子)能够到达内质网,为肿瘤特异性抗原的MHC I型呈递途径提供了前提条件。

[0227] 实施例五、PP改造的肿瘤外泌体增强骨髓来源DC对抗原特异性OT I CD8⁺T细胞的激活作用

[0228] 细胞培养及处理方法:

[0229] 骨髓来源DC的获取、MC38细胞系来源的肿瘤外泌体 (EXO) 的获取,PP改造的肿瘤外泌体及相应对 照品的制备参考实施例二和实施例三。

[0230] OT I CD8⁺T细胞的获取:OT I转基因小鼠处死后,取脾脏细胞,裂解红细胞,之后用CD8磁珠(Invitrogen 公司)分离CD8⁺T细胞。

[0231] 实验方案:

[0232] (1) 使用含有50ug/ml的肿瘤外泌体 (以BCA蛋白定量) 及PP改造的肿瘤外泌体处理骨髓来源的DC 细胞,24小时后,再加入0.5mg/ml OVA全长蛋白PBS溶液。再24小时后,收集各处理组的DC细胞,经计 数后与CFSE染色的OT I CD8⁺T细胞以1:8的比例共培养,72小时后检测T细胞的增殖水平 (CFSE稀释情 况)。

[0233] (2) 实验共分为5组,分别为

[0234] a) 不处理组 (CTR)

[0235] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)

[0236] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0237] d) 无PP对照组 (MPLA/EXO)

[0238] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)

[0239] (3) 实验结果显示,

[0240] 不处理组的DC细胞能够很好的活化OT I CD8⁺T细胞,而且单独肿瘤外泌体处理组能显著抑制该活化 效应。

[0241] 相较于无MPLA对照组和无PP对照组,PP改造的肿瘤外泌体处理组并未抑制DC对T细胞的活化能力,反之,还有一定的促进作用(图7)。

[0242] 实施例六、PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应

[0243] 细胞培养及处理方法:

[0244] 肿瘤外泌体 (EXO) 的获取,PP改造的肿瘤外泌体及相应对照品的制备参考实施例二。

[0245] 小鼠结肠癌模型MC38细胞系和小鼠黑色素瘤B16F10细胞系的培养:使用DMEM培养基(含10%胎牛血清)。将肿瘤细胞冻存管从液氮保存罐中取出,立即放入37℃水浴中快速溶解,然后将细胞悬液移入含10ml培养基的离心桶中,350g离心5分钟后去除上清,用新鲜培养基重悬后,将细胞转移到细胞培养瓶中,加入10-15ml培养基混悬沉淀细胞,调整细胞浓度后,置于37℃、体积分数5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中,每天观察细胞状态并及时更换新鲜培养基。

[0246] 小鼠宫颈癌TC-1细胞系和小鼠三阴性乳腺癌4T1细胞系的培养:使用RPMI1640培养基(含10%胎牛血清)。将肿瘤细胞冻存管从液氮保存罐中取出,立即放入37℃水浴中快速溶解,然后将细胞悬液移入含10ml培养基的离心桶中,350g离心5分钟后去除上清,用新鲜培养基重悬后,将细胞转移到细胞培养瓶中,加入10-15ml培养基混悬沉淀细胞,调整细胞浓度后,置于37℃、体积分数5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中,每天观察细胞状态并及时更换新鲜培养基。

[0247] 实验方案(一):PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应(MC38细胞系)

[0248] (1)野生型小鼠分别经尾根部注射用来源于MC38的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应改造的肿瘤外泌体进行免疫。免疫注射后第7天,处死小鼠,手术取出近端淋巴结,研磨、消化后获得淋巴结中的所有免疫细胞。

[0249] 体外处理:在分离小鼠淋巴结细胞的前一天在Elispot板中预孵育anti-mouse IFN- γ 抗体,作用浓度为5 μ g/ml,4℃孵育过夜。次日弃去抗体,加入封闭液(含10%胎牛血清、1%青霉素链霉素和 β -巯基乙醇的RPMI 1640培养基)室温封闭2小时。随后将分离得到的小鼠淋巴结细胞按照 3×10^5 每孔加入板中,并孵育20 μ g/ml MC38特异性抗原肽(包括:Rpl-18,Reps-1和Adpgk) (Identification of a neo-epitope dominating endogenous CD8 T cell responses to MC-38colorectal cancer.9,1673125 (2019);published online EpubOct 13 (10.1080/2162402x.2019.1673125)),37℃培养箱培养48小时。48小时后弃培养液,加入去离子水裂解细胞,5分钟/次,共2次。用PBST(含0.05% Tween-20的1 \times PBS)溶液洗3遍,随后加入生物素标记的anti-mouse IFN- γ 抗体,室温孵育2小时。PBST溶液洗4遍,随后加入链亲和素标记的辣根过氧化物酶(streptavidin-HRP),室温孵育1小时。最后1 \times PBS洗3遍后加入AEC底物显色5-60分钟,加入去离子水终止反应,继续冲洗干净后将ELISpot板子吹干。

[0250] (2)实验共分为4组,分别为:

[0251] a) 肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0252] b) 无MPLA对照组(PP/EXO)

[0253] c) 无PP对照组(MPLA/EXO)

[0254] d) PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0255] (3)检测方法:ELISpot结果通过荧光酶斑点分析仪CTL analyzer LLC进行扫描和计数分析。

[0256] 结果显示,与肿瘤外泌体处理组相比,

[0257] 无MPLA组和无PP对照组均不能提高抗原特异性CTL反应,PP改造的肿瘤外泌体免疫后的淋巴结细胞中产生更高比例的抗原特异性CTL反应(具体表现为更强的IFN- γ 信

号) (图8)。

[0258] 实验方案(二):PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应(B16F10细胞系)

[0259] (1)野生型小鼠分别经尾根部注射用来源于B16F10的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体能引起同源 肿瘤抗原特异性CTL反应改造的肿瘤外泌体进行免疫。免疫注射后第7天,处死小鼠,手术取出近端淋巴结,研磨、消化后获得淋巴结中的所有免疫细胞。

[0260] 体外处理:同本实施例的实验方案(一)。其中,与淋巴结细胞孵育所用的B16F10特异性抗原肽为Trp2 (Exploiting the mutanome for tumor vaccination.Cancer Res 72,1081-1091(2012);published online EpubMar 1(10.1158/0008-5472.can-11-3722))。

[0261] (2)实验共分为2组,分别为:

[0262] a)肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0263] b)PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0264] 结果显示,与肿瘤外泌体处理组相比,PP改造的肿瘤外泌体免疫后的淋巴结细胞中产生更高比例的抗原特异性CTL反应(图9)。

[0265] 实验方案(三):PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应(细胞系4T1)

[0266] (1)野生型小鼠分别经尾根部注射用来源于4T1的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体进行免疫。免疫 注射后第7天,处死小鼠,手术取出近端淋巴结,研磨、消化后获得淋巴结中的所有免疫细胞。

[0267] 体外处理:同本实施例的实验方案(一)。其中,与淋巴结细胞孵育所用的4T1特异性抗原肽为Sptbn4 和Wdr33(Self-healing microcapsules synergetically modulate immunization microenvironments for potent cancer vaccination.6,eaay7735(2020);published online EpubMay(10.1126/sciadv.aay7735))。

[0268] (2)实验共分为4组,分别为:

[0269] a)肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0270] b)无MPLA对照组(PP/EXO)

[0271] c)无PP对照组(MPLA/EXO)

[0272] d)PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0273] 结果显示,与肿瘤外泌体处理组相比,

[0274] 无MPLA对照组和无PP对照组均不能提高抗原特异性CTL反应,PP改造的肿瘤外泌体免疫后的淋巴结细胞中产生更高比例的抗原特异性CTL反应(具体表现为更强的IFN- γ 信号)(图10)。

[0275] 实验方案(四):PP改造的肿瘤外泌体能引起同源肿瘤抗原特异性CTL反应(细胞系TC-1)

[0276] (1)野生型小鼠分别经尾根部注射用来源于TC-1的肿瘤外泌体或PP改造的肿瘤外泌体进行免疫。免 疫注射后第7天,处死小鼠,手术取出近端淋巴结,研磨、消化后获得淋巴结中的所有免疫细胞。

[0277] 体外处理:参考本实施例实验方案(一)。其中,与淋巴结细胞孵育所用的TC-1特异

性抗原肽为E7 (Coordinating antigen cytosolic delivery and danger signaling to program potent cross-priming by micelle-based nanovaccine. Cell Discovery 3, 17007 (2017); published online Epub2017/04/04(10.1038/celldisc.2017.7))。

[0278] (2) 实验共分为4组,分别为:

[0279] a) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)

[0280] b) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0281] c) 无PP对照组 (MPLA/EXO)

[0282] d) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)

[0283] 结果显示,与肿瘤外泌体免疫组相比,

[0284] 无MPLA对照组和无PP对照组均不能提高抗原特异性CTL反应,PP改造的肿瘤外泌体免疫后的淋巴结细胞能产生更高比例的抗原特异性CTL反应(具体表现为更强的IFN- γ 信号)(图11)。

[0285] 实施例七、PP改造的肿瘤外泌体抑制肿瘤生长并延长荷瘤小鼠的生存期

[0286] 细胞培养及处理方法:

[0287] 细胞培养方法参考实施例四,肿瘤外泌体 (EXO) 的获取和PP改造的肿瘤外泌体及相应对照品的制备 参考实施例二。

[0288] 实验方案(一):PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠结肠癌细胞系MC38)抑制肿瘤生长

[0289] (1) MC38模型的构建:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:3的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350 g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 2.5×10^6 /ml。利用1ml无菌注射器皮下接种雌性野生型C57BL/6小鼠,每只小鼠0.1ml(即每只小鼠接种 2.5×10^5 个MC38细胞)。约在4天左右可看到约30mm³的肿瘤形成,当日在肿瘤附近的皮下注射50ug/ml肿瘤外泌体(基于BCA蛋白定量)或者含有等质量的PP改造的肿瘤外泌体进行治疗,每周一次,共三次。之后,一直观察小鼠的状态,期间记录荷瘤小鼠的肿瘤体积变化和死亡情况。

[0290] (2) 实验组共有5组,分别为

[0291] a) PBS溶剂对照组 (CTR)

[0292] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)

[0293] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0294] d) 无PP对照组 (MPLA/EXO)

[0295] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)

[0296] 实验结果显示,与PBS溶剂对照组相比,无MPLA对照组以及无PP对照组均不能有效抑制肿瘤生长,PP改造的肿瘤外泌体能够显著延缓肿瘤的生长,并延长荷瘤小鼠的生存期(图12)。

[0297] 实验方案(二):PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠黑色素瘤细胞系B16F10)抑制肿瘤生长

[0298] (1) B16F10模型的构建:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:4的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化

后,用新鲜培养基中和胰酶,350g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 2.5×10^6 /ml。利用1ml无菌注射器皮下接种雌性野生型C57BL/6小鼠,每只小鼠0.1ml(即每只小鼠接种 2.5×10^5 个B16F10细胞)。注意每次吸取细胞悬液前将细胞混合均匀。约在4天左右可看到约 30mm^3 的肿瘤形成,当日在肿瘤附近的皮下注射50ug/ml肿瘤外泌体(基于BCA蛋白定量)或者含有等质量的PP改造的肿瘤外泌体进行治疗,每周一次,共三次。之后,一直观察小鼠的状态,期间记录荷瘤小鼠的肿瘤体积变化和死亡情况。

[0299] (2) 实验组共有3组,分别为

[0300] a) PBS溶剂对照组(CTR)

[0301] b) 肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0302] c) PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0303] 实验结果显示,与PBS溶剂对照组相比,肿瘤外泌体处理组不能有效抑制肿瘤生长,PP改造的肿瘤外泌体能够显著延缓肿瘤的生长,并延长荷瘤小鼠的生存期(图13)。

[0304] 实验方案(三):PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠宫颈癌细胞系TC-1)抑制肿瘤生长

[0305] (1) TC-1模型的构建:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:4的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 5×10^5 /ml。利用1ml无菌注射器皮下接种雌性野生型C57BL/6小鼠,每只小鼠0.1ml(即每只小鼠接种 5×10^4 个TC-1细胞)。注意每次吸取细胞悬液前将细胞混合均匀。约在6天左右可看到约 30mm^3 的肿瘤形成,当日在肿瘤附近的皮下注射50ug/ml肿瘤外泌体(基于BCA蛋白定量)或者含有等质量的PP改造的肿瘤外泌体进行治疗,每周一次,共三次。之后,一直观察小鼠的状态,期间记录荷瘤小鼠的肿瘤体积变化和死亡情况。

[0306] (2) 实验组共有5组,分别为

[0307] a) PBS溶剂对照组(CTR)

[0308] b) 肿瘤外泌体处理组(EXO)

[0309] c) 无MPLA对照组(PP/EXO)

[0310] d) 无PP对照组(MPLA/EXO)

[0311] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组(PP/MPLA/EXO)

[0312] 实验结果显示,与PBS溶剂对照组相比,无MPLA对照组和无PP对照组均不能有效抑制肿瘤生长,PP改造的肿瘤外泌体能够显著延缓肿瘤的生长(图14)。

[0313] 实施例八、PP改造的肿瘤外泌体抑制黑色素瘤的肺转移

[0314] 细胞培养及处理方法:

[0315] 细胞培养方法参考实施例四;肿瘤外泌体(EXO)的获取和PP改造的肿瘤外泌体及相应对照品的制备参考实施例二。

[0316] 实验方案:PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠黑色素瘤细胞系B16F10)抑制肿瘤的肺转移

[0317] (1) 制备PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠黑色素瘤细胞系B16F10),参考之前实施例二中的制备方法制备。在接瘤前,每只雌性野生型C57BL/6小鼠每次接受PBS(作为溶剂对照)、含有100ug的(以BCA蛋白定量计算)外泌体或者PP改造的肿瘤外泌体尾静脉注

射。每周一次,共三周。

[0318] (2) 小鼠黑色素瘤B16F10肺转移模型的构建:培养B16F10细胞生长,至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:4的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 5×10^4 /ml。利用1ml无菌注射器尾静脉注射到已接受过外泌体或者PP改造的肿瘤外泌体免疫的雌性野生型 C57BL/6小鼠体内,每只小鼠0.1ml (即每只小鼠接种 5×10^4 个B16F10细胞)。

[0319] (3) 实验共分为3组,分别为:

[0320] a) PBS溶剂对照组 (CTR)

[0321] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)

[0322] c) PP改造的肿瘤外泌体 (PP/MPLA/EXO)

[0323] 结果显示,无论肺部转移的器官照片还是肺部黑色素瘤转移结节数量的统计数据皆表明,接瘤后13天,与溶剂对照组对比,肿瘤外泌体具有促进黑色素瘤向肺组织转移的功能,而PP改造的肿瘤外泌体成功的抑制了黑色素瘤的肺转移(图15)。同时,依据该结果可合理推断,小鼠黑色素瘤分泌的外泌体本身容易富集到小鼠的肺部,使肺组织转变成免疫抑制性微环境,促进循环系统中的黑色素瘤细胞定殖,形成转移灶。而PP改造的肿瘤外泌体很有可能改变了免疫抑制性微环境,增强抗肿瘤免疫反应,进而降低黑色素瘤的转移。

[0324] 实施例九、PP改造的肿瘤外泌体改善黑色素瘤的免疫微环境

[0325] 细胞培养及处理方法:

[0326] 细胞培养方法参考实施例四;肿瘤外泌体 (EXO) 的获取和PP改造的肿瘤外泌体及相应对照品的制备 参考实施例二。

[0327] 实验方案:PP改造的肿瘤外泌体改善黑色素瘤的免疫微环境

[0328] (1) B16F10模型的构建:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:4的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 2.5×10^6 /ml。利用1ml无菌注射器皮下接种雌性野生型C57BL/6小鼠,每只小鼠0.1ml (即每只小鼠接种 2.5×10^5 个B16F10细胞)。注意每次吸取细胞悬液前将细胞混合均匀。约在4天左右可看到约 30mm^3 的肿瘤形成,当日在肿瘤附近的皮下注射50ug/ml肿瘤外泌体(基于BCA蛋白定量)或者含有等质量的PP改造的肿瘤外泌体进行治疗,每周一次,共三次。之后,一直观察小鼠的状态,期间记录荷瘤小鼠的肿瘤体积变化和死亡情况(图16A)。

[0329] (2) 实验组共有5组,分别为

[0330] a) PBS溶剂对照组 (CTR)

[0331] b) 肿瘤外泌体处理组 (EXO)

[0332] c) 无MPLA对照组 (PP/EXO)

[0333] d) 无PP对照组 (MPLA/EXO)

[0334] e) PP改造的肿瘤外泌体处理组 (PP/MPLA/EXO)

[0335] 实验结果显示,与PBS溶剂对照组相比,

[0336] 肿瘤外泌体处理,无MPLA对照和无PP对照均不能有效抑制肿瘤生长,

[0337] PP改造的肿瘤外泌体能够显著延缓肿瘤的生长(图16B和C)。

[0338] 另外,通过对肿瘤组织中各类免疫细胞表面标志物的流式检测发现,与PBS溶剂对照组相比,

[0339] 肿瘤外泌体,无MPLA对照和无PP对照对肿瘤组织中总的免疫细胞比例(CD45⁺细胞占比)(图16D)、CD8⁺T细胞占比(图16E)、CD4⁺T细胞占比(图16F)、DC细胞占比(图16G)、巨噬细胞占比(图16H)以及NK细胞占比(图16I)均无明显改变,

[0340] PP改造的肿瘤外泌体能够显著增加上述各类型免疫细胞的占比(图16D-I),说明肿瘤组织的免疫抑制性微环境得到改善,为免疫治疗发挥功能提供了先决条件。

[0341] 通过胞内细胞因子染色法考察具有肿瘤杀伤能力的CD8⁺T细胞的活性和功能指标发现,与PBS溶剂对照组相比,

[0342] 肿瘤外泌体,无MPLA对照和无PP对照处理后对肿瘤组织中CD8⁺T细胞胞内的Ki67(表征细胞增殖活力)(图16J),IFN- γ 和Granzyme B(表征T细胞的肿瘤杀伤能力)(图16K和L)具有一定的增强作用,

[0343] PP改造的肿瘤外泌体能够显著增加CD8⁺T细胞的增殖能力和肿瘤杀伤能力(图16J-L)。

[0344] 综上,PP改造的肿瘤外泌体能够显著增加各个类型的免疫细胞浸润,特别是具有增殖和肿瘤杀伤活力的CD8⁺T细胞,进而抑制肿瘤细胞的生长,达到治疗肿瘤的目的。

[0345] 实施例十、PP改造的肿瘤外泌体模拟个体化肿瘤治疗

[0346] 细胞培养及处理方法:

[0347] 细胞培养方法参考实施例四;肿瘤外泌体(EXO)的获取和PP改造的肿瘤外泌体的制备参考实施例二。

[0348] 实验方案:PP改造的肿瘤外泌体(来源于小鼠结肠癌细胞系MC38)模拟个体化肿瘤治疗

[0349] (1)MC38模型的构建:当细胞贴壁生长至90%汇合度时,用0.05%胰酶消化,按照1:3的比例进行传代培养。实验当天,将生长状态良好,汇合度达到90%的细胞胰酶消化后,用新鲜培养基中和胰酶,350 g离心,弃上清后加入无菌PBS重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为 2.5×10^6 /ml。利用1ml无菌注射器皮下接种雌性野生型C57BL/6小鼠,每只小鼠0.1ml(即每只小鼠接种 2.5×10^5 个MC38细胞)。

[0350] (2)待肿瘤生长到200mm³左右,手术剥离肿瘤组织,使用Tumor cell分离试剂盒将组织中的肿瘤细胞分选出来,继续培养。

[0351] (3)肿瘤细胞传代一定代数后,收集肿瘤细胞培养上清,并从中提取肿瘤外泌体。同时使用同批次肿瘤细胞用于新的肿瘤模型建立(具体方案参考本实施例实验方案(1)中所述)。

[0352] (4)接种新的肿瘤4天后,分别使用原始MC38细胞系所提取的外泌体和第(3)步所提取的肿瘤组织来源的外泌体制备PP改造的外泌体,对新的肿瘤模型进行治疗。(具体方案见图17A)

[0353] (5)实验组共有3组,分别为

[0354] a)PBS溶剂对照组(CTR)

[0355] b)PP改造的MC38细胞系外泌体处理组(PP/MPLA/EXO-MC38)

[0356] c)PP改造的肿瘤细胞外泌体处理组(PP/MPLA/EXO-Tumor)

[0357] 实验结果显示,与PBS溶剂对照组相比,

[0358] 无论肿瘤外泌体的来源于传代培养的细胞系还是原位分离的肿瘤组织中的肿瘤细胞,经PP改造的外泌体均显示出抑制肿瘤生长的能力(图17B)。更进一步的,相较于原初的MC38细胞系来源的外泌体,PP改造的原位分离的肿瘤组织中的肿瘤细胞外泌体具有更好的肿瘤生长抑制效果。

[0359] 肿瘤细胞内部基因的非同义突变将表达出变种蛋白,被免疫系统捕获并识别成外源物质,因此可作为肿瘤特异性抗原的来源。而且值得注意的是,产生肿瘤特异性抗原的概率与肿瘤细胞体细胞突变概率大致呈正相关。(Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* 2014;24:743-50.;Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity.*Cell.* 2015;160:48-61.)。MC38小鼠结肠癌细胞属于微卫星不稳定型癌种,其基因组具有高突变性特点,在一定的选择压力下,此特性将可能改变该细胞所产生的抗原谱 (Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution)。

[0360] 在本实施例中,具备完整免疫能力的小鼠也会对生长的肿瘤细胞进行免疫监视,将其能够识别的肿瘤细胞杀死,而生还的肿瘤细胞则因为基因突变变得具备抵抗免疫杀伤的能力,该过程也被称为免疫编辑。在基因组突变和免疫编辑压力的共同作用下,相信小鼠皮下原初的MC38肿瘤在生长过程中已经产生了一些由基因突变引起的新抗原。因此,从该肿瘤组织中分选、传代培养形成的“新”肿瘤细胞中存在产生新抗原的可能性。在此基础上,可以合理推断,新的肿瘤细胞外泌体与原始MC38外泌体在分享了大部分相同抗原的前提下,进一步携带了由基因突变获得的新抗原。所以,才体现出PP改造的MC38外泌体仍然具有一定的肿瘤抑制作用,而PP改造的肿瘤细胞外泌体具有更好的肿瘤生长抑制效果。

[0361] 综上,本发明利用PP分子对肿瘤外泌体进行结构改造,使其在保留原有肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原的同时,打破原初状态的外泌体免疫抑制的天然属性。PP改造后的肿瘤外泌体,具备引起抗原特异性CD8+T细胞反应的能力,有效降低荷瘤小鼠的肿瘤负荷,延长生存期。

[0362] 最后需要说明的是,以上实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不用于限定本发明的保护范围。

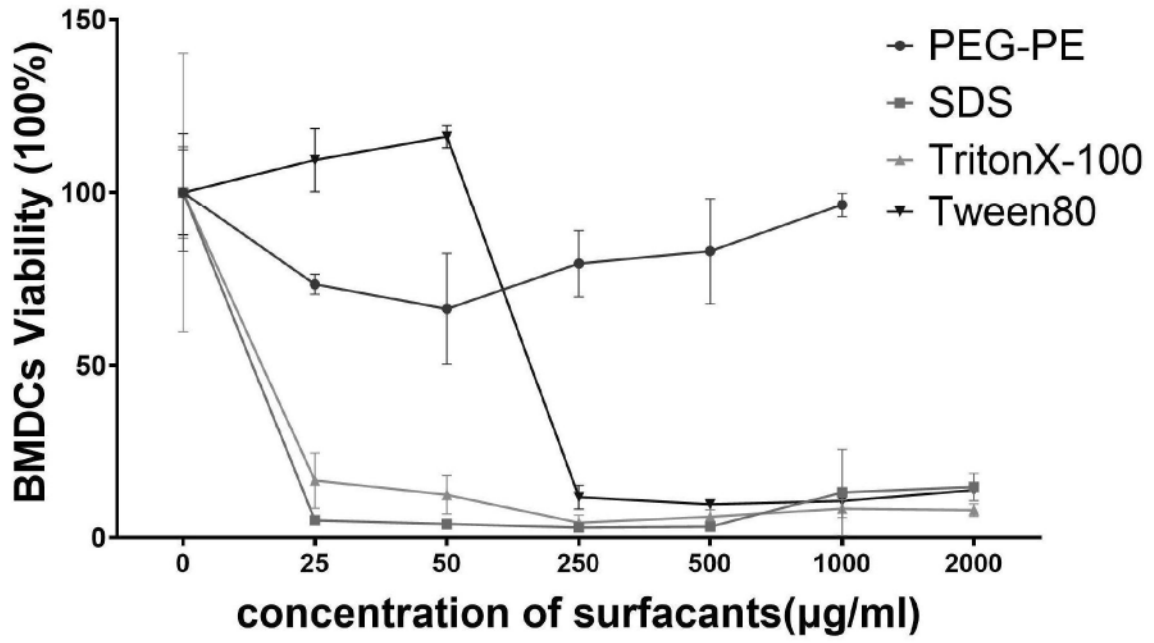
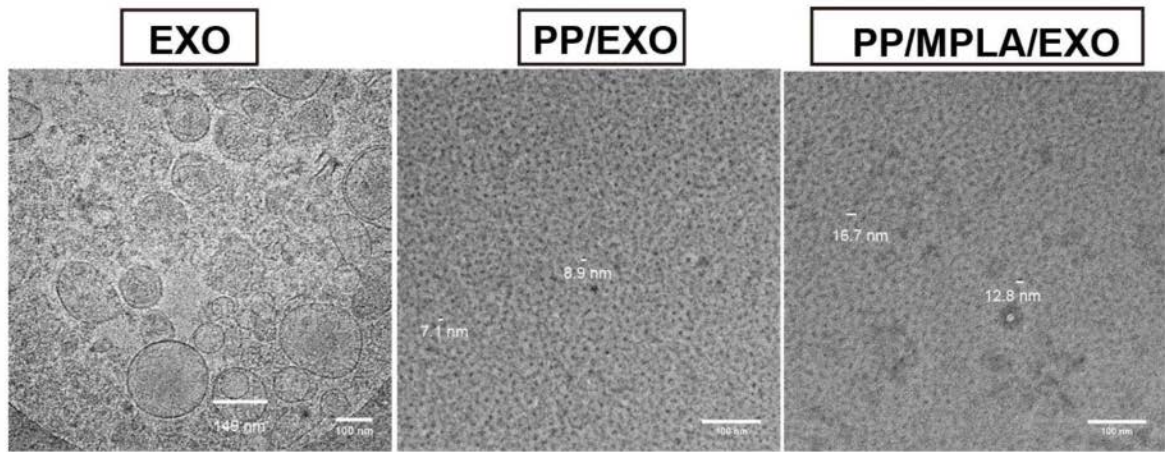
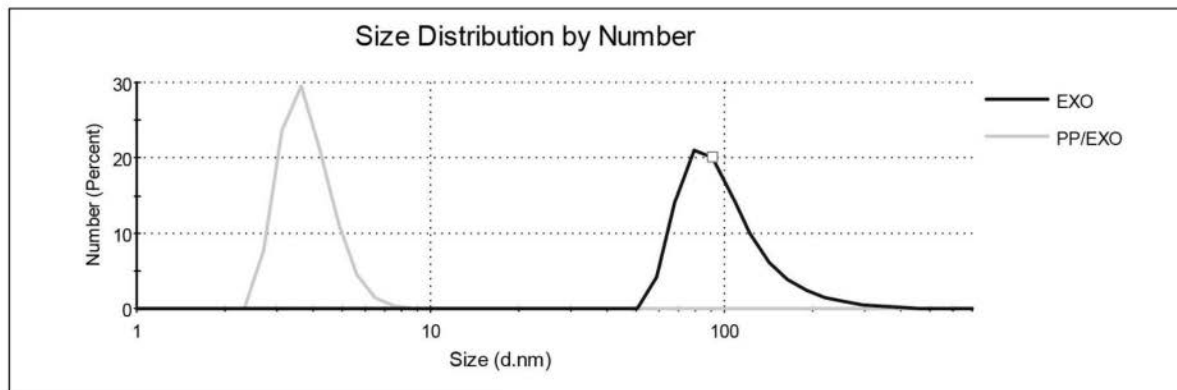


图1



A



B

图2

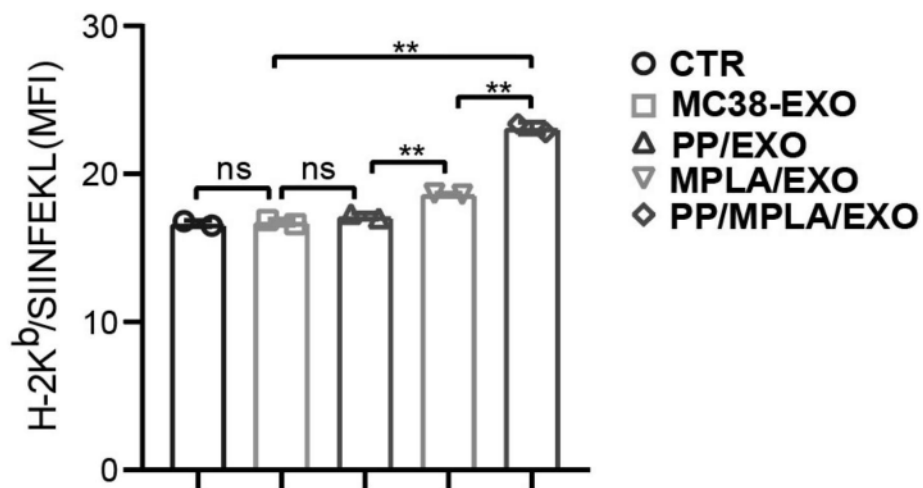


图3

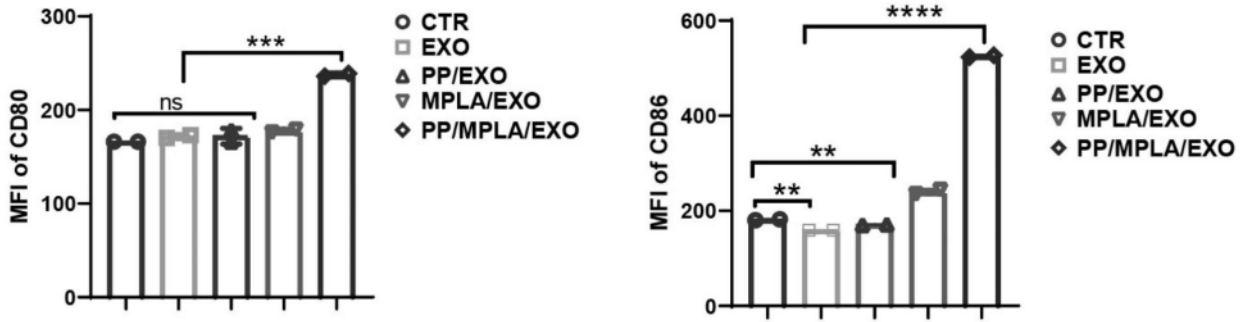


图4

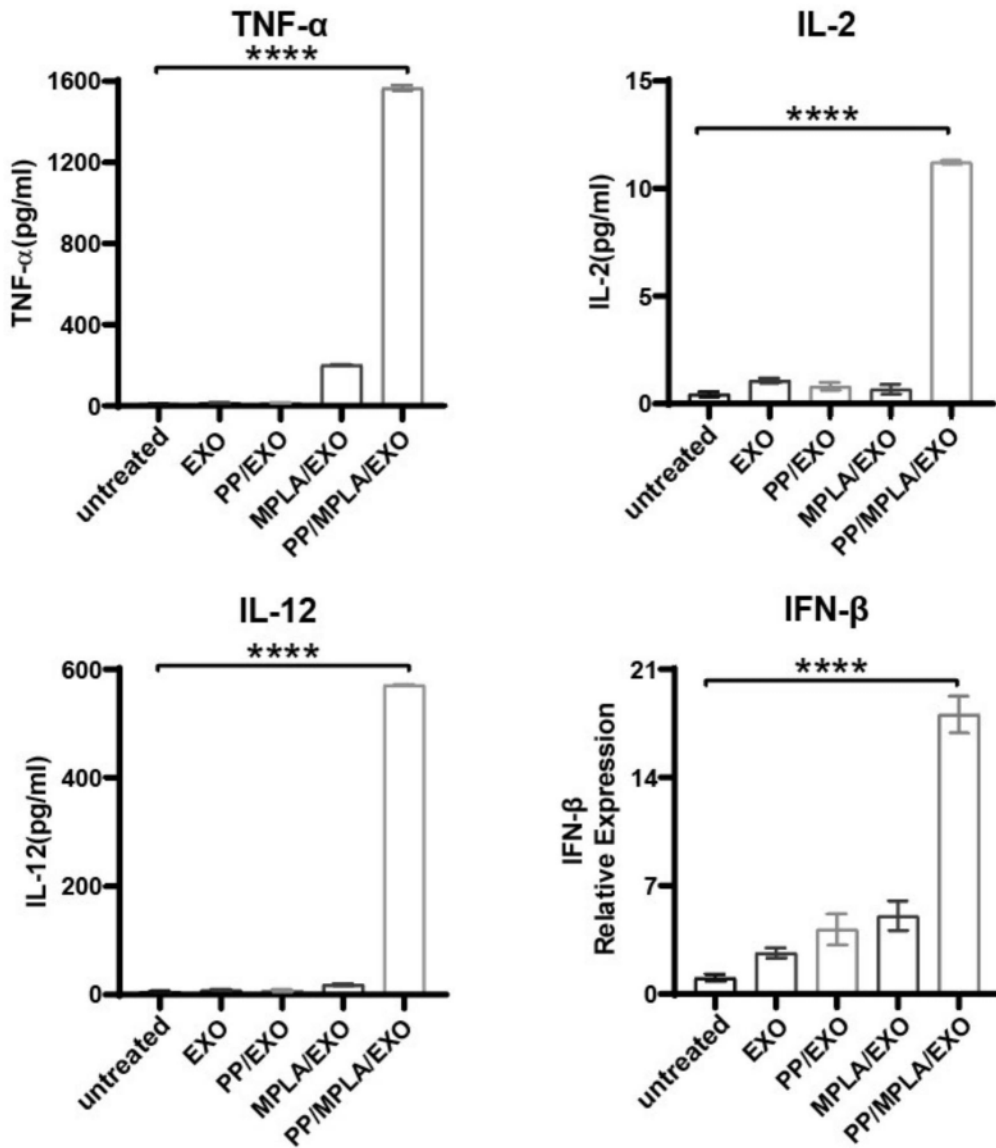
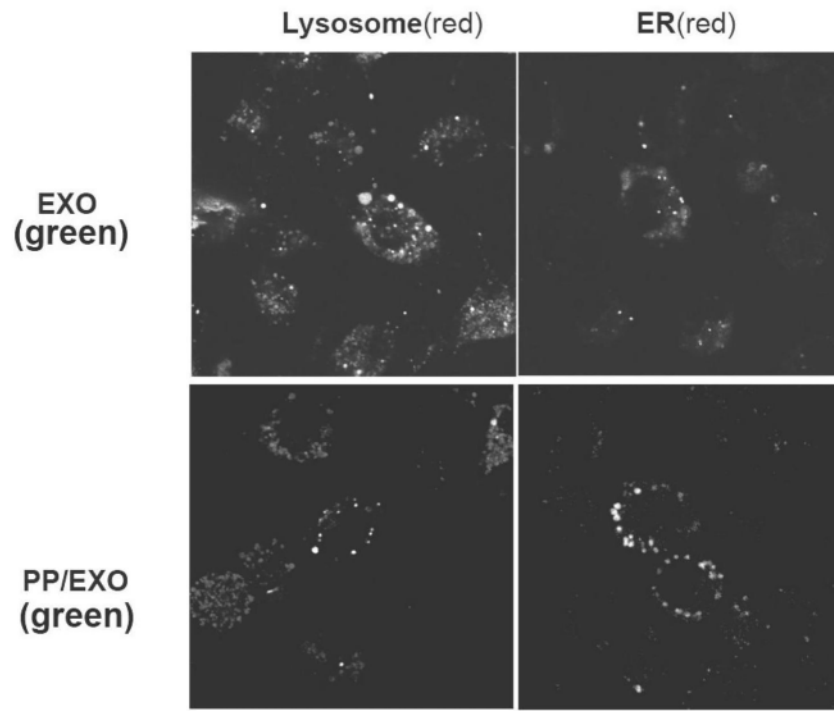
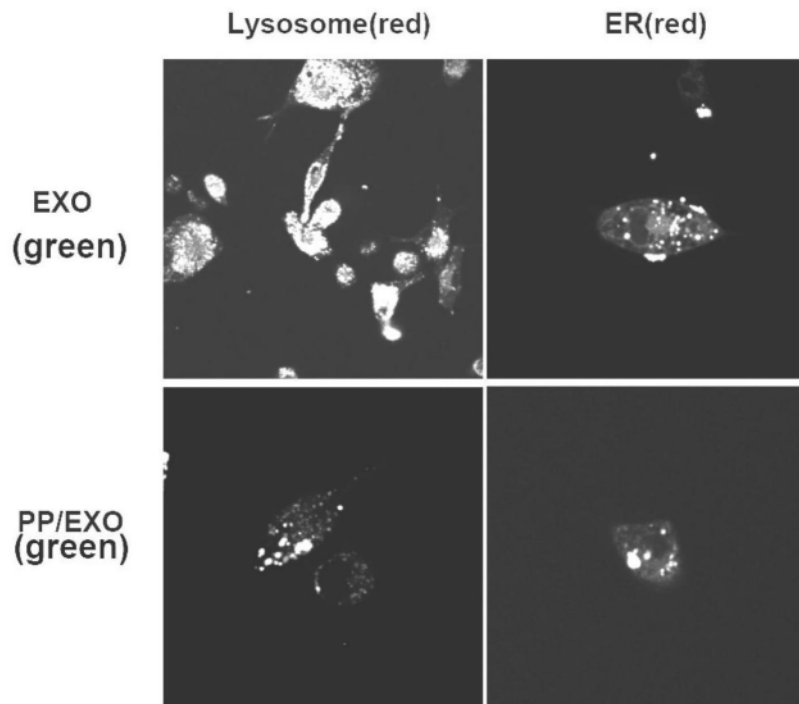


图5



A



B

图6

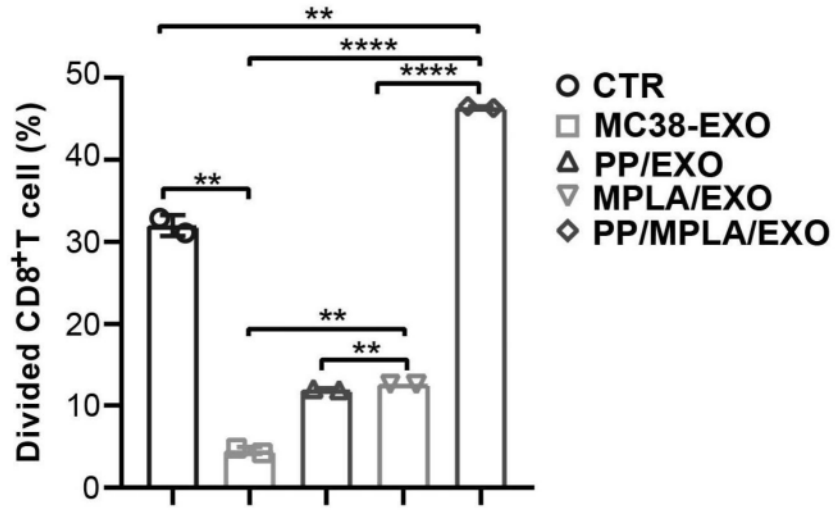


图7

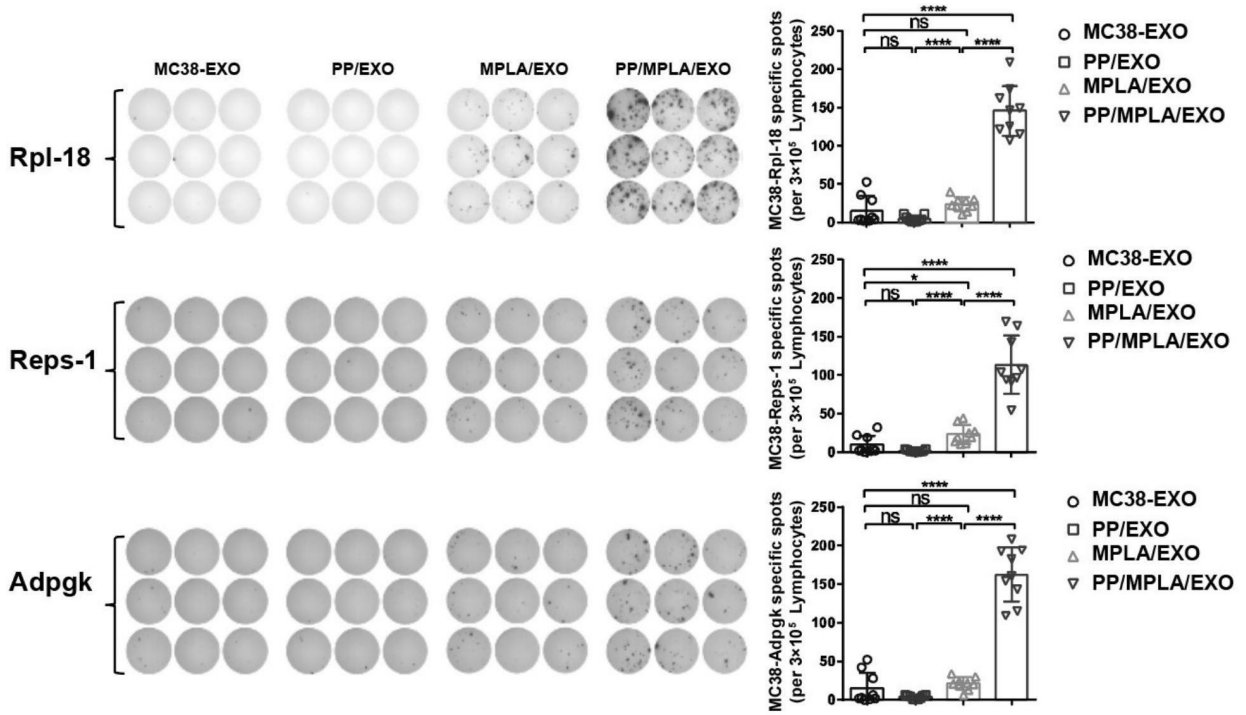


图8

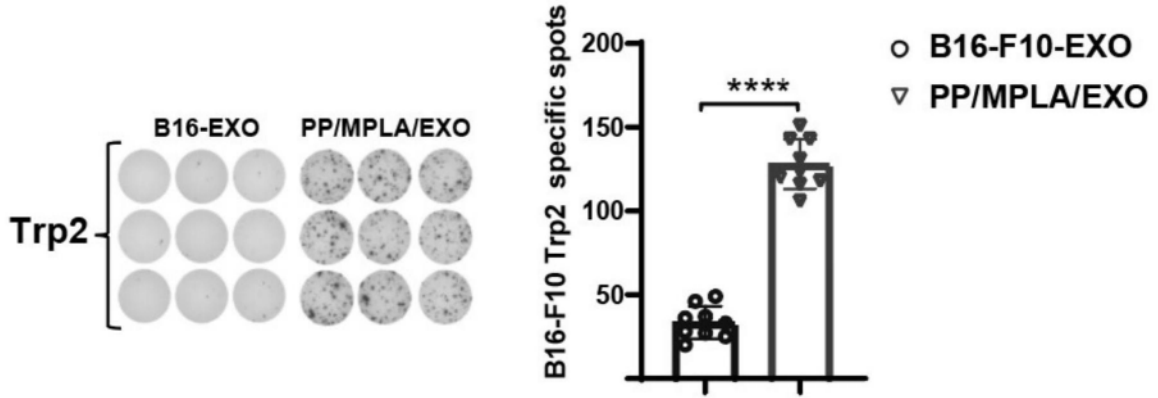


图9

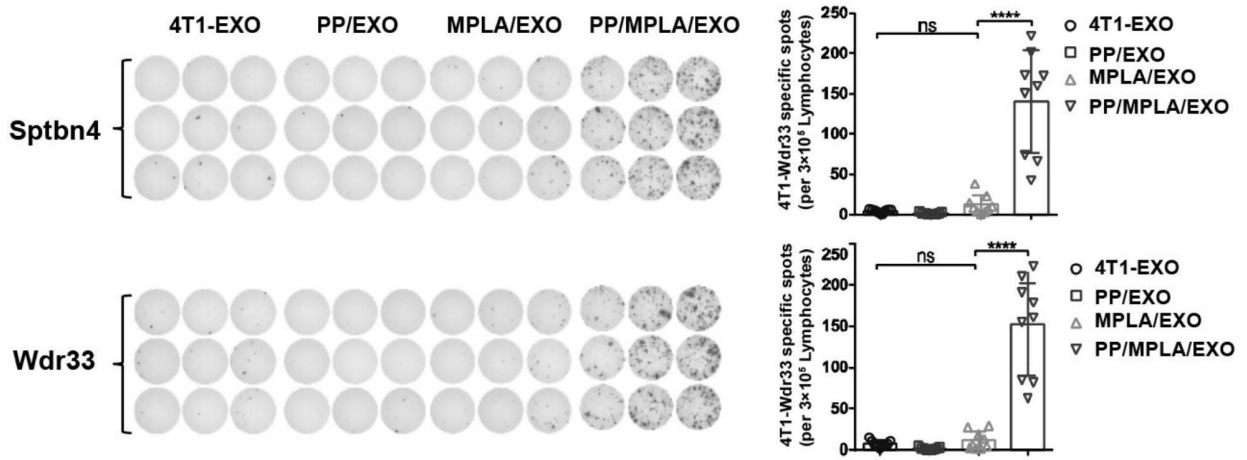


图10

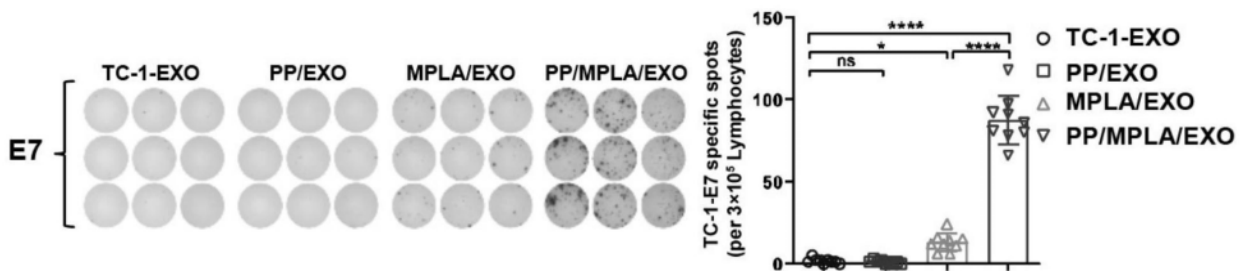


图11

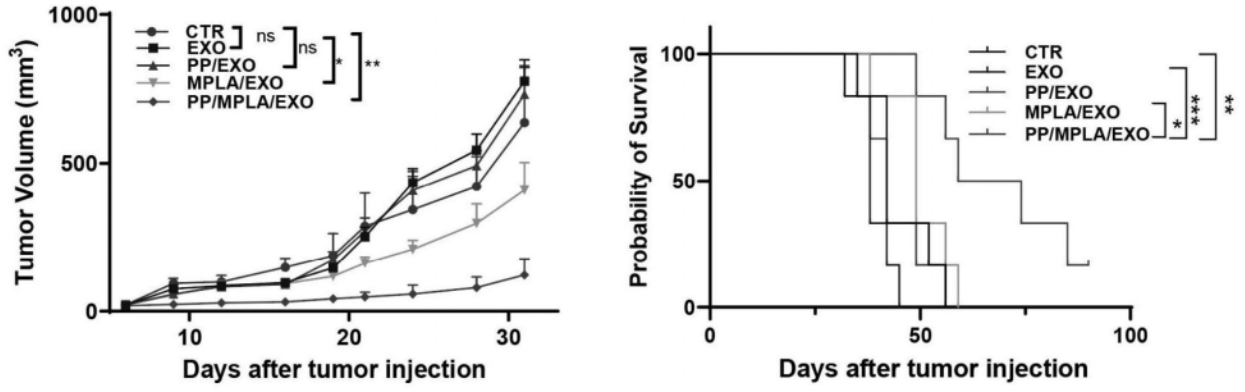


图12

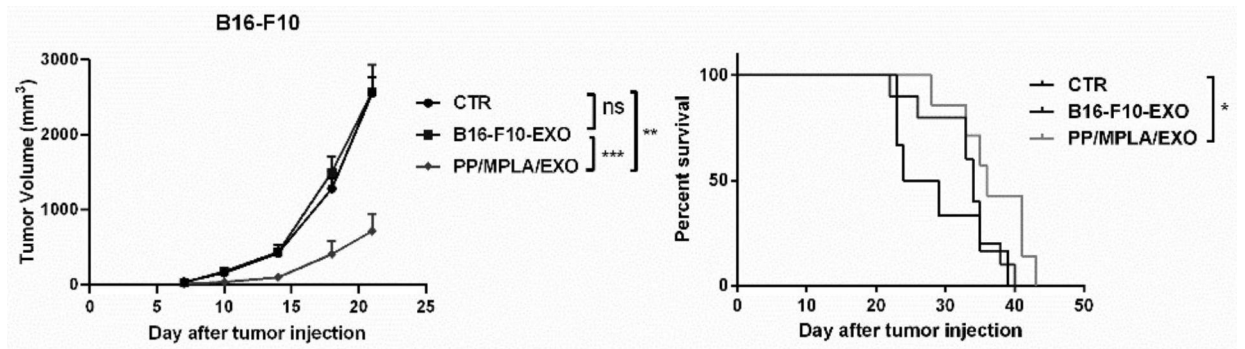


图13

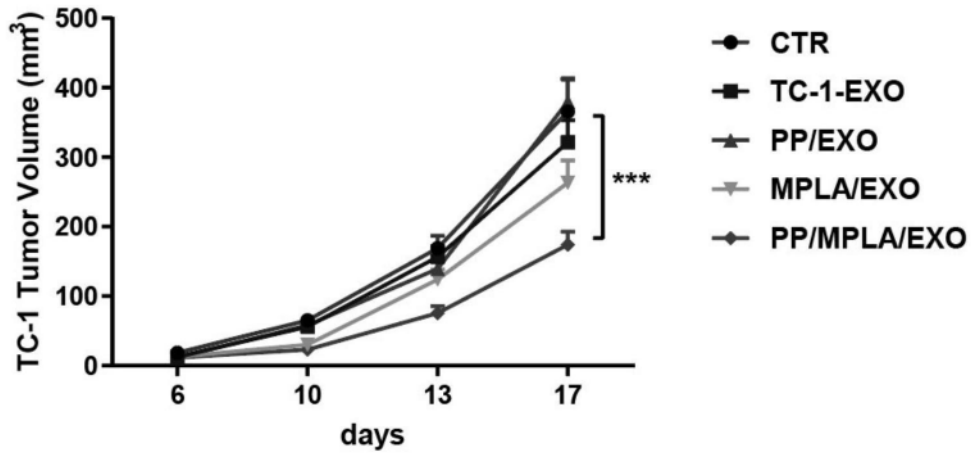


图14

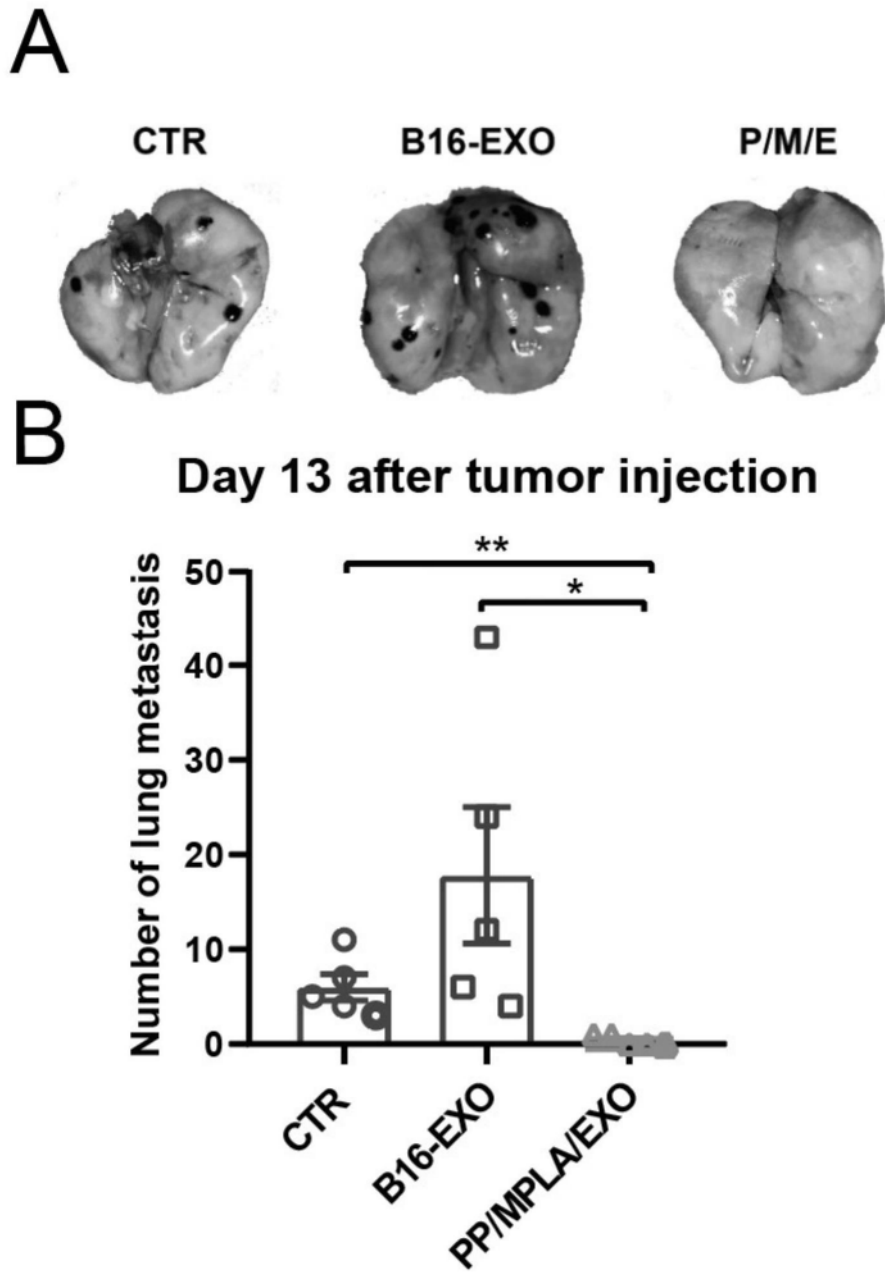


图15

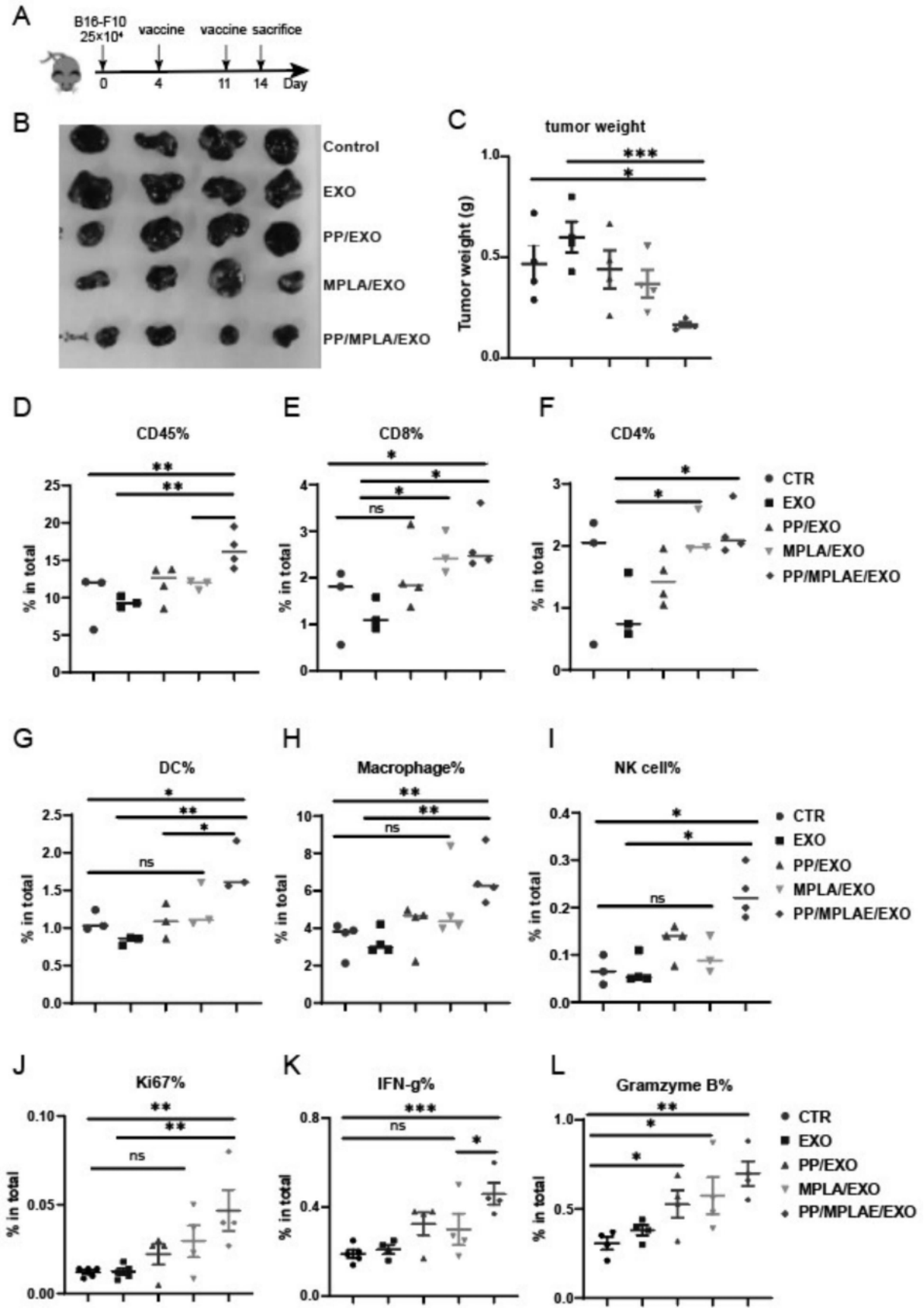


图16

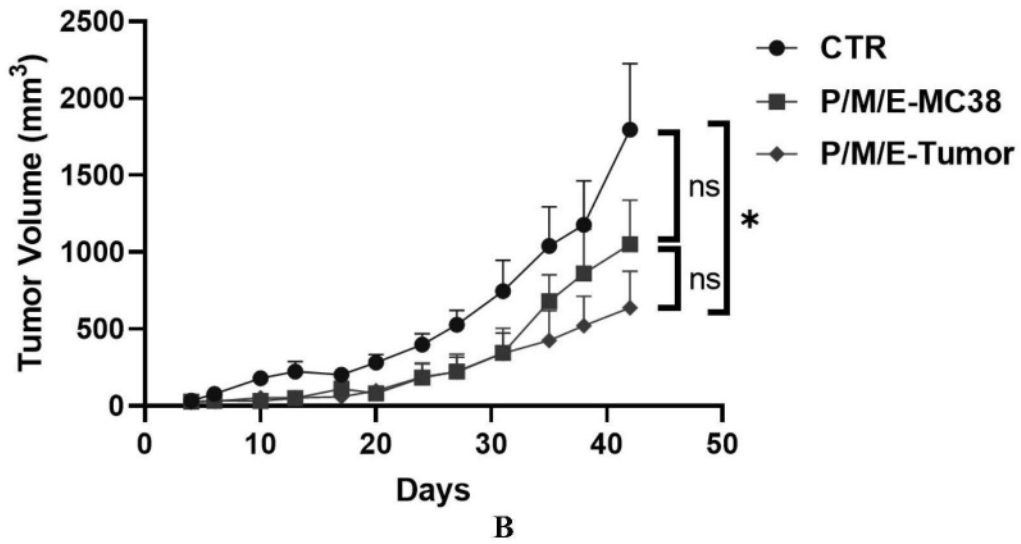
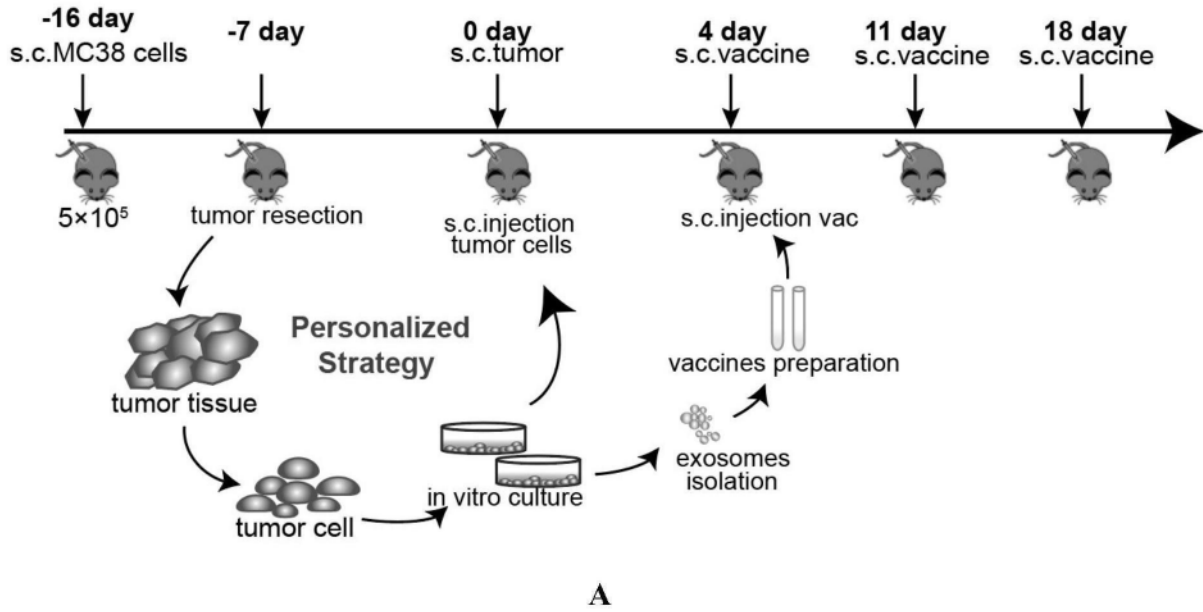


图17