



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112272706 A

(43) 申请公布日 2021.01.26

(21) 申请号 201980026862.2

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2019.02.15

代理人 张文辉

(30) 优先权数据

62/631,747 2018.02.17 US

(51) Int.Cl.

C12N 15/88 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/018324 2019.02.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/161281 EN 2019.08.22

(71) 申请人 旗舰先锋创新V股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G.A.冯马尔扎恩 J.M.米尔维德

J.R.鲁本斯 M.T.米 N.F.戈登

J.V.沙 K.M.特鲁杜 B.J.哈特利

权利要求书3页 说明书201页

序列表15页 附图8页

(54) 发明名称

用于膜蛋白递送的组合物和方法

(57) 摘要

本文描述了融合体组合物和方法。

1. 融合体,其包含:

(a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

(b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被所述脂质双层包围;

(c) 融合剂,其相对于所述源细胞是外源的或过表达的,例如其中所述融合剂布置于所述脂质双层中;和

(d) 膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于所述源细胞是外源的或过表达的),其包含或编码以下的一种或多种:

i) 嵌合抗原受体;

ii) 整联蛋白膜蛋白有效载荷,例如选自表5;

iii) 离子通道蛋白,其选自表6;

iv) 孔形成蛋白,例如选自表7和8;

v) Toll样受体,例如选自表9;

vi) 白介素受体有效载荷,例如选自表10;

vii) 细胞粘附蛋白,其选自表11-12;

viii) 转运蛋白,其选自表15;

ix) 信号序列,其相对于天然存在的膜蛋白是异源的;或

x) 信号序列,其在表4中列出;

其中所述融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。

2. 权利要求1的融合体,其中所述源细胞是原代细胞、培养的细胞、永生化细胞或细胞系(例如原粒细胞细胞系,例如C2C12)。

3. 权利要求1或2的融合体,其中所述源细胞是内皮细胞、成纤维细胞、血细胞(例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞)、干细胞(例如间充质干细胞、脐带干细胞、骨髓干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞,例如衍生自受试者细胞的诱导性多能干细胞)、胚胎干细胞(例如来自胚胎卵黄囊、胎盘、脐带、胎儿皮肤、青少年皮肤、血液、骨髓、脂肪组织、红细胞生成组织、造血组织的干细胞)、成肌细胞、实质细胞(例如肝细胞)、肺泡细胞、神经元(例如视网膜神经元细胞)、前体细胞(例如视网膜前体细胞、原粒细胞、髓样前体细胞、胸腺细胞、性母细胞、原巨核细胞、幼巨核细胞、成黑色素细胞、淋巴母细胞、骨髓前体细胞、正常红细胞或成血管细胞)、祖细胞(例如心脏祖细胞、卫星细胞、放射状胶质细胞、骨髓基质细胞、胰腺祖细胞、内皮祖细胞、母细胞)或永生化细胞(例如HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞)。

4. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述源细胞是同种异体的,例如与靶细胞从相同物种的不同生物体获得的。

5. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述源细胞是自体的,例如与靶细胞从相同的生物体获得的。

6. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述源细胞选自白细胞或干细胞。

7. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述源细胞选自嗜中性粒细胞、淋巴细胞(例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞)、巨噬细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞或原粒细胞。

8. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合体来自具有经修饰的基因组的源细

胞,例如具有降低的免疫原性(例如,通过基因组编辑以去除MHC复合物)的源细胞。

9. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合体具有所述源细胞的直径的小于约0.01%或1%的直径,例如如通过实施例30的测定法所测量的。

10. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合剂是哺乳动物融合剂或病毒融合剂。

11. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合剂在6-8的pH具有活性。

12. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合体包含至少1,000个拷贝的拷贝数的膜蛋白有效载荷剂,例如如通过实施例43的测定法所测量的。

13. 前述权利要求中任一项的融合体,其中:

a) 所述融合体符合药物或良好生产规范(GMP)标准;

b) 根据良好生产规范(GMP)制备所述融合体;

c) 所述融合体具有低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体;或

d) 所述融合体具有低于预先确定的参考值的污染物水平,例如,基本上不含污染物。

14. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述膜蛋白有效载荷剂是布置于所述融合体脂质双层中的膜蛋白。

15. 权利要求1-13中任一项的融合体,其中所述膜蛋白有效载荷剂是布置于所述融合体腔中的编码膜蛋白的核酸。

16. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述膜蛋白有效载荷剂是嵌合抗原受体(CAR)或者包含嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包含抗原结合域。

17. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述靶细胞在生物体中。

18. 权利要求1-16中任一项的融合体,其中所述靶细胞是从生物体分离的原代细胞。

19. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述靶细胞选自以下:内皮细胞、成纤维细胞、血细胞(例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞)、干细胞(例如间充质干细胞、脐带干细胞、骨髓干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞,例如衍生自受试者细胞的诱导性多能干细胞)、胚胎干细胞(例如来自胚胎卵黄囊、胎盘、脐带、胎儿皮肤、青少年皮肤、血液、骨髓、脂肪组织、红细胞生成组织、造血组织的干细胞)、成肌细胞、实质细胞(例如肝细胞)、肺泡细胞、神经元(例如视网膜神经元细胞)、前体细胞(例如视网膜前体细胞、原粒细胞、髓样前体细胞、胸腺细胞、性母细胞、原巨核细胞、幼巨核细胞、成黑色素细胞、淋巴母细胞、骨髓前体细胞、正常红细胞或成血管细胞)、祖细胞(例如心脏祖细胞、卫星细胞、放射状胶质细胞、骨髓基质细胞、胰腺祖细胞、内皮祖细胞、母细胞)或永生化细胞(例如HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞)。

20. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述靶细胞选自嗜中性粒细胞、淋巴细胞(例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞)、巨噬细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞或原粒细胞。

21. 前述权利要求中任一项的融合体,其中所述融合体包含将所述融合体定位于靶细胞的靶向域。

22. 权利要求21的融合体,其中所述靶向域与所述靶细胞上的靶细胞部分相互作用。

23. 制备融合体组合物的方法,其包括:

i) 提供多个根据权利要求1-22中任一项的融合体;和

ii) 配制所述多个融合体、融合体组合物或药物组合物,例如,作为适合用于施用于受试者的融合体药物产品。

24. 权利要求23的方法,其中所述融合体来自具有经修饰的基因组的哺乳动物细胞,例如具有降低的免疫原性(例如,通过基因组编辑以去除MHC复合物)的哺乳动物细胞。

25. 制备融合体药物产品组合物的方法,其包括:

a) 提供,例如,生产,提供多个根据权利要求1-22中任一项的融合体;和
b) 测定所述多个中的一个或多个融合体,以确定以下因素的一个或多个的存在或水平:

i) 免疫原性分子,例如免疫原性蛋白质,例如,如本文所述;

ii) 病原体,例如细菌或病毒;或

iii) 污染物;

c) (任选地) 如果所述因素的一个或多个低于参考值,则批准释放所述多个融合体或融合体组合物;

从而制备融合体药物产品组合物。

26. 向受试者例如人受试者施用融合体组合物的方法,其包括向所述受试者施用包含多个根据权利要求1-22中任一项的融合体的融合体组合物,从而向所述受试者施用所述融合体组合物。

27. 向受试者递送蛋白质膜有效载荷的方法,其包括向所述受试者施用包含多个根据权利要求1-22中任一项的融合体的融合体组合物,其中以使得所述蛋白质膜有效载荷得以递送的量和/或时间施用所述融合体组合物。

28. 治疗患者中的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用多个根据权利要求1-22中任一项的融合体,其中以使得所述疾病或病症得以治疗的量和/或时间施用所述融合体组合物。

29. 权利要求28的方法,其中所述疾病或病症选自癌症、自身免疫病症或传染性疾病。

用于膜蛋白递送的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2018年2月17日提交的美国序列号62/631,747的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交的序列表,并在此通过引用整体并入。创建于2019年2月12日的所述ASCII副本名为V2050-7013WO_SL.txt且大小为14,911字节。

[0005] 发明背景

[0006] 在与受精、发育、免疫应答和肿瘤发生一样多种多样的生物过程中需要细胞-细胞融合。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开提供了涉及融合体(fusosome)的技术及其将膜蛋白递送至靶细胞的用途。在一些实施方案中,融合体包含脂质双层、被脂质双层包围的腔、融合剂和包括膜蛋白有效载荷剂(payload agent)的货物(cargo)。在一些实施方案中,此类货物可以是膜蛋白本身或者可以包含膜蛋白本身;在一些实施方案中,此类货物可以是或者可以包含编码膜蛋白的核酸(或者与编码膜蛋白的核酸互补的核酸)。

[0009] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0010] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0011] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0012] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和

[0013] (d) 膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),其包含或编码以下的一种或多种:

[0014] i) 嵌合抗原受体;

[0015] ii) 整联蛋白膜蛋白有效载荷,例如选自表5;

[0016] iii) 离子通道蛋白,其选自表6;

[0017] iv) 孔形成蛋白,例如选自表7和8;

[0018] v) Toll样受体,例如选自表9;

[0019] vi) 白介素受体有效载荷,例如选自表10;

[0020] vii) 细胞粘附蛋白,其选自表11-12;

[0021] viii) 转运蛋白,其选自表15;

[0022] ix) 信号序列,其相对于天然存在的膜蛋白是异源的;或

[0023] x) 在表4中列出的信号序列;

[0024] 其中任选地融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。

[0025] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0026] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0027] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

- [0028] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和
- [0029] (d) 膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),其包含或编码T细胞受体;
- [0030] 其中任选地融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。
- [0031] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:
- [0032] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;
- [0033] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;
- [0034] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和
- [0035] (d) 膜蛋白有效载荷剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的;和
- [0036] 其中以下的一种或多种:
- [0037] i) 融合体包含细胞生物制品(cytobiologic)或由细胞生物制品所包含;
- [0038] ii) 融合剂以至少1,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的;
- [0039] iii) 融合体包含处于至少1,000个拷贝的拷贝数的治疗剂,例如如通过实施例43的测定法所测量的;
- [0040] iv) 融合体包含脂质,其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在源细胞中相应的脂质水平的75%内;
- [0041] v) 融合体包含与源细胞的蛋白质组组成相似的蛋白质组组成,例如使用实施例42的测定法测定;
- [0042] vi) 融合体能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)至少多10%,例如使用实施例63的测定法测定;
- [0043] vii) 当施用于受试者(例如小鼠)时,融合体靶向组织,例如肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼,例如其中所施用的融合体的群体中至少0.1%或10%的融合体在24小时后存在于靶组织中,例如通过实施例87或100的测定法测定;或
- [0044] viii) 源细胞选自嗜中性粒细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞、原粒细胞、成肌细胞、肝细胞或神经元,例如视网膜神经元细胞。
- [0045] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:
- [0046] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;
- [0047] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;
- [0048] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和
- [0049] (d) 膜蛋白有效载荷剂,其:
- [0050] i) 包含编码膜蛋白的DNA;或
- [0051] ii) 包含编码膜蛋白的RNA,例如mRNA,所述膜蛋白相对于源细胞是外源的或过表

达的,

[0052] 其中任选地融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。

[0053] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0054] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0055] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0056] (c) 非病毒融合剂,例如哺乳动物融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,其中哺乳动物融合剂不是阿尔茨海默症的beta淀粉样肽或受精素(fertilin);和

[0057] (d) 膜蛋白有效载荷剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,

[0058] 其中任选地融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。

[0059] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0060] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0061] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0062] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和

[0063] (d) 膜蛋白有效载荷剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的;

[0064] 其中融合体包含去核细胞,且

[0065] 其中任选地融合体不包含核衣壳蛋白或病毒基质蛋白。

[0066] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0067] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0068] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0069] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和

[0070] (d) 膜蛋白有效载荷剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的;

[0071] 以及其中以下的一种或多种:

[0072] i) 融合体包含细胞生物制品或由细胞生物制品所包含;

[0073] ii) 融合体包含去核细胞;

[0074] iii) 融合体包含失活的核;

[0075] iv) 融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,例如在实施例54的测定法中;

[0076] v) 融合体以比非靶融合体更高的速率与靶细胞融合,例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如在实施例54的测定法中;

[0077] vi) 融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的膜蛋白有效载荷剂在24、48或72小时后被递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;

[0078] vii) 融合剂以每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的;

[0079] viii) 融合体包含处于每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝数的膜蛋白有效载荷剂,例如如通过实施例43的测定法所测量的;

[0080] ix) 融合剂的拷贝数与膜蛋白有效载荷剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间;

[0081] x) 融合体包含与源细胞的脂质组成相似的脂质组成,或者其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在源细胞中相应的脂质水平的10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%内;

[0082] xi) 融合体包含与源细胞的蛋白质组组成相似的蛋白质组组成,例如使用实施例42的测定法测定;

[0083] xii) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与蛋白质的比率,例如如使用实施例49的测定法所测量的;

[0084] xiii) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的蛋白质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例50的测定法所测量的;

[0085] xiv) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例51的测定法所测量的;

[0086] xv) 融合体在受试者中(例如在小鼠中)具有参考细胞(例如源细胞)的半衰期的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的半衰期,例如通过实施例75的测定法测定;

[0087] xvi) 融合体跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如如使用实施例64的测定法所测量的;

[0088] xvii) 融合体在腔中包含参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法测定;

[0089] xviii) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)水平,例如如实施例68中所述;

[0090] xix) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平(例如耗氧率)的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述;

[0091] xx) 融合体包含至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法测定,或者其中融合体

包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平;

[0092] xxi) 融合体具有比源细胞的miRNA含量水平大至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法测定;

[0093] xxii) 融合体具有比源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率大1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%内,例如通过实施例47的测定法测定;

[0094] xxiii) 融合体具有源细胞的LPS含量的小于5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%或更小的LPS水平,例如如实施例48中所述通过质谱法所测量的;

[0095] xxiv) 融合体和/或其组合物或制剂能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如使用实施例63的测定法测定;

[0096] xxv) 当施用于受试者,例如哺乳动物,例如实验哺乳动物(例如小鼠)、家养动物(例如宠物或农场动物)或人类时,融合体靶向组织,例如肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼,其中所施用的融合体的群体中至少0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的融合体在24、48或72小时后存在于靶组织中,例如通过实施例87或100的测定法测定;

[0097] xxvi) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法测定;

[0098] xxvii) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法测定;

[0099] xxviii) 与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合的肌动蛋白的水平相比,融合体以1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的水平聚合肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法;

[0100] xxix) 融合体具有在参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)的膜电位的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的膜电位,例如通过实施例74的测定法测定,或者其中融合体具有约-20至-150mV、-20至-50mV、-50至-100mV或-100至-150mV的膜电位;

[0101] xxx) 融合体和/或其组合物或制剂能够从血管渗出,例如以与源细胞相同类型的

细胞的渗出速率的至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的速率,例如使用实施例57的测定法测定,例如,其中源细胞是嗜中性粒细胞、淋巴细胞、B细胞、巨噬细胞或NK细胞;

[0102] xxxi) 融合体和/或其组合物或制剂能够跨越细胞膜,例如内皮细胞膜或血脑屏障,例如以与源细胞相同类型的细胞的速率的至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的速率;

[0103] xxxii) 融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞或源细胞)高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的速率,例如使用实施例62的测定法测定;

[0104] xxxiii) 融合体符合药物或良好生产规范(GMP)标准;

[0105] xxxiv) 根据良好生产规范(GMP)制备融合体;

[0106] xxxv) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体;

[0107] xxxvi) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的污染物水平,例如,基本上不含污染物;

[0108] xxxvii) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低免疫原性,例如如本文所述;

[0109] xxxviii) 源细胞选自嗜中性粒细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞、原粒细胞、成肌细胞、肝细胞或神经元,例如视网膜神经元细胞;或

[0110] xxxix) 源细胞不是293细胞、HEK细胞、人内皮细胞或人上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或干细胞。

[0111] 在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是完整的膜蛋白;在一些实施方案中,膜蛋白是外周膜蛋白。在其他实施方案中,膜蛋白与膜暂时缔合。在一些实施方案中,膜蛋白是与靶细胞的膜缔合和/或全部或部分跨越(例如,作为跨膜蛋白)靶细胞的膜的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白是完整的单向性(monotopic)蛋白质(即,仅与膜的一侧缔合)。在一些实施方案中,膜蛋白与靶细胞的膜的外表面缔合或者变得与靶细胞的膜的外表面缔合(例如,在其上部分或全部存在)。在一些实施方案中,膜蛋白与靶细胞的膜的内表面缔合或者变得与靶细胞的膜的内表面缔合(例如,在其上部分或全部存在)。

[0112] 在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是治疗性膜蛋白。在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是或包含受体(例如,细胞表面受体和/或跨膜受体)、细胞表面配体、膜转运蛋白(例如,主动或被动转运蛋白,如例如离子通道蛋白、孔形成蛋白[例如毒素蛋白]等)、膜酶和/或细胞粘附蛋白)。

[0113] 在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白包含天然存在的膜蛋白的序列。在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是或包含天然存在的膜蛋白的变体或修饰形式。在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是或包含工程化膜蛋白。在一些实施方案中,与本公开有关的膜蛋白是或包含融合蛋白。

[0114] 在一些实施方案中,本公开提供和/或利用了融合体制剂,其中膜蛋白有效载荷剂部分或全部布置于融合体腔中。在一些实施方案中,本公开提供了融合体制剂,其中膜蛋白

有效载荷剂与融合体的脂质双层缔合(例如,部分或全部位于其中)。在一些实施方案中,相关的膜蛋白与融合体的外表面缔合和/或部分或全部展示在融合体的外表面上。

[0115] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0116] (a) 脂质双层,

[0117] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0118] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如,其中融合剂布置于脂质双层中,

[0119] (d) 膜蛋白有效载荷剂,例如对于源细胞外源的膜蛋白,

[0120] 其中融合体衍生自源细胞;并且

[0121] 其中融合体具有部分或完全的核失活(例如缺乏在源细胞中发现的完整的核、核去除/去核、无功能性核等)。

[0122] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0123] (a) 脂质双层,

[0124] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0125] (c) 融合剂,其相对于靶细胞是外源的或过表达的,例如,其中融合剂布置于脂质双层中(例如,其中融合剂对于源细胞是内源的或外源的),和

[0126] (d) 膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),其:

[0127] xi) 包含或编码嵌合抗原受体;

[0128] xii) 包含或编码整联蛋白膜蛋白有效载荷(例如选自表5的);

[0129] xiii) 包含或编码选自表6的离子通道蛋白;

[0130] xiv) 包含或编码孔形成蛋白(例如选自表7和8的);

[0131] xv) 包含或编码Toll样受体(例如选自表9的);

[0132] xvi) 包含或编码白介素受体有效载荷(例如选自表10的);

[0133] xvii) 包含或编码选自表11-12的细胞粘附蛋白;

[0134] xviii) 包含或编码选自表15的转运蛋白;

[0135] xix) 包含或编码相对于天然存在的膜蛋白异源的信号序列;

[0136] xx) 包含或编码表4中列出的信号序列;

[0137] 其中融合体不包含病毒衣壳或病毒包膜蛋白。

[0138] 在一些方面,本公开提供了融合体,其包含:

[0139] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0140] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0141] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和

[0142] (d) 膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),其包含或编码以下的一种或多种:

[0143] i) 脂质锚定蛋白;

[0144] ii) 结合跨膜蛋白的细胞外蛋白质;

[0145] iii) 缺乏跨膜域的细胞外蛋白质;

[0146] iv) 部分跨越膜(例如靶细胞或融合体的膜)但不完全跨越膜的蛋白质(例如,蛋白

质包含面内膜螺旋,或蛋白质包含不完全跨越膜的疏水环);或

[0147] v) 蛋白质不包含跨膜域,其中蛋白质例如通过静电或离子相互作用与膜表面相互作用;

[0148] 其中融合体不包含病毒结构蛋白,例如病毒衣壳蛋白或病毒包膜蛋白。

[0149] 在一些实施方案中,存在以下的一个或多个:

[0150] x1) 融合体包含细胞生物制品或由细胞生物制品所包含;

[0151] x1i) 融合体包含去核细胞;

[0152] x1ii) 融合体包含失活的核;

[0153] x1iii) 融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,例如在实施例54的测定法中;

[0154] x1iv) 融合体以与非靶融合体相比更高的速率与靶细胞融合,例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如在实施例54的测定法中;

[0155] x1v) 融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的膜蛋白有效载荷剂在24、48或72小时后被递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;

[0156] x1vi) 融合剂以每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的;

[0157] x1vii) 融合体包含处于每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝数的膜蛋白有效载荷剂,例如如通过实施例43的测定法所测量的;

[0158] x1viii) 融合剂的拷贝数与膜蛋白有效载荷剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间;

[0159] xlix) 融合体包含与源细胞的脂质组成相似的脂质组成,或者其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在源细胞中相应脂质水平的10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%内;

[0160] 1) 融合体包含与源细胞的蛋白质组组成相似的蛋白质组组成,例如使用实施例42的测定法测定;

[0161] 1i) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与蛋白质的比率,例如如使用实施例49的测定法所测量的;

[0162] 1ii) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的蛋白质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例50的测定法所测量的;

[0163] liii) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例51的测定法所测量的;

[0164] liv) 融合体在受试者中(例如在小鼠中)具有参考细胞(例如源细胞)的半衰期的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的半衰期,例如通过实施例75的测定法测定;

[0165] lv) 融合体跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如如使用实施例64的测定法所测量的;

[0166] lvi) 融合体在腔中包含参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法测定;

[0167] lvii) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)水平,例如如实施例68中所述;

[0168] lviii) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平(例如耗氧率)的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述;

[0169] lix) 融合体包含至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法测定,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平;

[0170] lx) 融合体具有比源细胞的miRNA含量水平大至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法测定;

[0171] lxi) 融合体具有比源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%内,例如通过实施例47的测定法;

[0172] lxii) 融合体具有源细胞的LPS含量的小于5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%或更小的LPS水平,例如如实施例48中所述通过质谱法所测量的;

[0173] lxiii) 融合体和/或其组合物或制剂能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如使用实施例63的测定法测定;

[0174] 1xiv) 当施用于受试者,例如哺乳动物,例如实验哺乳动物(例如小鼠)、家养动物(例如宠物或农场动物)或人类时,融合体靶向组织,例如肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼,其中所施用的融合体的群体中至少0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的融合体在24、48或72小时后存在于靶组织中,例如通过实施例87或100的测定法;

[0175] 1xv) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法测定;

[0176] 1xvi) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法测定;

[0177] 1xvii) 与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合的肌动蛋白的水平相比,融合体以1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的水平聚合肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法测定;

[0178] 1xviii) 融合体具有在参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)的膜电位的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的膜电位,例如通过实施例74的测定法测定,或者其中融合体具有约-20至-150mV、-20至-50mV、-50至-100mV或-100至-150mV的膜电位;

[0179] 1xix) 融合体和/或其组合物或制剂能够从血管渗出,例如以源细胞的渗出速率的至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的速率,例如使用实施例57的测定法测定,例如,其中源细胞是嗜中性粒细胞、淋巴细胞、B细胞、巨噬细胞或NK细胞;

[0180] 1xx) 融合体和/或其组合物或制剂能够跨越细胞膜,例如内皮细胞膜或血脑屏障;

[0181] 1xxi) 融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞或源细胞)高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的速率,例如使用实施例62的测定法测定;

[0182] 1xxii) 融合体符合药物或良好生产规范(GMP)标准;

[0183] 1xxiii) 根据良好生产规范(GMP)制备融合体;

[0184] 1xxiv) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体;

[0185] 1xxv) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的污染物水平,例如,基本上不含污染物;

[0186] 1xxvi) 如本文所述的包含多个融合体的药物制剂具有低免疫原性,例如如本文所述;

[0187] 1xxvii) 源细胞选自嗜中性粒细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞、原粒细胞、成肌细胞、肝细胞或神经元,例如视网膜神经元细胞;或

[0188] 1xxviii) 源细胞不是293细胞、HEK细胞、人内皮细胞或人上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或干细胞。

[0189] 在一些实施方案中,存在以下的一个或多个:

[0190] i) 融合体跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的融合体)至少多10%,例如如使用实施例64的测定法所测量的;

[0191] ii) 融合体在腔中包含参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的90%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法;

[0192] iii) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)的90%内的代谢活性水平,例如如实施例68中所述;

[0193] iv) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平的90%内的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述;

[0194] v) 融合体包含至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平;

[0195] vi) 融合体具有融合体的脂质含量的小于5%的LPS水平,例如如通过实施例48的测定法所测量的;

[0196] vii) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少5%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法测定;

[0197] viii) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平高至少5%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法测定;

[0198] ix) 与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合的肌动蛋白的水平相比,融合体以5%内的水平聚合肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法;或

[0199] x) 融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞)高至少5%的速率,例如使用实施例62的测定法测定。

[0200] 在一些实施方案中,提供的融合体进一步包含布置于腔中的细胞器,例如治疗有效数量的细胞器。

[0201] 或者/另外,在一些实施方案中,存在以下的一个或多个:

[0202] i) 源细胞选自内皮细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞、干细胞(例如间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞)、原粒细胞、成肌细胞、肝细胞或神经元,例如视网膜神经元细胞;

[0203] ii) 融合体包含选自以下的细胞器:高尔基体、溶酶体、内质网、液泡、内体、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体(glycosome)、乙醛酸循环体(glyoxysome)、氢化酶体(hydrogenosome)、黑素体、线粒体、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡、应激颗粒及其组合;

[0204] iii) 融合体具有大于5 μ m、10 μ m、20 μ m、50 μ m或100 μ m的直径;

[0205] iv) 包含多个融合体的制剂具有不在1.08g/mL和1.12g/mL之间的密度,例如,制剂具有>1.12g/mL的密度,例如1.25g/mL \pm 0.1、1.25g/mL \pm 0.05,例如如通过实施例33的测

定法所测量的；

[0206] v) 在实验哺乳动物或人类中，融合体基本上不被循环中的清除系统或肝窦中的库普弗(Kupffer)细胞捕获；

[0207] vi) 源细胞不是293细胞；

[0208] vii) 源细胞未经转化或永生化；

[0209] viii) 使用除腺病毒介导的永生化以外的其他方法使源细胞经转化或永生化，例如通过自发突变或端粒酶表达使之永生化；

[0210] ix) 融合剂不是VSVG、SNARE蛋白或分泌性颗粒蛋白；

[0211] x) 融合体不包含Cre或GFP，例如EGFP；

[0212] xi) 除了Cre或GFP(例如EGFP)，融合体进一步包含相对于源细胞外源的蛋白质；

[0213] xii) 融合体进一步例如在腔中包含对于所述源细胞是外源的核酸(例如，RNA，例如mRNA、miRNA或siRNA)或对于源细胞是外源的蛋白质(例如抗体)；

[0214] xiii) 融合体不包含线粒体，或基本不含线粒体；或

[0215] xiv) 融合体进一步包含核酸(例如，DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA、miRNA或siRNA)或蛋白质(例如抗体)，其中核酸或蛋白质对于源细胞是外源的。

[0216] 或者/另外，在一些实施方案中，以下一个或多个是真实的：

[0217] i) 膜蛋白有效载荷剂是膜蛋白，或编码膜蛋白(例如嵌合抗原受体(CAR))的核酸(例如DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等)或与编码膜蛋白的核酸互补的核酸；

[0218] ii) 膜蛋白是或包含受体，如抗原受体，其在一些实施方案中可以是天然受体或工程化受体，例如CAR；

[0219] iii) 膜蛋白是或包含整联蛋白；

[0220] iv) 膜蛋白是或包含T细胞受体；

[0221] v) 膜蛋白是或包含膜转运蛋白，如离子通道蛋白或孔形成蛋白(例如溶血素或大肠菌素)；

[0222] vi) 膜蛋白是或包含Toll样受体；

[0223] vii) 膜蛋白是或包含白介素受体；

[0224] viii) 膜蛋白是或包含膜酶；

[0225] ix) 膜蛋白是或包含细胞粘附蛋白(例如，钙黏着蛋白、选择素蛋白、黏蛋白等)。

[0226] 在一些方面，本公开提供了融合体，其包含：

[0227] (a) 脂质双层，

[0228] (b) 腔(例如，包含胞质溶胶)，其被脂质双层包围；

[0229] (c) 融合剂，其相对于源细胞是外源的或者是过表达的融合剂，例如，其中融合剂布置于脂质双层中，

[0230] (d) 膜蛋白有效载荷剂，和

[0231] (e) 功能性核，

[0232] 其中融合体衍生自源细胞。

[0233] 在一些实施方案中，存在以下的一个或多个：

[0234] i) 源细胞不是树突状细胞或肿瘤细胞，例如，源细胞选自内皮细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞、干细胞(例如间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、

胚胎干细胞)、原粒细胞、成肌细胞、肝细胞或神经元,例如视网膜神经元细胞;

[0235] ii) 融合剂不是促融合糖蛋白;

[0236] iii) 融合剂是除受精素-beta以外的哺乳动物蛋白;

[0237] iv) 融合体具有低免疫原性,例如如本文所述;

[0238] v) 融合体符合药物或良好生产规范(GMP)标准;

[0239] vi) 根据良好生产规范(GMP)制备包含多个融合体的药物制剂;

[0240] vii) 包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体;或

[0241] viii) 包含多个融合体的药物制剂具有低于预先确定的参考值的污染物水平,例如,基本上不含污染物。

[0242] 在一些方面,本公开提供了包含多个本文所述的融合体的冷冻的纯化的融合体制剂,所述融合体包含膜蛋白有效载荷剂,其中制剂在处于或小于4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80或-160°C的温度下冷冻。

[0243] 在一些方面,本公开提供了融合体制剂(例如药物制剂),其包含多个本文所述的融合体。

[0244] 在一些方面,本公开还提供了包含多个融合体的融合体组合物,其中至少一个融合体包含:

[0245] (a) 脂质双层,其包含衍生自源细胞的多种脂质;

[0246] (b) 腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;

[0247] (c) 融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如,其中融合剂布置于脂质双层中;

[0248] (d) 膜蛋白有效载荷剂,例如如本文所述。

[0249] 在一些方面,本公开提供了药物组合物,其包含本文所述的融合体组合物或制剂和药学上可接受的载体。

[0250] 在某些方面,本公开提供了将如本文所述的包含膜蛋白有效载荷剂的融合体组合物或制剂递送至人类受试者、靶组织或细胞的方法,其包括向人类受试者施用或使靶组织或细胞接触,包含多个本文所述的融合体的融合体组合物、本文所述的融合体组合物或本文所述的药物组合物,从而将融合体组合物施用于受试者。

[0251] 在某些方面,本公开提供了将膜蛋白有效载荷剂递送至受试者、靶组织或细胞的方法,其包括向受试者施用或使靶组织或细胞接触,本文所述的融合体组合物或制剂(例如本文所述的药物组合物),其中以使得膜蛋白有效载荷剂得以递送的量和/或时间施用融合体组合物或制剂。

[0252] 在某些方面,本公开提供了调控,例如增强,受试者、靶组织或细胞中生物学功能的方法,其包括向受试者施用或使靶组织或细胞接触,包含本文所述的膜蛋白有效载荷剂的融合体组合物或制剂,例如本文所述的药物组合物,从而调控受试者中的生物学功能。

[0253] 在某些方面,本公开提供了将膜蛋白功能递送至或靶向至受试者的方法,其包括向受试者施用包含膜蛋白有效载荷剂的本文所述的融合体组合物或制剂,其中以使得受试者中膜蛋白功能得以递送或靶定的量和/或时间施用融合体组合物或制剂。在实施方案中,受试者患有癌症、炎性病征、自身免疫疾病、慢性疾病、炎症、器官功能受损、传染性疾病、退

行性病症、遗传性疾病或损伤。

[0254] 在一些方面,本公开提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0255] a) 提供包含(例如表达)融合剂的源细胞;

[0256] b) 从源细胞产生融合体,其中融合体包含脂质双层、腔、融合剂和膜蛋白有效载荷剂,从而制备融合体;和

[0257] c) 将融合体制配为例如适于施用于受试者的药物组合物。

[0258] 在实施方案中,存在以下的一个或多个:

[0259] i) 源细胞不是293细胞、HEK细胞、人内皮细胞或人上皮细胞;

[0260] ii) 融合剂不是病毒蛋白质;

[0261] iii) 包含多个融合体的制剂具有不在1.08g/mL和1.12g/mL之间的密度;

[0262] iv) 包含多个融合体的制剂具有1.25g/mL \pm 0.05的密度,例如如通过实施例33的测定法所测量的;

[0263] v) 融合体基本上不被循环中的清除系统或肝窦中的库普弗细胞捕获;

[0264] vi) 融合体基本上不被受试者中的网状内皮系统(RES)捕获,例如通过实施例76的测定法;

[0265] vii) 当向受试者施用多个融合体时,所述多个的小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%在24、48或72小时后被RES捕获,例如通过实施例76的测定法;

[0266] viii) 融合体具有大于5 μ m、6 μ m、7 μ m、8 μ m、10 μ m、20 μ m、50 μ m、100 μ m、150 μ m或200 μ m的直径;

[0267] ix) 融合体包含细胞生物制品;

[0268] x) 融合体包含去核细胞;或

[0269] xi) 融合体包含失活的核。

[0270] 在一些方面,本公开提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0271] a) 提供多个本文所述的融合体或本文所述的融合体组合物;和

[0272] b) 将融合体制配为例如适于施用于受试者的药物组合物。

[0273] 在一些方面,本公开提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0274] a) 提供例如生产本文所述的多个融合体或融合体制剂;和

[0275] b) 测定多个(例如制剂)的样品以确定是否符合一个或多个(例如2、3或更多个)标准。在实施方案中,标准选自:

[0276] i) 样品中的融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,例如在实施例54的测定法中;

[0277] ii) 样品中的融合体以与其他融合体相比更高的速率与靶细胞融合,例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如在实施例54的测定法中;

[0278] iii) 样品中的融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的膜蛋白有效载荷剂在24、48或72小时后被递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;

[0279] iv) 融合剂以每融合体(例如样品中平均)至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,

000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的;

[0280] v) 膜蛋白有效载荷剂可在样品的融合体中(例如样品中平均)以至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数检测到,例如如通过实施例43的测定法所测量的;

[0281] vi) 融合剂的拷贝数与膜蛋白有效载荷剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间;

[0282] vii) 样品的融合体的特征在于与源细胞的脂质组成基本上相似的脂质组成,或者其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在源细胞中相应的脂质水平的10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或75%内;

[0283] viii) 样品的融合体的特征在于与源细胞的蛋白质组组成相似的蛋白质组组成,例如使用实施例42的测定法测定;

[0284] ix) 样品的融合体的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与蛋白质的比率,例如如使用实施例49的测定法所测量的;

[0285] x) 样品的融合体的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的蛋白质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例50的测定法所测量的;

[0286] xi) 样品的融合体的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例51的测定法所测量的;

[0287] xii) 样品的融合体的特征在于在受试者中(例如在实验动物如小鼠中)具有参考细胞(例如源细胞)的半衰期的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的半衰期,例如通过实施例75的测定法;

[0288] xiii) 样品的融合体的特征在于其跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的样品的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如如使用实施例64的测定法所测量的;

[0289] xiv) 样品的融合体的特征在于腔中在参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法;

[0290] xv) 样品的融合体的特征在于在参考细胞(例如源细胞)中代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)水平,例如如实施例68中所述;

[0291] xvi) 样品的融合体的特征在于在参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的呼吸水平

(例如耗氧率),例如如实施例69中所述;

[0292] xvii) 样品的融合体的特征在于至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平;

[0293] xviii) 样品的融合体的特征在于比源细胞的miRNA含量水平至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法;

[0294] xix) 融合体具有比源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%内,例如通过实施例47的测定法;

[0295] xx) 样品的融合体的特征在于小于源细胞或参考细胞的LPS含量的5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%或更小的LPS水平,例如如通过实施例48的测定法所测量的;

[0296] xxi) 样品的融合体能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如使用实施例63的测定法;

[0297] xxii) 样品的融合体的特征在于比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法;

[0298] xxiii) 样品的融合体的特征在于比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法;

[0299] xxiv) 样品的融合体的特征在于与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合的肌动蛋白的水平相比,其以1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的水平聚合肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法;

[0300] xxv) 样品的融合体的特征在于在参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)的膜电位的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的膜电位,例如通过实施例74的测定法,或者其中融合体具有约-20至-150mV、-20至-50mV、-50至-100mV或-100至-150mV的膜电位;

[0301] xxvi) 样品的融合体能够分泌蛋白质,例如以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞)高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的速率,例如使用实施例62的测定法;或

- [0302] xxvii) 样品的融合体的特征在于低免疫原性,例如如本文所述的;和
- [0303] c) (任选地) 如果符合一个或多个标准,则批准多个融合体或融合体组合物释放,或者(任选地) 如果符合一个或多个标准,则将多个融合体或融合体制剂配制为药物产品。
- [0304] 在一些方面,本公开也提供了制备融合体组合物的方法,其包括:
- [0305] a) 提供,例如生产,多个本文所述的融合体或本文所述的融合体组合物或制剂;和
- [0306] b) 测定多个或制剂的样品,以确定以下因素的一个或多个的存在或水平:
- [0307] i) 免疫原性分子,例如免疫原性蛋白质,例如,如本文所述;
- [0308] ii) 病原体,例如细菌或病毒;或
- [0309] iii) 污染物(例如核结构或组分如核DNA);和
- [0310] c) (任选地) 如果一个或多个因素与参考值有显著偏差(例如,超过规定量),则批准释放多个融合体或融合体制剂,或者(任选地) 如果一个或多个因素与参考值没有显著偏差(例如,偏差不超过规定量),则将多个融合体或融合体制剂配制为药物产品。
- [0311] 在一些方面,本公开也提供了,将膜蛋白有效载荷剂递送至受试者的方法,例如包括:
- [0312] a) 在允许第一融合剂布置于受试者中一个或多个靶细胞中的条件下,向受试者施用第一融合剂,其中以下的一种或多种:
- [0313] i) 施用第一融合剂包括在允许第一融合剂在一个或多个靶细胞中表达的条件下施用编码第一融合剂的核酸,或
- [0314] ii) 第一融合剂不包含卷曲螺旋基序,和
- [0315] b) 向人类受试者施用如本文所述的融合体组合物或制剂,包括多个包含第二融合剂和膜蛋白有效载荷剂的融合体,其中第二融合剂与第一融合剂相容,其中多个融合体进一步包含膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),
- [0316] 从而将膜蛋白有效载荷剂递送至受试者。
- [0317] 在一些方面,本公开也提供了,调控,例如增强,受试者中生物学功能的方法,其包括:
- [0318] a) 在允许第一融合剂布置于受试者中一个或多个靶细胞中的条件下,向受试者施用第一融合剂,其中以下的一种或多种:
- [0319] i) 施用第一融合剂包括在允许第一融合剂在一个或多个靶细胞中表达的条件下施用编码第一融合剂的核酸,或
- [0320] ii) 第一融合剂不包含卷曲螺旋基序,和
- [0321] b) 向人类受试者施用如本文所述的融合体组合物或制剂,包括多个包含第二融合剂的融合体,其中第二融合剂与第一融合剂相容,其中多个融合体进一步包含膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的),
- [0322] 从而调控受试者中的生物学功能。
- [0323] 在一些方面,融合体包含线粒体(chondrisome)和融合剂。
- [0324] 在一些方面,组合物包含多个融合体,其中至少一个融合体包含线粒体和融合剂。
- [0325] 在一些方面,本文提供了制备融合体组合物的方法,其包括:
- [0326] a) 提供源细胞,其包含,例如表达,融合剂;
- [0327] b) 从源细胞生产融合体,其中融合体包含脂质双层、腔、融合剂和膜蛋白有效载荷

剂,从而制备融合体;和

[0328] c) 将融合体配制为例如适于施用于受试者的药物组合物,其中以下的一种或多种:

[0329] i) 源细胞不是293细胞、HEK细胞、人内皮细胞或人上皮细胞;

[0330] ii) 融合剂不是病毒蛋白质;

[0331] iii) 融合体和/或其组合物或制剂具有不在1.08g/mL和1.12g/mL之间的密度,例如,

[0332] iv) 融合体和/或其组合物或制剂具有1.25g/mL \pm 0.05的密度,例如如通过实施例33的测定法所测量的;

[0333] v) 融合体不被循环中的清除系统或肝窦中的库普弗细胞捕获;

[0334] vi) 融合体不被受试者中的网状内皮系统 (RES) 捕获,例如通过实施例76的测定法;

[0335] vii) 当向受试者施用多个融合体时,多个的小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%在24小时后不被RES捕获,例如通过实施例76的测定法;

[0336] viii) 融合体具有大于5 μ m、6 μ m、7 μ m、8 μ m、10 μ m、20 μ m、50 μ m、100 μ m、150 μ m或200 μ m的直径;

[0337] ix) 融合体包含细胞生物制品;

[0338] x) 融合体包含去核细胞;或

[0339] xi) 融合体包含失活的核。

[0340] 在一些方面,本文提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0341] i) 提供如文本所述的多个融合体、融合体组合物或药物组合物;和

[0342] ii) 将多个融合体、融合体组合物或药物组合物配制为例如适于施用于受试者的融合体药物产品。

[0343] 在一些方面,本文提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0344] i) 提供如文本所述的多个融合体、融合体组合物或药物组合物;和

[0345] b) 测定来自多个的一个或多个融合体,以确定是否符合以下标准的一个或多个(例如2个、3个或所有):

[0346] i) 融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少10%,例如在实施例54的测定法中;

[0347] ii) 融合体以与其他融合体相比更高的速率与靶细胞融合,例如高至少50%,例如在实施例54的测定法中;

[0348] iii) 融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂在24小时后得以递送至至少10%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;

[0349] iv) 融合剂以至少1,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的;

[0350] v) 融合体包含处于至少1,000个拷贝的拷贝数的蛋白质膜有效载荷,例如如通过实施例43的测定法所测量的;

[0351] vi) 融合剂的拷贝数与蛋白质膜有效载荷的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,

000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间；

[0352] vii) 融合体包含脂质组合物,其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在源细胞中相应脂质水平的75%内；

[0353] viii) 融合体包含与源细胞的蛋白质组组成相似的蛋白质组组成,例如使用实施例42的测定法测定；

[0354] ix) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与蛋白质的比率,例如如使用实施例49的测定法所测量的；

[0355] x) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的蛋白质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例50的测定法所测量的；

[0356] xi) 融合体包含在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例51的测定法所测量的；

[0357] xii) 融合体在受试者中(例如在鼠中)具有参考细胞(例如源细胞)的半衰期的90%内的半衰期,例如通过实施例75的测定法测定；

[0358] xiii) 融合体跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的融合体)至少多10%,例如如使用实施例64的测定法所测量的；

[0359] xiv) 融合体在腔中包含参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的90%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法测定；

[0360] xv) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中代谢活性(例如柠檬酸合酶活性)的90%内的代谢活性水平,例如如实施例68中所述；

[0361] xvi) 融合体包含参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平的90%内的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述；

[0362] xvii) 融合体包含至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的膜联蛋白V染色水平；

[0363] xviii) 融合体具有比源细胞的miRNA含量水平至少1%的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法测定；

[0364] xix) 融合体具有在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的90%内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如通过实施例47的测定法测定；

[0365] xx) 融合体具有小于源细胞的脂质含量的5%的LPS水平,例如如通过实施例48的测定法所测量的；

[0366] xxi) 融合体和/或其组合物或制剂能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄

取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)至少多10%,例如使用实施例63的测定法;

[0367] xxii) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少5%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法测定;

[0368] xxiii) 融合体具有比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平至少高5%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法测定;

[0369] xiv) 与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合的肌动蛋白的水平相比,融合体以5%内的水平聚合肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法测定;

[0370] xv) 融合体具有在参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)的膜电位的约5%内的膜电位,例如通过实施例74的测定法,或者其中融合体具有约-20至-150mV、-20至-50mV、-50至-100mV或-100至-150mV的膜电位;

[0371] xvi) 融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞)大至少5%的速率,例如使用实施例62的测定法测定;或

[0372] xvii) 融合体具有低免疫原性,例如如本文所述;和

[0373] c) (任选地) 如果符合一个或多个标准,则批准释放多个融合体或融合体组合物;

[0374] 从而制备融合体药物产品组合物。

[0375] 在一些方面,本文提供了制备融合体组合物的方法,其包括:

[0376] a) 提供如文本所述的多个融合体、融合体组合物或药物组合物;和

[0377] b) 测定来自多个的一个或多个融合体,以确定以下因素的一个或多个的存在或水平:

[0378] i) 免疫原性分子,例如免疫原性蛋白质,例如,如本文所述;

[0379] ii) 病原体,例如细菌或病毒;或

[0380] iii) 污染物;

[0381] c) (任选地) 如果因素的一个或多个低于参考值,则批准释放多个融合体或融合体组合物;

[0382] 从而制备融合体药物产品组合物。

[0383] 在一些方面,本文提供了向受试者,例如人类受试者施用融合体组合物的方法,其包括向受试者施用如本文所述的包含多个融合体的融合体组合物、融合体组合物或药物组合物,从而向受试者施用融合体组合物。

[0384] 在一些方面,本文提供了将蛋白质膜有效载荷递送至受试者的方法,其包括向受试者施用如本文所述的包含多个融合体的融合体组合物、融合体组合物或药物组合物,其中以使得蛋白质膜有效载荷得以递送的量和/或时间施用融合体组合物。

[0385] 在一些方面,本文提供了调控,例如增强,受试者中生物学功能的方法,其包括向受试者施用如本文所述的包含多个融合体的融合体组合物、融合体组合物或药物组合物,从而调控受试者中的生物学功能。

[0386] 在一些方面,本文提供了将功能递送或靶向至受试者的方法,其包括向受试者施用如本文所述的包含多个融合体的融合体组合物、融合体组合物或药物组合物,其中以使得受试者中的功能得以递送或靶定的量和/或时间施用融合体组合物。

[0387] 在一些方面,本文提供了治疗患者中疾病或病症的方法,其包括向受试者施用如

本文所述的包含多个融合体的融合体组合物、融合体组合物或药物组合物,其中以使得疾病或病症得以治疗的量和/或时间施用融合体组合物。

[0388] 在一些方面,本文提供了向人类受试者施用融合体组合物的方法,其包括

[0389] a) 在允许第一融合剂布置于受试者中一个或多个靶细胞中的条件下,向受试者施用第一融合剂,其中以下的一种或多种:

[0390] i) 施用第一融合剂包括在允许第一融合剂在一个或多个靶细胞中表达的条件下施用编码第一融合剂的核酸,或

[0391] ii) 第一融合剂不包含卷曲螺旋基序,和

[0392] b) 向人类受试者施用包括多个包含第二融合剂的融合体的融合体组合物,其中第二融合剂与第一融合剂相容,其中多个融合体进一步包含膜蛋白有效载荷剂(例如,其相对于源细胞是外源的或过表达的);

[0393] 从而向受试者施用融合体组合物。

[0394] 在一些方面,本文提供了将膜蛋白有效载荷剂递送至受试者的方法,其包括:

[0395] a) 在允许第一融合剂布置于受试者中一个或多个靶细胞中的条件下,向受试者施用第一融合剂,其中以下的一种或多种:

[0396] i) 施用第一融合剂包括在允许第一融合剂在一个或多个靶细胞中表达的条件下施用编码第一融合剂的核酸,或

[0397] ii) 第一融合剂不包含卷曲螺旋基序,和

[0398] b) 向人类受试者施用包括多个包含第二融合剂和治疗剂的融合体的融合体组合物,其中第二融合剂与第一融合剂相容,其中多个融合体进一步包含膜蛋白有效载荷剂;

[0399] 从而将膜蛋白有效载荷剂递送至受试者。

[0400] 在一些方面,本文提供了调控,例如增强,受试者中生物学功能的方法,其包括:

[0401] a) 在允许第一融合剂布置于受试者中一个或多个靶细胞中的条件下,向受试者施用第一融合剂,其中以下的一种或多种:

[0402] i) 施用第一融合剂包括在允许第一融合剂在一个或多个靶细胞中表达的条件下施用编码第一融合剂的核酸,或

[0403] ii) 第一融合剂不包含卷曲螺旋基序,和

[0404] b) 向人类受试者施用包括多个包含第二融合剂的融合体的融合体组合物,其中第二融合剂与第一融合剂相容,其中多个融合体进一步包含膜蛋白有效载荷剂;

[0405] 从而调控受试者中的生物学功能。

[0406] 本文的任何方面,例如上述融合体、融合体组合物、制剂和方法,可以与本文中的一个或多个实施方案,例如一个或多个本文所述的实施方案组合。

[0407] 在一些实施方案中,生物学功能选自:

[0408] a) 调控,例如增加或降低,两个细胞之间的相互作用;

[0409] b) 调控,例如增加或降低,免疫应答;

[0410] c) 调控,例如增加或降低,细胞募集至靶组织;

[0411] d) 降低癌症的生长速率;或

[0412] e) 减少受试者中的癌细胞数。

[0413] 在一些实施方案中,当存在胞吞作用的抑制剂的情况下与靶细胞群体接触时,

以及当与未经胞吞作用的抑制剂处理的参考靶细胞群体接触时,与参考靶细胞群体相比,多个融合体将货物递送至至少30%、40%、50%、60%、70%或80%的靶细胞群体中的细胞数。

[0414] 在一些实施方案中,当多个融合体与包含靶细胞和非靶细胞的细胞群体接触时,与非靶细胞相比,货物在多至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍的靶细胞中存在。在一些实施方案中,多个融合体以比非靶细胞高至少50%的速率与靶细胞融合。

[0415] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂不是,不包含,不编码以下项或者不与编码以下项的序列互补:连接蛋白、CFTR、促甲状腺激素受体、髓磷脂蛋白零、黑皮质素(melacortin) 4、髓磷脂蛋白脂蛋白、低密度脂蛋白受体、ABC转运蛋白、CD81、mCAT-1、CXCR4、CD4、CCR5、富含唾液酸的蛋白质、密封蛋白、CD21、T细胞受体、B细胞受体、TNFR1、CD63、GLUT4、VEGF或ICAM。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码嵌合蛋白,所述嵌合蛋白不结合靶细胞的细胞表面标志物或靶细胞部分,且不包含荧光蛋白。

[0416] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含治疗性蛋白质,例如本文所述的治疗性蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含高尔基体蛋白质、分泌蛋白或内质网蛋白质或其组合。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂不包含以下一种或多种:二聚体(例如,对源细胞外源的二聚体)、异二聚体(例如,对源细胞外源的异二聚体)或二聚化域(例如,对源细胞外源的多肽中的二聚化域)。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含编码膜蛋白的核酸(例如DNA或RNA)。在一些实施方案中,融合剂是非病毒融合剂,例如哺乳动物融合剂。在一些实施方案中,融合剂(例如,外源或过表达的融合剂)不促进来自源细胞的囊泡形成。在一些实施方案中,融合体包含去核细胞。

[0417] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码包含跨膜域的膜蛋白。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码脂质锚定的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码结合跨膜蛋白的蛋白质。例如,蛋白质可以是结合跨膜蛋白的细胞外部分的细胞外蛋白质,或者蛋白质可以是结合跨膜蛋白的细胞内部分的细胞内蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码缺少跨膜域的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码部分跨越膜(例如靶细胞或融合体的膜)且不完全跨越膜的蛋白质。例如,在一些实施方案中,蛋白质包含面内膜螺旋或蛋白质包含不完全跨越膜的疏水环。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码不包含跨膜域的蛋白质,其中该蛋白质与膜表面相互作用,例如,通过静电或离子相互作用。

[0418] 在一些实施方案中,如本文所述,将膜蛋白有效载荷剂递送至靶细胞的膜的融合体进一步能够将一种或多种药剂,例如蛋白质、核酸(例如,DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等)、细胞器和/或代谢物递送(例如,递送)至靶细胞的胞质溶胶。因此,在一些实施方案中,本文提供的方法包括将试剂递送至靶细胞的胞质溶胶;在一些此类实施方案中,胞质溶胶递送的药剂是蛋白质(或编码该蛋白质的核酸或者与编码该蛋白质的核酸互补的核酸,例如,编码该蛋白质的DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等)。

[0419] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:8144-16131的序列。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:8144-16131的序列的片段、变体或同源物。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含编码包含美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:

8144-16131的序列的蛋白质的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含编码蛋白质的核酸,所述蛋白质包含美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:8144-16131的序列的片段、变体或同源物。

[0420] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表5-15的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表5-15的蛋白质的片段、变体或同源物。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含编码蛋白质的核酸,所述蛋白质是或包含选自表5-15的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含编码蛋白质的核酸,所述蛋白质包含选自表5-15的蛋白质的片段、变体或同源物。

[0421] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含含有抗原结合域的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR是或包含第一代CAR,其包含抗原结合域、跨膜域和信号传导域(例如,一个、两个或三个信号传导域)。在一些实施方案中,CAR是或包含第二代CAR,其包含抗原结合域、跨膜域和两个信号传导域。在一些实施方案中,CAR包含第三代CAR,其包含抗原结合域、跨膜域和至少三个信号传导域。在一些实施方案中,第四代CAR,其包含抗原结合域、跨膜域、三个或四个信号传导域以及在成功地信号传导CAR时诱导细胞因子基因表达的域。在一些实施方案中,抗原结合域是或包含scFv或Fab。

[0422] 在一些实施方案中,抗原结合域靶向新生性细胞的特征性抗原。在一些实施方案中,新生性细胞的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、表皮生长因子受体(EGFR)(包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3和ErbB4/HER4)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)(包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18和FGF21)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)(包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF)、RET受体和Eph受体家族(包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophin、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸(glycin)受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘氨醇-1-磷酸受体(S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多跨越跨膜蛋白、T细胞受体基序;T细胞 α 链;T细胞 β 链;T细胞 γ 链;T细胞 δ 链;CCR7;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD40;CD45RA;CD45RO;CD52;CD56;CD62L;CD68;CD80;CD95;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD163;F4/80;IL-4Ra;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;转铁蛋白受体;NKp46、穿孔素、CD4⁺;Th1;Th2;Th17;Th40;Th22;Th9;Tfh、规范Treg、FoxP3⁺;Tr1;Th3;Treg17;T_{RE}G;CDP1、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如,CD2、CD3、GM2)、Lewis- γ^2 、VEGF、VEGFR 1/2/3、 α V β 3、 α 5 β 1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、生腱蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1 β 、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、平滑受体(Smoothened)、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR或ANTXR1、叶酸受体 α (FR α)、ERBB2(Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生长因子受体(EGFR)、间皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、

GD3、BCMA、MUC16 (CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13R α 1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、白介素-11受体a(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生长因子受体-beta(PDGFR-beta)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体beta、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、legumain、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活蛋白、端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受体、周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TEST1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A,B,C) CD49f、CD151 CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC,或其抗原性片段或抗原性部分。

[0423] 在一些实施方案中,抗原结合域靶向T细胞的特征性抗原。在一些实施方案中,T细胞的特征性抗原选自T细胞的特征性细胞表面受体,膜转运蛋白(例如,主动或被动转运蛋白,如例如离子通道蛋白、孔形成蛋白等),跨膜受体,膜酶和/或细胞粘附蛋白。在一些实施方案中,T细胞的特征性抗原可以是G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、AKT1;AKT2;AKT3;ATF2;BCL10;CALM1;CD3D (CD3 δ);CD3E (CD3 ϵ);CD3G (CD3 γ);CD4;CD8;CD28;CD45;CD80 (B7-1);CD86 (B7-2);CD247 (CD3 ζ);CTLA4 (CD152);ELK1;ERK1 (MAPK3);ERK2;FOS;FYN;GRAP2 (GADS);GRB2;HLA-DRA;HLA-DRB1;HLA-DRB3;HLA-DRB4;HLA-DRB5;HRAS;IKBKA (CHUK);IKBKB;IKBKE;IKBKG (NEMO);IL2;ITPR1;ITK;JUN;KRAS2;LAT;LCK;MAP2K1 (MEK1);MAP2K2 (MEK2);MAP2K3 (MKK3);MAP2K4 (MKK4);MAP2K6 (MKK6);MAP2K7 (MKK7);MAP3K1 (MEKK1);MAP3K3;MAP3K4;MAP3K5;MAP3K8;MAP3K14 (NIK);MAPK8 (JNK1);MAPK9 (JNK2);MAPK10 (JNK3);MAPK11 (p38 β);MAPK12 (p38 γ);MAPK13 (p38 δ);MAPK14 (p38 α);NCK;NFAT1;NFAT2;NFKB1;NFKB2;NFKBIA;NRAS;PAK1;PAK2;PAK3;PAK4;PIK3C2B;PIK3C3 (VPS34);PIK3CA;PIK3CB;PIK3CD;PIK3R1;PKCA;PKCB;PKCM;PKCQ;PLCY1;PRF1 (穿孔素);PTEN;RAC1;RAF1;RELA;SDF1;SHP2;SLP76;SOS;SRC;TBK1;TCRA;TEC;TRAF6;VAV1;VAV2;或ZAP70。

[0424] 在一些实施方案中,抗原结合域靶向自身免疫或炎性病症的特征性抗原。在一些实施方案中,自身免疫或炎性病症选自慢性移植物抗宿主病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、肺出血肾炎(goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化、冷凝集素疾病、寻常性天疱疮、格雷夫氏病、自身免疫性溶血性贫血、血友病A、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、伊文氏综合征、IgM介导的神经病变、冷球蛋白血症(cyroglobulinemia)、皮炎、特发性血小板减少、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多发性神经病和

自身免疫性血小板减少症或中性粒细胞减少症或纯红细胞再生障碍,而同种免疫疾病的示例性非限制性实例包括同种致敏作用(参见例如Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15 (4) :931-41) 或造血或实体器官移植的异种致敏作用、输血,妊娠伴胎儿同种致敏作用、新生儿同种免疫性血小板减少症、新生儿溶血性疾病、对外来抗原的致敏作用,如可以发生在用酶或蛋白质替代疗法、血液产品和基因疗法治疗的遗传性或获得性缺陷疾病的替代中。在一些实施方案中,自身免疫或炎症病症的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。在一些实施方案中,CAR抗原结合域与在B细胞、浆细胞、浆母细胞上表达的配体,CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、干扰素受体、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3 gamma、CD5或CD2结合。

[0425] 在一些实施方案中,抗原结合域靶向传染性疾病的特征性抗原。在一些实施方案中,其中传染性疾病的特征性抗原选自HIV、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人疱疹病毒、人疱疹病毒8 (HHV-8, 卡波济肉瘤相关疱疹病毒 (KSHV)), 人T淋巴营养性病毒-1 (HTLV-1)、默克尔细胞多瘤病毒 (MCV)、猿猴病毒40 (SV40)、埃巴病毒、CMV、人乳头瘤病毒。在一些实施方案中,传染性疾病的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体,受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、HIV Env、gp120或CD4诱导HIV-1Env上的表位。

[0426] 在一些实施方案中,CAR跨膜域包含至少以下的跨膜区:T细胞受体的alpha、beta或zeta链、CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能变体。在一些实施方案中,跨膜域包含至少以下的跨膜区:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B或其功能变体。

[0427] 在一些实施方案中,CAR包含选自以下的一个或多个的至少一个信号传导域:B7-1/CD80;B7-2/CD86;B7-H1/PD-L1;B7-H2;B7-H3;B7-H4;B7-H6;B7-H7;BTLA/CD272;CD28;CTLA-4;Gi24/VISTA/B7-H5;ICOS/CD278;PD-1;PD-L2/B7-DC;PDCD6);4-1BB/TNFSF9/CD137;4-1BB配体/TNFSF9;BAFF/BLyS/TNFSF13B;BAFF R/TNFRSF13C;CD27/TNFRSF7;CD27配体/TNFSF7;CD30/TNFRSF8;CD30配体/TNFSF8;CD40/TNFRSF5;CD40/TNFSF5;CD40配体/TNFSF5;DR3/TNFRSF25;GITR/TNFRSF18;GITR配体/TNFSF18;HVEM/TNFRSF14;LIGHT/TNFSF14;淋巴毒素-alpha/TNF-beta;OX40/TNFRSF4;OX40配体/TNFSF4;RELT/TNFRSF19L;TACI/TNFRSF13B;TL1A/TNFSF15;TNF-alpha;TNF RII/TNFRSF1B);2B4/CD244/SLAMF4;BLAME/SLAMF8;CD2;CD2F-10/SLAMF9;CD48/SLAMF2;CD58/LFA-3;CD84/SLAMF5;CD229/SLAMF3;CRACC/SLAMF7;NTB-A/SLAMF6;SLAM/CD150);CD2;CD7;CD53;CD82/Kai-1;CD90/Thy1;CD96;CD160;CD200;CD300a/LMIR1;HLA I类;HLA-DR;Ikaros;整联蛋白alpha 4/CD49d;整联蛋白alpha 4beta1;整联蛋白alpha 4beta 7/LPAM-1;LAG-3;TCL1A;TCL1B;CRTAM;DAP12;Dectin-1/CLEC7A;DPPIV/CD26;EphB6;TIM-1/KIM-1/HAVCR;TIM-4;TSLP;TSLP R;淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1);NKG2C、CD3 zeta域、基于免疫受体酪氨酸的激

活基序 (ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体,或其功能片段。

[0428] 在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 或其功能变体; (ii) CD28域或其功能变体; 和 (iii) 4-1BB域或CD134域或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 或其功能变体; (ii) CD28域或4-1BB域或其功能变体和/或 (iii) 4-1BB域或CD134域或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 或其功能变体; (ii) CD28域或其功能变体; (iii) 4-1BB域或CD134域或其功能变体; 和 (iv) 细胞因子或共刺激配体转基因。

[0429] 在一些实施方案中,CAR进一步包含一个或多个间隔区,例如,其中其中间隔区是抗原结合域和跨膜域之间的第一间隔区。在一些实施方案中,第一间隔区包括免疫球蛋白恒定区或其变体或修饰形式的至少一部分。在一些实施方案中,间隔区是跨膜域和信号传导域之间的第二间隔区。在一些实施方案中,第二间隔区是寡肽,例如其中寡肽包含甘氨酸-丝氨酸双峰。

[0430] 在一些实施方案中,融合体在靶细胞的表面与靶细胞融合。在一些实施方案中,融合体以与独立于溶酶体的方式促进与靶细胞融合。在一些实施方案中,融合体和/或融合体内容物通过胞吞作用或经由非内吞途径进入靶细胞。在一些实施方案中,融合体通过胞吞作用进入靶细胞,例如,其中对于给定的融合体经由内吞途径递送的膜蛋白有效载荷剂的水平为0.01-0.6、0.01-0.1、0.1-0.3、or 0.3-0.6,或比氯喹处理的参考细胞至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,例如使用实施例91的测定法。在一些实施方案中,融合体通过非内吞途径进入靶细胞,例如,其中对于给定的融合体经由非内吞途径递送的膜蛋白有效载荷剂的水平为0.1-0.95、0.1-0.2、0.2-0.3、0.3-0.4、0.4-0.5、0.5-0.6、0.6-0.7、0.7-0.8、0.8-0.9、0.9-0.95,或比氯喹处理的参考细胞至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,例如使用实施例90的测定法。

[0431] 在一些实施方案中,靶细胞包含聚集或错误折叠的膜蛋白。在一些实施方案中,融合体和/或其组合物或制剂能够降低靶细胞中聚集或错误折叠的蛋白质的水平(例如,降低水平),或者本文的方法包括降低靶细胞中聚集或错误折叠的蛋白质的水平。

[0432] 如本文所述,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够将膜蛋白递送(例如,递送了)至靶细胞的细胞膜。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括将膜蛋白递送至靶细胞的细胞膜。在一些实施方案中,递送蛋白质包括将编码蛋白质的核酸(例如,DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等)递送至靶细胞,使得靶细胞产生蛋白质并将其定位在膜上。在一些实施方案中,融合体包含,或方法进一步包括递送蛋白质,并且融合体与靶细胞的融合将蛋白质转移至靶细胞的细胞膜。在一些实施方案中,药剂包含细胞表面配体或结合细胞表面受体的抗体。在一些实施方案中,融合体进一步包含,或方法进一步包括递送包含或编码第二细胞表面配体或结合细胞表面受体的抗体的第二药剂,以及任选地进一步包含或编码一个或多个另外的细胞表面配体或结合细胞表面受体的抗体(例如,1、2、3、4、5、10、20、50个或更多个)。在一些实施方案中,第一药剂和第二药剂形成复合物,其中任选地复合物

进一步包含一个或多个另外的细胞表面配体。在一些实施方案中,药剂包含或编码细胞表面受体、例如,相对于源细胞是外源的或过表达的细胞表面。在一些实施方案中,提供的融合体进一步包含,或方法进一步包括递送第二药剂,所述第二药剂包含或编码第二细胞表面受体且任选地进一步包含或编码一个或多个另外的细胞表面受体(例如,1、2、3、4、5、10、20、50个或更多个细胞表面受体)。

[0433] 在一些实施方案中,第二药剂,例如治疗剂,选自蛋白质、蛋白质复合物(例如,包含至少2、3、4、5、10、20或50种蛋白质,例如,至少2、3、4、5、10、20或50种不同蛋白质)、多肽、核酸(例如,DNA、染色体或RNA,例如,mRNA、siRNA或miRNA)或小分子。

[0434] 在一些实施方案中,第一药剂和第二药剂形成复合物,其中任选地复合物进一步包含一个或多个另外的细胞表面受体。在一些实施方案中,药剂包含或编码抗原或抗原呈递蛋白。

[0435] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够将分泌的药剂,例如分泌的蛋白质,递送(例如,递送了)至靶位点(例如,细胞外区域),例如,通过在允许靶细胞产生和分泌蛋白质的条件下,将编码蛋白质的核酸(例如,a DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等)递送至靶细胞。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括递送如本文所述的分泌的药剂。在实施方案中,分泌的蛋白质相对于源细胞是内源的或外源的;在一些实施方案中,分泌的蛋白质对靶细胞是内源的或外源的。在实施方案中,分泌的蛋白质包含蛋白质治疗剂,例如抗体分子、细胞因子或酶。在实施方案中,分泌的蛋白质包含自分泌信号传导分子或旁分泌信号传导分子。在实施方案中,分泌的药剂包含分泌颗粒。

[0436] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够递送(例如,递送)膜蛋白或分泌的蛋白质,所述膜蛋白或分泌的蛋白质是或包含抗原。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够递送(例如,递送了)膜蛋白或分泌的蛋白质,所述膜蛋白或分泌的蛋白质是或包含抗原呈递蛋白,任选地与抗原一起(作为复合物)。

[0437] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够将一个或多个细胞表面受体贡献(例如,贡献)至靶细胞(例如,免疫细胞)。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括贡献一个或多个细胞表面受体。

[0438] 在一些实施方案中,靶细胞是或包含肿瘤细胞。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够递送(例如,递送)膜或分泌的蛋白质,所述膜或分泌的蛋白质是或包含免疫刺激配体、抗原呈递蛋白、肿瘤抑制蛋白、促凋亡蛋白或上述任何一种的受体或结合配偶体。在一些实施方案中,融合体包含药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或至少一种第二药剂),其是免疫调节性的,例如免疫刺激性的。

[0439] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够引起(例如,引起)靶细胞呈递抗原。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括呈递靶细胞上的抗原。

[0440] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够将核酸递送(例如,递送)至靶细胞,例如,以瞬时修饰靶细胞中的基因表达或例如通过整合到靶细胞的基因组而对其进行修饰,例如以引起本文所述的膜蛋白(或分泌的蛋白质)的表达。

[0441] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够将蛋白质(例如,膜蛋白,如转运蛋白或分泌的蛋白质,如免疫抑制蛋白)递送(例如,递送)至靶细胞,使得至少暂时地挽救了靶细胞的蛋白质缺乏。

[0442] 在实施方案中,如本文所述由膜蛋白有效载荷剂提供或作为膜蛋白有效载荷剂提供的膜蛋白是或包含免疫球蛋白部分或实体(例如,抗体、Fab、scFv、scFab、sdAb、双重抗体(duobody)、微型抗体、纳米抗体、双抗体(diabody)、zybody、骆驼科动物抗体、BiTE、quadroma、bsDb等)。在一些实施方案中,膜蛋白可以包括一个或多个共价缔合的非肽部分,如一个或多个碳水化合物部分、脂质部分、聚乙二醇部分、小分子等,及其组合。

[0443] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够引起(例如,引起)靶细胞分泌蛋白质,例如治疗性蛋白质。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括使靶细胞分泌蛋白质。

[0444] 在实施方案中,如本文所述由膜蛋白有效载荷剂提供或作为膜蛋白有效载荷剂的膜蛋白是或包含一种或多种细胞表面配体(例如1、2、3、4、5、10、20、50个或更多个细胞表面配体)。类似地,在一些实施方案中,本文的方法包括将一个或多个细胞表面配体呈递至靶细胞。在一些实施方案中,具有细胞表面配体的融合体来自选自以下的源细胞:嗜中性粒细胞(例如,且靶细胞是肿瘤浸润淋巴细胞)、树突状细胞(例如,且靶细胞是初始T细胞)或嗜中性粒细胞(例如,且靶标是肿瘤细胞或病毒感染的细胞)。在一些实施方案中,此类融合体包含膜复合物,例如包含至少2、3、4或5种蛋白质的复合物,例如同二聚体、异二聚体、同三聚体、异三聚体、同四聚体或异四聚体。在一些实施方案中,此类融合体包含抗体,例如毒性抗体,例如融合体和/或其组合物或制剂能够将抗体递送(例如,递送了)至靶位点,例如通过归巢至靶位点。在一些实施方案中,源细胞是NK细胞或嗜中性粒细胞。

[0445] 在一些实施方案中,膜蛋白选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、表皮生长因子受体(EGFR)(包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3和ErbB4/HER4)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)(包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18和FGF21)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)(包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF)、RET受体和Eph受体家族(包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophin、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘氨醇-1-磷酸受体(S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多跨越跨膜蛋白、T细胞受体基序;T细胞 α 链;T细胞 β 链;T细胞 γ 链;T细胞 δ 链;CCR7;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD40;CD45RA;CD45RO;CD52;CD56;CD62L;CD68;CD80;CD95;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD163;F4/80;IL-4Ra;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;转铁蛋白受体;NKp46、穿孔素、CD4⁺;Th1;Th2;Th17;Th40;Th22;Th9;Tfh、规范Treg、FoxP3⁺;Tr1;Th3;Treg17;T_{REG};CDCP1、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如,CD2、CD3、GM2)、Lewis- γ^2 、VEGF、VEGFR 1/2/3、 α v β 3、 α 5 β 1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、生腱蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1 β 、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、平滑受体(Smoothened)、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR或

ANTXR1、叶酸受体 α (FR α)、ERBB2 (Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生长因子受体 (EGFR)、间皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16 (CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13R α 1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、白介素-11受体 α (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生长因子受体-beta (PDGFR-beta)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、岩藻糖基GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体 beta、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、legumain、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活蛋白、端粒酶、PCTA-1/半乳凝素 8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受体、周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OYTES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A,B,C) CD49f、CD151 CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC。

[0446] 在一些实施方案中，融合体与靶细胞或靶细胞的表面特征缔合和/或结合。

[0447] 在一些实施方案中，本文的方法包括引起蛋白质从靶细胞分泌或在靶细胞的表面上的配体呈递。在一些实施方案中，融合体和/或其组合物或制剂能够引起靶细胞的细胞死亡。在一些实施方案中，融合体来自NK源细胞。

[0448] 在一些实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂感测和/或响应一个或多个局部环境特征，如例如代谢物，白介素、抗原等或其组合。

[0449] 在一些实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂能够趋化、渗出和/或一种或多种代谢活性。在实施方案中，代谢活性选自犬尿氨酸 (kynurenine)、糖异生、前列腺素脂肪酸氧化、腺苷代谢、尿素循环和产热呼吸。在一些实施方案中，源细胞是嗜中性粒细胞，并且融合体和/或其组合物或制剂能够归巢到损伤部位。在一些实施方案中，源细胞是巨噬细胞，并且融合体和/或其组合物或制剂能够吞噬。在一些实施方案中，源细胞是棕色脂肪组织细胞，并且融合体和/或其组合物或制剂能够脂解。

[0450] 在一些实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂包含 (例如能够递送至靶细胞) 多种药剂 (例如，至少2、3、4、5、10、20或50种药剂)，其中至少一种药剂是或包含膜蛋白有效载荷；在一些此类实施方案中，一种或多种药剂是或包含抑制性核酸 (例如，siRNA或miRNA) 和/或mRNA。

[0451] 在一些实施方案中，提供的包含 (例如能够递送至靶细胞的) 膜蛋白有效载荷剂的融合体和/或其组合物或制剂能够重编程或转分化靶细胞，例如融合体 (和/或其组合物) 包含一种或多种诱导靶细胞重编程或转分化的药剂。

[0452] 在一些实施方案中，融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合，例如，高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%，例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中，融合体以比与非靶细胞高至少10%的速率与靶细胞

融合,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,与其他融合体相比,融合体以更高的速率与靶细胞融合,例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,与其他融合体相比,融合体以高至少50%的速率与靶细胞融合,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂得以在24、48或72小时后递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂在24小时后得以递送至至少10%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中。

[0453] 在一些实施方案中,融合剂以每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的。在一些实施方案中,融合剂以至少1,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的。在一些实施方案中,融合体包含的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的融合剂布置于细胞膜中,在实施方案中,融合体在内部例如在细胞质或细胞器中还包含融合剂。

[0454] 在一些实施方案中,融合体包含处于每融合体至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的治疗剂(例如,治疗性膜蛋白有效载荷剂),例如如通过实施例43的测定法所测量的。在一些实施方案中,融合体包含处于至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的蛋白质治疗剂,例如如通过实施例43的测定法所测量的。在一些实施方案中,融合体包含处于至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的核酸治疗剂。在一些实施方案中,融合体包含处于至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的DNA治疗剂。在一些实施方案中,融合体包含处于至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的RNA治疗剂。在一些实施方案中,融合体包含相对于源细胞外源的处于至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的治疗剂。在一些实施方案中,融合体包含相对于源细胞外源的处于至少10、50、100、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的蛋白质治疗剂。在一些实施方案中,融合体包含相对于源细胞外源的处于至少10、50、100、

500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的拷贝数的核酸(例如,DNA或RNA)治疗剂。在一些实施方案中,融合剂的拷贝数与治疗剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间。在一些实施方案中,融合剂的拷贝数与膜蛋白有效载荷剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间。

[0455] 在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的治疗剂(例如,治疗性膜蛋白有效载荷剂)。在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的蛋白质治疗剂。在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的核酸治疗剂。在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的RNA治疗剂。在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝的DNA治疗剂。

[0456] 在一些实施方案中,融合体向靶细胞递送至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的由融合体所包含的膜蛋白有效载荷剂(例如,治疗剂,例如,相对于源细胞内源或外源的治疗剂)。在一些实施方案中,与靶细胞融合的融合体向靶细胞递送平均至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的由与靶细胞融合的融合体所包含的膜蛋白有效载荷剂(例如,治疗性膜蛋白有效载荷剂、例如,内源治疗性膜蛋白有效载荷剂或相对于源细胞外源的治疗性膜蛋白有效载荷剂)。在一些实施方案中,融合体组合物向靶组织递送至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的由融合体组合物所包含的膜蛋白有效载荷剂(例如,膜蛋白有效载荷剂,例如,相对于源细胞外源的治疗性膜蛋白有效载荷剂)。

[0457] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂包含融合体中每mg的总蛋白质0.00000001mg融合剂至1mg融合剂,例如,融合体中每mg的总蛋白质0.00000001-

0.0000001、0.0000001-0.000001、0.000001-0.00001、0.00001-0.0001、0.0001-0.001、0.001-0.01、0.01-0.1或0.1-1mg融合剂。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂包含融合体中每mg的脂质0.00000001mg融合剂至5mg融合剂,例如,融合体中每mg的脂质0.00000001-0.0000001、0.0000001-0.000001、0.000001-0.00001、0.00001-0.0001、0.0001-0.001、0.001-0.01、0.01-0.1、0.1-1或1-5mg融合剂。

[0458] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于与源细胞的脂质组成基本上相似的脂质组成,或者其中CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG的一种或多种在、例如,源细胞中相应脂质水平10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%的内,例如在75%内。

[0459] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在源细胞中心磷脂:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂盐(lysophosphatidate)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂酰乙醇胺(lyso-phosphatidylethanolamine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂酰甘油(lyso-phosphatidylglycerol)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂酰肌醇(lyso-phosphatidylinositol)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:溶血磷脂酰丝氨酸(lyso-phosphatidylserine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酸盐(phosphatidate)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:胆固醇酯的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:胆固醇酯的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:鞘磷脂的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:鞘磷脂的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:三酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内

的磷脂酰胆碱:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰胆碱的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:磷脂酸盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的心磷脂:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中心磷脂:磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:胆固醇酯的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:胆固醇酯的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:鞘磷脂的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:鞘磷脂的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰胆碱:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰胆碱:三酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰胆碱的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:磷脂酸盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中

磷脂酰乙醇胺:磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:胆固醇酯的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:胆固醇酯的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:鞘磷脂的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:鞘磷脂的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰乙醇胺:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰乙醇胺:三酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰胆碱的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:磷脂酸盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:胆固醇酯的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:胆固醇酯的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:鞘磷脂的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:鞘磷脂的比率;或者在于在源细胞中磷脂酰丝氨酸:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的磷脂酰丝氨酸:三酰甘油的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂酰胆碱的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:溶血磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中

鞘磷脂:磷脂酸盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:胆固醇酯的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:胆固醇酯的比率;或者在于在源细胞中鞘磷脂:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的鞘磷脂:三酰甘油的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:二酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:二酰甘油的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:己糖神经酰胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:己糖神经酰胺的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂盐的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂酰胆碱的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂酰胆碱的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂酰乙醇胺的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂酰乙醇胺的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:溶血磷脂酰丝氨酸的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:溶血磷脂酰丝氨酸的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:磷脂酸盐的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:磷脂酸盐的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:磷脂酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:磷脂酰甘油的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:磷脂酰肌醇的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:磷脂酰肌醇的比率;或者在于在源细胞中胆固醇酯:三酰甘油的比率的10%、20%、30%、40%或50%内的胆固醇酯:三酰甘油的比率。

[0460] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于与源细胞的蛋白质组组合物相似的蛋白质组组合物,例如使用实施例42的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与蛋白质的比率,例如如使用实施例49的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的蛋白质与核酸(例如DNA或RNA)的比率,例如如使用实施例50的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于大于源细胞中相应比率的蛋白质与DNA的比率,例如,大至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如如使用实施例50的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在源细胞中相应比率的10%、20%、30%、40%或50%内的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如如使用实施例51的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于大于源细胞中相应比率的脂质与核酸(例如DNA)的比率,例如,大至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如如使用实施例51的测定法所测量的。

[0461] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在参考细胞

(例如源细胞)的半衰期的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的受试者中(例如在小鼠中)的半衰期,例如通过实施例75的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于至少1个小时、2个小时、3个小时、4个小时、5个小时、6个小时、12个小时或24个小时的受试者中(例如在小鼠中)的半衰期,例如在人类受试者中或小鼠中,例如通过实施例75的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够递送(例如,递送了)膜蛋白有效载荷剂(例如,治疗剂),其特征在于比融合体的半衰期长的受试者中的半衰期,例如长至少10%、20%、50%、2倍、5倍或10倍。例如,融合体可以将治疗剂递送至靶细胞,并且药剂可以在所述脂质体不再存在或可检测之后存在。

[0462] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂跨膜运输葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG),例如比阴性对照(例如在不存在葡萄糖的情况下在其他方面相似的融合体)至少多1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如如使用实施例64的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于腔中在参考细胞(例如源细胞或小鼠胚胎成纤维细胞)中酯酶活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的酯酶活性,例如使用实施例66的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞)中代谢活性水平的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的代谢活性水平(例如柠檬酸合酶活性),例如如实施例68中所述。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞)中代谢活性水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的代谢活性水平(例如柠檬酸合酶活性),例如如实施例68中所述。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞)中呼吸水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的呼吸水平(例如耗氧率),例如如实施例69中所述。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于至多18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000或10,000MFI的膜联蛋白V染色水平,例如使用实施例70的测定法,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的在其他方面相似的融合体或其组合物或制剂的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的膜联蛋白V染色水平,或者其中融合体包含比在实施例70的测定法中用甲萘醌处理的巨噬细胞的膜联蛋白V染色水平低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的膜联蛋白V染色水平。

[0463] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于比源细胞的miRNA含量水平至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的源细胞的miRNA含量水平(例如,高达100%的源细胞

的miRNA含量水平)的miRNA含量水平,例如通过实施例39的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的源细胞的总RNA含量水平(例如,高达100%的源细胞的总RNA含量水平)的总RNA含量水平,例如如通过实施例108的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于比源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%内,例如通过实施例47的测定法。在一些实施方案中,融合体具有在源细胞的可溶性:非可溶性蛋白质比率的90%内的可溶性:非可溶性蛋白质比率,例如通过实施例47的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于小于融合的脂质含量的5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%或更小的LPS水平,例如如通过实施例48的测定法所测量的。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够进行信号转导,例如传递细胞外信号,例如响应于胰岛素的AKT磷酸化,或响应于胰岛素的葡萄糖(例如标记的葡萄糖,例如2-NBDG)摄取,例如比阴性对照(例如在不存在胰岛素的情况下在其他方面相似的融合体)多至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,例如使用实施例63的测定法。在一些实施方案中,当施用于受试者(例如小鼠)时,融合体靶向组织,例如肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼,例如,其中所施用的融合体的群体中至少0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的融合体在24、48或72小时后存在于靶组织中,例如通过实施例87或100的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于比参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的近分泌信号传导水平,例如通过实施例71的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞或骨髓基质细胞(BMSC))诱导的近分泌信号传导水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(例如,高达100%)的近分泌信号传导的水平,例如通过实施例71的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于比参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导的水平高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的旁分泌信号传导水平,例如通过实施例72的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于参考细胞(例如源细胞或巨噬细胞)诱导的旁分泌信号传导水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(例如,高达100%)的,例如通过实施例72的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于与参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)中聚合化的肌动蛋白的水平相比,以1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%内的水平聚合化肌动蛋白,例如通过实施例73的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征

在于在参考细胞(例如源细胞或C2C12细胞)的膜电位的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%内的膜电位,例如通过实施例74的测定法,或者其中提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于约-20至-150mV、-20至-50mV、-50至-100mV或-100至-150mV的膜电位,或者其中融合体具有小于-1mv、-5mv、-10mv、-20mv、-30mv、-40mv、-50mv、-60mv、-70mv、-80mv、-90mv、-100mv的膜电位。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够从血管渗出,例如,以源细胞的渗出速率的至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如使用实施例57的测定法,例如,其中源细胞是嗜中性粒细胞、淋巴细胞、B细胞、巨噬细胞或NK细胞。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够趋化,例如,与参考细胞(例如巨噬细胞)相比至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(例如,高达100%),例如使用实施例58的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够吞噬,例如,与参考细胞(例如巨噬细胞)相比至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(例如,高达100%),例如使用实施例60的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够跨越细胞膜,例如内皮细胞膜或血脑屏障。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如,以比参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞)大至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的速率,例如使用实施例62的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂能够分泌蛋白质,例如,以与参考细胞(例如小鼠胚胎成纤维细胞)相比至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(例如,高达100%)的速率,例如使用实施例62的测定法。

[0464] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂不能够转录或者具有参考细胞(例如源细胞)的转录活性的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的转录活性,例如使用实施例19的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂不能够核DNA复制,或者具有参考细胞(例如源细胞)的核DNA复制的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的核DNA复制,例如使用实施例20的测定法。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂缺乏染色质或具有参考细胞(例如源细胞)的染色质含量的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的染色质含量,例如使用实施例37的测定法。

[0465] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征通过与参考细胞比较来描述。在实施方案中,参考细胞是源细胞。在实施方案中,参考细胞是HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的群体的特征通过与参考细胞的群体比较来描述,例如,源细胞的群体,或HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞的群体。

[0466] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂符合药物或良好生产规范(GMP)标准。在一些实施方案中,根据良好生产规范(GMP)制备提供的融合体和/或其组合物或制剂。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体。在一些实施方案中,提供的融合体和/

或其组合物或制剂具有低于预先确定的参考值的污染物(例如核组分,例如核DNA)水平,例如,基本上不含一种或多种指定的污染物。在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于具有低免疫原性,例如如本文所述。

[0467] 在一些实施方案中,源细胞或靶细胞是内皮细胞、成纤维细胞、血细胞(例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞)、干细胞(例如间充质干细胞、脐带干细胞、骨髓干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞,例如衍生自受试者细胞的诱导性多能干细胞)、胚胎干细胞(例如来自胚胎卵黄囊、胎盘、脐带、胎儿皮肤、青少年皮肤、血液、骨髓、脂肪组织、红细胞生成组织、造血组织的干细胞)、成肌细胞、实质细胞(例如肝细胞)、肺泡细胞、神经元(例如视网膜神经元细胞)、前体细胞(例如视网膜前体细胞、原粒细胞、髓样前体细胞、胸腺细胞、性母细胞、原巨核细胞、幼巨核细胞、成黑色素细胞、淋巴母细胞、骨髓前体细胞、正常红细胞或成血管细胞)、祖细胞(例如心脏祖细胞、卫星细胞、放射状胶质细胞、骨髓基质细胞、胰腺祖细胞、内皮祖细胞、母细胞)或永生化细胞(例如HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞)。在一些实施方案中,源细胞不是293细胞、HEK细胞、人内皮细胞或人上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或干细胞。在一些实施方案中,源细胞或靶细胞是白细胞或干细胞。在一些实施方案中,源细胞或靶细胞选自嗜中性粒细胞、淋巴细胞(例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞)、巨噬细胞、粒细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、胚胎干细胞或原粒细胞。

[0468] 在一些实施方案中,源细胞是在贴壁或悬浮条件下生长的细胞。在一些实施方案中,源细胞是原代细胞、培养的细胞、永生化细胞或细胞系(例如原粒细胞细胞系,例如C2C12)。在一些实施方案中,源细胞是同种异体的,例如从与靶细胞相同物种的不同生物体获得的。在一些实施方案中,源细胞是自体的,例如从与靶细胞相同的生物体获得的。在一些实施方案中,源细胞是异源的,例如,从与靶细胞不同的物种的生物体获得的。

[0469] 在一些实施方案中,源细胞进一步包含对源细胞外源的第二药剂,例如,治疗剂,例如,蛋白质或核酸(例如,RNA,例如,mRNA或miRNA)。在一些实施方案中,第二药剂以融合体所包含的至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000或1,000,000个拷贝数存在,或者以每融合体至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000或1,000,000个拷贝的平均水平存在。

[0470] 在一些实施方案中,与源细胞相比,融合体具有改变的,例如增加或降低的水平的一个或多个内源分子,例如,蛋白质或核酸,例如,由于用siRNA或基因编辑酶处理源细胞(例如哺乳动物源细胞)。在一些实施方案中,融合体包含至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000或1,000,000个拷贝的内源分子,或者以每融合体平均水平为至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000或1,000,000个拷贝的内源分子存在。在一些实施方案中,内源分子(例如,RNA或蛋白质)在融合体中以比其在源细胞中的浓度大至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 或 1.0×10^8 的浓度存在。在一些实施方案中,内源分子(例如,RNA或蛋白质)在融合体中以比其在源细胞中的浓度小至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 或 1.0×10^8

的浓度存在。

[0471] 在一些实施方案中,融合体包含治疗性膜蛋白有效载荷剂,例如,治疗性膜蛋白有效载荷剂,例如,相对于源细胞外源或内源的治疗性膜蛋白有效载荷剂。在一些实施方案中,治疗性膜蛋白有效载荷剂选自一种或多种蛋白质,例如,跨膜蛋白、细胞表面蛋白、分泌蛋白、受体、抗体;核酸,例如,DNA、染色体(例如人类人工染色体)、RNA或mRNA。

[0472] 在一些实施方案中,靶细胞在生物体中。在一些实施方案中,靶细胞是从生物体分离的原代细胞。在一些实施方案中,靶向域与靶细胞上的靶细胞部分(例如细胞表面特征)相互作用。在一些实施方案中,融合体不包含所述靶细胞部分。在一些实施方案中,融合体包含融合剂,其与靶细胞上的融合剂结合配偶体相互作用,从而允许融合体结合或融合至靶细胞。在一些实施方案中,融合体不包含所述融合剂结合配偶体。在一些实施方案中,靶向域不是融合剂的一部分。在一些实施方案中,融合蛋白包含靶向域。在一些实施方案中,融合剂结合配偶体是与靶细胞部分不同的实体或与靶细胞部分不同实体的一部分。在一些实施方案中,融合剂结合配偶体是靶细胞部分或是靶细胞部分的一部分。

[0473] 在一些实施方案中,融合体通过胞吞作用进入靶细胞,例如,其中经由内吞途径递送的药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)的水平比与相似融合体接触的氯喹处理的参考细胞0.01-0.6、0.01-0.1、0.1-0.3或0.3-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,例如使用实施例91的测定法。在一些实施方案中,进入靶细胞的融合体组合物或制剂中至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的融合体经由非内吞途径进入,例如,融合体经由与细胞表面融合进入靶细胞。在一些实施方案中,进入靶细胞的融合体组合物或制剂中至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的融合体进入细胞质(例如,不进入内体或溶酶体)。在一些实施方案中,进入靶细胞的融合体组合物或制剂中小于90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%或1%的融合体进入内体或溶酶体。在一些实施方案中,融合体通过非内吞途径进入靶细胞,例如,其中递送的药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)的水平为氯喹处理的参考细胞的水平的至少90%、95%、98%或99%,例如使用实施例91的测定法。在一些实施方案中,融合体经由发动蛋白介导的途径将药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)递送至靶细胞。在一些实施方案中,经由发动蛋白介导的途径递送的药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)的水平在比与相似融合体接触的Dynasore处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如实施例92的测定法中所测量。在一些实施方案中,融合体经由巨胞饮作用(macropinocytosis)递送将药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)递送至靶细胞。在一些实施方案中,经由巨胞饮作用递送的药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)的水平在比与相似融合体接触的EIPA处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如实施例92的测定法中所测量。在一些实施方案中,融合体经由肌动蛋白介导的途径将药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)递送至靶细胞。在一些实施方案中,经由肌动蛋白介导的途径递送的药剂(例如,膜蛋白有效载荷剂和/或第二药剂)的水平在比与相似融合体接触的拉春库林(Latrunculin)处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、

20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如实施例92的测定法中所测量。

[0474] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂具有<1、1-1.1、1.05-1.15、1.1-1.2、1.15-1.25、1.2-1.3、1.25-1.35或>1.35g/mL的密度,例如通过实施例33的测定法。

[0475] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂包含按蛋白质质量计小于0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%或10%源细胞或者小于0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%或10%的细胞具有功能性核。在一些实施方案中,融合体组合物或制剂中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的融合体包含细胞器,例如,线粒体。

[0476] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂包含至少0.01%-0.05%、0.05%-0.1%、0.1%-0.5%、0.5%-1%、1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%融合体,其中:i)融合剂以每融合体至少1,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的,ii)每融合体融合剂的拷贝数与膜蛋白有效载荷剂的拷贝数的比率在1,000,000:1和100,000:1、100,000:1和10,000:1、10,000:1和1,000:1、1,000:1和100:1、100:1和50:1、50:1和20:1、20:1和10:1、10:1和5:1、5:1和2:1、2:1和1:1、1:1和1:2、1:2和1:5、1:5和1:10、1:10和1:20、1:20和1:50、1:50和1:100、1:100和1:1,000、1:1,000和1:10,000、1:10,000和1:100,000或1:100,000和1:1,000,000之间或iii)膜蛋白有效载荷剂以每融合体至少1,000个拷贝的拷贝数存在,例如如通过实施例43的测定法所测量的。

[0477] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂包含相对于源细胞是外源的治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂相对于靶细胞是外源的。在一些实施方案中,外源性治疗剂选自一种或多种蛋白质,例如跨膜蛋白、细胞表面蛋白、分泌蛋白、受体、抗体;核酸,例如DNA、染色体(例如人类人工染色体)、RNA、mRNA、siRNA、miRNA或小分子。

[0478] 在实施方案中,提供的融合体通过胞吞作用或非内吞途径进入细胞。

[0479] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂不包含核。在一些实施方案中,融合体基本上不含核DNA。

[0480] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂经冷藏或冷冻。在实施方案中,提供的融合体不包含功能性核和/或提供的融合体组合物或制剂包含一个或多个不具有功能性核的融合体。在一些实施方案中,提供的融合体组合物或制剂包含按蛋白质质量计小于0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%或10%源细胞或者小于0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%或10%的细胞具有功能性核。在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂已经维持在所述温度至少1、2、3、6或12个小时;1、2、3、4、5或6天;1、2、3或4周;1、2、3或6个月;或1、2、3、4或5年。在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于维持在所述温度之前群体的活性的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的活性,例如,通过以下的一个或多个:

[0481] i)融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少1%、2%、3%、

4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%，例如在实施例54的测定法中；

[0482] ii) 与其他融合体相比，融合体以更高的速率与靶细胞融合，例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%，例如在实施例54的测定法中；

[0483] iii) 融合体以一定速率与靶细胞融合，使得融合体中的药剂在24、48或72小时后得以递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞，例如在实施例54的测定法中；或

[0484] iv) 融合剂的水平处于至少或不超过10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000或1,000,000个拷贝的拷贝数，例如如通过实施例29的测定法所测量的。

[0485] 在实施方案中，提供的融合体组合物或制剂在小于40℃的温度下稳定至少1、2、3、6或12个小时；1、2、3、4、5或6天；1、2、3或4周；1、2、3或6个月；或1、2、3、4或5年。在实施方案中，融合体组合物或制剂在小于-20℃的温度下稳定至少1、2、3、6或12个小时；1、2、3、4、5或6天；1、2、3或4周；1、2、3或6个月；或1、2、3、4或5年。在实施方案中，融合体组合物或制剂在小于-80℃的温度下稳定至少1、2、3、6或12个小时；1、2、3、4、5或6天；1、2、3或4周；1、2、3或6个月；或1、2、3、4或5年。

[0486] 在实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个：

[0487] i) 源细胞不是293细胞；

[0488] ii) 源细胞未经转化或永生化；

[0489] iii) 使用除腺病毒介导的永生化以外的其他方法使源细胞经转化或永生化，例如通过自发突变或端粒酶表达使之永生化；

[0490] iv) 融合剂不是VSVG、SNARE蛋白或分泌性颗粒蛋白；

[0491] v) 治疗剂不是Cre或GFP，例如EGFP；

[0492] vi) 治疗剂是例如在腔中对于源细胞是外源的核酸（例如，RNA，例如mRNA、miRNA或siRNA）或对于源细胞是外源的蛋白质（例如抗体，例如抗体）；

[0493] vii) 融合体不包含线粒体。

[0494] 或者/另外，在实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个：

[0495] i) 源细胞不是293或HEK细胞；

[0496] ii) 源细胞未经转化或永生化；

[0497] iii) 使用除腺病毒介导的永生化以外的其他方法使源细胞经转化或永生化，例如通过自发突变或端粒酶表达使之永生化；

[0498] iv) 融合剂不是病毒融合剂；

[0499] v) 融合体具有不在40和150nm之间的直径，例如，大于150nm、200nm、300nm、400nm或500nm；或

[0500] vi) 融合体具有至少约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm或200nm的直径，例如如通过实施例32的测定法所测量的。

[0501] 或者/另外，在实施方案中，提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个：

- [0502] i) 膜蛋白由源细胞表达;
- [0503] ii) 融合剂不是TAT、TAT-HA2、HA-2、gp41、阿尔茨海默氏症的beta淀粉样肽、仙台病毒蛋白或两亲性净负肽(WAE 11);
- [0504] iii) 融合剂是哺乳动物融合剂;
- [0505] iv) 融合体在其腔中包含选自酶、抗体或抗病毒多肽的多肽;
- [0506] v) 融合体不包含治疗性跨膜蛋白,例如,相对于源细胞外源的治疗性跨膜蛋白;或
- [0507] vi) 融合体不包含CD63或GLUT4。
- [0508] 或者/另外,在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个:
- [0509] i) 融合剂不是病毒蛋白质;
- [0510] ii) 融合剂不是促融合糖蛋白;
- [0511] iii) 融合剂是除受精素-beta以外的哺乳动物蛋白;
- [0512] iv) 融合剂不是VSVG、SNARE蛋白或分泌性颗粒蛋白;或
- [0513] v) 融合剂不是TAT、TAT-HA2、HA-2、gp41、阿尔茨海默氏症的beta淀粉样肽、仙台病毒蛋白或两亲性净负肽(WAE 11)。
- [0514] 或者/另外,在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个:
- [0515] i) 不包含病毒,不具有传染性或不在宿主细胞中繁殖;
- [0516] ii) 不是VLP(病毒样颗粒);
- [0517] iii) 不包含病毒结构蛋白,例如病毒衣壳蛋白,例如病毒核衣壳蛋白,或其中病毒衣壳蛋白的量小于10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%或0.1%的总蛋白质,例如通过实施例53的测定法;
- [0518] iv) 不包含病毒基质蛋白;
- [0519] v) 不包含病毒非结构蛋白;
- [0520] vi) 包含每囊泡小于10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、1,000,000,000个拷贝的病毒结构蛋白;或
- [0521] vii) 融合体不是病毒体。
- [0522] 或者/另外,在实施方案中,融合剂的拷贝数与融合体上病毒结构蛋白的拷贝数的比率为至少1,000,000:1、100,000:1、10,000:1、1,000:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1或1:1。在实施方案中,融合剂的拷贝数与融合体上病毒基质蛋白的拷贝数的比率为至少1,000,000:1、100,000:1、10,000:1、1,000:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1或1:1。
- [0523] 或者/另外,在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个:
- [0524] i) 融合体不包含与水不混溶的液滴;
- [0525] ii) 融合体包含水性腔和亲水外部;
- [0526] iii) 融合剂是蛋白质融合剂。
- [0527] 或者/另外,在实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个:

- [0528] i) 融合剂是哺乳动物融合剂或病毒融合剂;
- [0529] ii) 融合体不是通过用治疗或诊断物质装载融合体而制成;
- [0530] iii) 源细胞未装载治疗或诊断物质;
- [0531] iv) 融合体不包含多柔比星、地塞米松、环糊精、聚乙二醇、微小RNA (例如miR125)、VEGF受体、ICAM-1、E-选择素、氧化铁、荧光蛋白 (例如GFP或RFP)、纳米颗粒或RNA酶, 或不包含前述中的任一种对于源细胞外源的形式; 或
- [0532] v) 融合体进一步包含具有一个或多个翻译后修饰, 例如糖基化的对于源细胞外源治疗剂。
- [0533] 或者/另外, 在实施方案中, 融合体为单层或多层的。
- [0534] 或者/另外, 在实施方案中, 提供的融合体和/或其组合物或制剂的特征在于在源细胞的直径的约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的直径, 例如如通过实施例30的测定法所测量的。在实施方案中, 小于源细胞的直径的约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的直径, 例如如通过实施例30的测定法所测量的。在实施方案中, 源细胞的直径的约0.01%-0.05%、0.05%-0.1%、0.1%-0.5%、0.5%-1%、1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%内的直径, 例如如通过实施例30的测定法所测量的。在实施方案中, 融合体具有小于源细胞的直径的约0.01%-0.05%、0.05%-0.1%、0.1%-0.5%、0.5%-1%、1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%的直径, 例如如通过实施例30的测定法所测量的。在实施方案中, 直径为至少约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm或250nm, 例如如通过实施例32的测定法所测量。在实施方案中, 直径为约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm或250nm (例如, $\pm 20\%$), 例如如通过实施例32的测定法所测量。在实施方案中, 直径为至少约500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm或20,000nm, 例如如通过实施例32的测定法所测量的。在实施方案中, 直径为约500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm或20,000nm (例如, $\pm 20\%$), 例如如通过实施例32的测定法所测量的。在实施方案中, 直径大于5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、10 μm 、20 μm 、50 μm 、100 μm 、150 μm 或200 μm 。
- [0535] 在一些实施方案中, 提供的融合体和/或其组合物或制剂具有小于源细胞体积的约0.01%-0.05%、0.05%-0.1%、0.1%-0.5%、0.5%-1%、1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%的体积。
- [0536] 在一些实施方案中, 提供的融合体和/或其组合物或制剂具有不在1.08g/mL和1.12g/mL之间的密度。在一些实施方案中, 密度为1.25g/mL \pm 0.05, 例如如通过实施例33的测定法所测量的。在一些实施方案中, 密度为<1.1-1.1、1.05-1.15、1.1-1.2、1.15-1.25、1.2-1.3、1.25-1.35或>1.35g/mL, 例如通过实施例33的测定法。
- [0537] 在实施方案中, 提供的融合体和/或其组合物或制剂符合以下的一个或多个:
- [0538] i) 融合体不是外泌体;

- [0539] ii) 融合体是微囊泡；
- [0540] iii) 融合体包含非哺乳动物融合剂；
- [0541] iv) 融合体已被工程化以包含或掺入融合剂；
- [0542] v) 融合体包含相对于源细胞外源的融合剂或过表达的融合剂；
- [0543] vi) 融合体具有至少80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm或1500nm的直径，或者融合体的群体或多个融合体具有至少80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm或1500nm的平均直径；
- [0544] vii) 融合体包含一个或多个细胞器，例如线粒体、高尔基体、溶酶体、内质网、液泡、内体、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡和应激颗粒；
- [0545] viii) 融合体包含细胞骨架或其组分，例如肌动蛋白、Arp2/3、形成蛋白、冠蛋白、抗肌萎缩蛋白、角蛋白、肌球蛋白或微管蛋白；
- [0546] ix) 包含多个融合体的制剂不具有1.08-1.22g/ml的浮选密度或具有至少1.18-1.25g/ml或1.05-1.12g/ml的密度，例如在蔗糖梯度离心测定法中，例如如Théry et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." CurrProtoc Cell Biol.2006Apr;Chapter 3:Unit 3.22中所述；
- [0547] x) 相比于源细胞，脂质双层富集神经酰胺或鞘磷脂或其组合，或相比于源细胞，脂质双层不富集(例如耗尽)糖脂、游离脂肪酸或磷脂酰丝氨酸或其组合；
- [0548] xi) 融合体包含磷脂酰丝氨酸(PS)或CD40配体或PS和CD40配体二者，例如当在实施例52的测定法中测量时；
- [0549] xii) 相比于源细胞，融合体富集PS，例如在融合体的群体中，至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%对PS呈阳性，例如通过Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442的测定法；
- [0550] xiii) 融合体基本上不含乙酰胆碱酯酶(AChE)，或含有小于0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500或1000个AChE活性单位/μg蛋白质，例如通过实施例67的测定法；
- [0551] xiv) 融合体基本上不含四跨膜蛋白家族蛋白(例如CD63、CD9或CD81)、ESCRT相关蛋白(例如TSG101、CHMP4A-B或VPS4B)、Alix、TSG101、MHC I、MHC II、GP96、辅肌动蛋白-4、线粒体内膜蛋白(mitofilin)、同线蛋白(syntenin)-1、TSG101、ADAM10、EHD4、同线蛋白-1、TSG101、EHD1、脂筏结构蛋白(flotillin)-1、热休克70kDa蛋白(HSC70/HSP73、HSP70/HSP72)或其任何组合，或含有小于0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、5%或10%的任何个别外泌体标志物蛋白和/或小于0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%的任何所述蛋白的总外泌体标志物蛋白，或相比于源细胞脱富集这些蛋白质中的任何一种或多种，或不富集这些蛋白质中的任何一种或多种，例如通过实施例44的测定法；
- [0552] xv) 融合体包含的甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的水平低于500、250、100、50、20、10、5或1ng GAPDH/μg总蛋白质或低于源细胞中的GAPDH水平，例如比源细胞中以ng/μg计的

GAPDH/总蛋白质水平低小于1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%，例如使用实施例45的测定法；

[0553] xvi) 融合体富集一种或多种内质网蛋白(例如钙联蛋白)、一种或多种蛋白酶体蛋白或一种或多种线粒体蛋白或其任何组合，例如其中钙联蛋白的量小于500、250、100、50、20、10、5或1ng钙联蛋白/ μg 总蛋白质，或其中相比于源细胞，融合体包含少1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的以ng/ μg 计的钙联蛋白/总蛋白质，例如使用实施例46的测定法；

[0554] xvii) 融合体包含相对于源细胞外源的药剂(例如蛋白质、mRNA或siRNA)，例如如使用实施例39或40的测定法所测量的；或

[0555] xviii) 融合体可以通过原子力显微镜在云母表面上固定化至少30分钟，例如通过Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442的测定法。

[0556] 在实施方案中，以下的一个或多个：

[0557] i) 融合体是外泌体；

[0558] ii) 融合体不是微囊泡；

[0559] iii) 融合体具有小于80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm或1500nm的直径，或者融合体的群体具有至少80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm或1500nm的平均直径；

[0560] iv) 融合体不包含细胞器；

[0561] v) 融合体不包含细胞骨架或其组分，例如肌动蛋白、Arp2/3、形成蛋白、冠蛋白、抗肌萎缩蛋白、角蛋白、肌球蛋白或微管蛋白；

[0562] vi) 包含多个融合体的制剂具有1.08-1.22g/ml的浮选密度，例如在蔗糖梯度离心测定法中，例如如Théry et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." CurrProtoc Cell Biol. 2006Apr; Chapter 3: Unit 3.22中所述；

[0563] vii) 相比于源细胞，脂质双层不富集(例如耗尽)神经酰胺或鞘磷脂或其组合，或相比于源细胞，脂质双层富集糖脂、游离脂肪酸或磷脂酰丝氨酸或其组合；

[0564] viii) 融合体不包含，或相对于源细胞耗尽磷脂酰丝氨酸(PS)或CD40配体或PS或CD40配体二者，例如当在实施例52的测定法中测量时；

[0565] ix) 相比于源细胞，融合体不富集(例如耗尽)PS，例如在融合体的群体中，小于20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%对PS呈阳性，例如通过Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442的测定法；

[0566] x) 融合体包含乙酰胆碱酯酶(AChE)，例如至少0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500或1000个AChE活性单位/ μg 蛋白质，例如通过实施例67的测定法；

[0567] xi) 融合体包含四跨膜蛋白家族蛋白(例如CD63、CD9或CD81)、ESCRT相关蛋白(例如TSG101、CHMP4A-B或VPS4B)、Alix、TSG101、MHCI、MHCII、GP96、辅肌动蛋白-4、线粒体内膜

蛋白 (mitofilin)、同线蛋白 (syntenin)-1、TSG101、ADAM10、EHD4、同线蛋白-1、TSG101、EHD1、脂筏结构蛋白 (flotillin)-1、热休克70kDa蛋白 (HSC70/HSP73、HSP70/HSP72) 或其任何组合,或含有超过0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、5%或10%的任何个别外泌体标志物蛋白和/或小于0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%的任何所述蛋白的总外泌体标志物蛋白,或相比于源细胞富集这些蛋白质中的任何一种或多种,例如通过实施例44的测定法;

[0568] xii) 融合体的甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的水平大于500、250、100、50、20、10、5或1ng GAPDH/ μ g总蛋白质或低于源细胞中的GAPDH水平,例如比源细胞中以ng/ μ g计的GAPDH/总蛋白质水平大至少1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如使用实施例45的测定法;

[0569] xiii) 融合体不富集(例如耗尽)一种或多种内质网蛋白(例如钙联蛋白)、一种或多种蛋白酶体蛋白或一种或多种线粒体蛋白或其任何组合,例如其中钙联蛋白的量小于500、250、100、50、20、10、5或1ng钙联蛋白/ μ g总蛋白质,或其中相比于源细胞,融合体包含少1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的以ng/ μ g计的钙联蛋白/总蛋白质,例如使用实施例46的测定法;或

[0570] xiv) 融合体不可以通过原子力显微镜在云母表面上固定化至少30分钟,例如通过 Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442的测定法。

[0571] 在实施方案中,以下的一个或多个:

[0572] i) 融合体不包含VLP;

[0573] ii) 融合体不包含病毒;

[0574] iii) 融合体不包含复制活性病毒 (replication-competent virus);

[0575] iv) 融合体不包含病毒蛋白质,例如,病毒结构蛋白,例如,衣壳蛋白或病毒基质蛋白;

[0576] v) 融合体不包含来自包膜病毒的衣壳蛋白;

[0577] vi) 融合体不包含核衣壳蛋白;或

[0578] vii) 融合剂不是病毒融合剂。

[0579] 在实施方案中,融合体包含胞质溶胶。

[0580] 在实施方案中,融合体包含细胞生物物质或由细胞生物物质所包含。

[0581] 在实施方案中,融合体包含去核细胞或由去核细胞所包含。

[0582] 在实施方案中,融合体是或包含线粒体。

[0583] 在实施方案中,以下的一个或多个:

[0584] i) 融合体或源细胞在植入至受试者中时不形成畸胎瘤,例如通过实施例102的测定法;

[0585] ii) 融合体和/或其组合物或制剂能够趋化,例如以相比于参考细胞(例如巨噬细胞)至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的速度,例如使用实施例58的测定法;

[0586] iii) 融合体和/或其组合物或制剂能够在例如损伤位点归巢,其中细胞生物物质

来自人类细胞,例如使用实施例59的测定法,例如其中源细胞为嗜中性粒细胞;或

[0587] iv) 融合体和/或其组合物或制剂能够吞噬,例如其中使用实施例60的测定法,可在0.5、1、2、3、4、5或6个小时内检测到通过融合体的吞噬作用,例如其中源细胞为巨噬细胞。

[0588] 在实施方案中,在向受试者(例如人类受试者)施用之后,融合体或融合体组合物保留任何特征中的一、二、三、四、五、六个或更多个持续5天或更短,例如4天或更短、3天或更短、2天或更短、1天或更短,例如约12-72小时。

[0589] 在实施方案中,融合体具有以下特征的一个或多个:

[0590] a) 包含来自源细胞的一种或多种内源蛋白,例如膜蛋白或胞质蛋白;

[0591] b) 包含至少10、20、50、100、200、500、1000、2000或5000种不同的蛋白质;

[0592] c) 包含至少1、2、5、10、20、50或100种不同的糖蛋白;

[0593] d) 融合体中按质量计至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的蛋白质为天然存在的蛋白质;

[0594] e) 包含至少10、20、50、100、200、500、1000、2000或5000种不同的RNA;或

[0595] f) 包含至少2、3、4、5、10或20种不同的脂质,例如选自CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM和TAG。

[0596] 在实施方案中,融合体已经经操控以具有,或者融合体不是天然存在的细胞且具有,或者其中核不天然地具有以下特性中的一、二、三、四、五个或更多个:

[0597] a) 部分核灭活导致核功能降低至少50%、60%、70%、80%、90%或更多,例如转录或DNA复制降低或二者均降低,例如其中通过实施例19的测定法来测量转录且通过实施例20的测定法来测量DNA复制;

[0598] b) 融合体不能转录或其转录活性为参考细胞(例如源细胞)的转录活性的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如使用实施例19的测定法;

[0599] c) 融合体不能进行核DNA复制或其核DNA复制为参考细胞(例如源细胞)的核DNA复制的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如使用实施例20的测定法;

[0600] d) 融合体缺乏染色质或其染色质含量为参考细胞(例如源细胞)的染色质含量的小于1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如使用实施例37的测定法;

[0601] e) 融合体缺乏核膜或其核膜的量为参考细胞(例如源细胞或Jurkat细胞)的核膜的量的小于50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%或1%,例如通过实施例36的测定法;

[0602] f) 融合体缺乏功能性核孔复合物或具有降低的核输入或输出活性,例如通过实施例36的测定法降低了至少50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%或1%,或融合体缺乏一种或多种核孔蛋白,例如NUP98或Importin 7;

[0603] g) 融合体不包含组蛋白或其组蛋白水平为源细胞(例如H1、H2a、H2b、H3或H4)的组蛋白水平的小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如通过实施例37的测定法;

- [0604] h) 融合体包含小于20、10、5、4、3、2或1个染色体；
- [0605] i) 核功能被消除；
- [0606] j) 融合体为去核的哺乳动物细胞；
- [0607] k) 通过机械力、通过辐射或通过化学消融将核去除或灭活(例如挤出)；或
- [0608] l) 融合体来自例如在间期或有丝分裂期间完全或部分去除DNA的哺乳动物细胞。
- [0609] 在实施方案中，融合体包含mtDNA或载体DNA。在实施方案中，融合体不包含DNA或基本上不含DNA。在一些实施方案中，融合体不包含功能性核。在一些实施方案中，融合体不包含核。在一些实施方案中，融合体基本上不含核DNA。
- [0610] 在实施方案中，融合体基本上不含以下细胞器的一个或多个：线粒体、高尔基体、溶酶体、内质网、液泡、内体、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡和应激颗粒。在实施方案中，与源细胞相比，融合体具有较低数目的细胞器，其中细胞器选自：线粒体、高尔基体、溶酶体、内质网、液泡、内体、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡和应激颗粒。
- [0611] 在实施方案中，源细胞为原代细胞、永生化细胞或细胞系(例如原粒细胞细胞系，例如C2C12)。在实施方案中，融合体来自源细胞，所述源细胞具有修饰的基因组，例如具有降低的免疫原性(例如通过基因组编辑，例如以去除MHC蛋白或MHC复合物)。在实施方案中，源细胞来自用免疫抑制剂处理的细胞培养物。在实施方案中，源细胞为基本上非免疫原性的，例如使用本文所述的测定法。在实施方案中，源细胞包含外源药剂，例如治疗剂。在实施方案中，源细胞为重组细胞。
- [0612] 在一些实施方案中，源细胞来自用抗炎信号处理的细胞培养物。在一些实施方案中，制备本文所述的方法进一步包括使源细胞与抗炎信号接触，例如，在使核失活之前或之后，例如，使细胞去核。
- [0613] 在实施方案中，融合体进一步包含相对于源细胞外源的药剂，例如，治疗性膜蛋白有效载荷剂，例如，蛋白质或核酸(例如，DNA、染色体(例如，人类人工染色体)、RNA，例如，mRNA或miRNA)。在实施方案中，外源药剂以至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝存在。在实施方案中，融合体具有改变的，例如增加或降低的水平的一个或多个内源分子，例如，蛋白质或核酸(例如，在一些实施方案中，相对于源细胞是内源的，并且在一些实施方案中，相对于靶细胞是内源的)，例如，由于用siRNA或基因编辑酶处理源细胞(例如哺乳动物源细胞)。在实施方案中，内源分子以至少或不超过10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000或1,000,000,000个拷贝存在。在实施方案中，内源分子(例如，RNA或蛋白质)以比其在源细胞中的浓度大至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 或 1.0×10^8 的浓度存在。在实施方案中，内源分子(例如，RNA或蛋白质)以比其在源细胞中的浓度小至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 或 1.0×10^8 的浓度存在。

[0614] 在实施方案中,融合剂是病毒融合剂,例如,HA、HIV-1ENV、gp120或VSV-G。在实施方案中,融合剂是哺乳动物融合剂,例如SNARE、Syncytin、myomaker、myomixer、myomerge或FGFRL1。在实施方案中,融合剂在4-5、5-6、6-7、7-8、8-9或9-10的pH下有活性。在实施方案中,融合剂在6-8的pH下有活性。在实施方案中,融合剂在4-5、5-6、6-7、7-8、8-9或9-10的pH下没有活性。在实施方案中,融合体在靶细胞的表面处融合至靶细胞。在实施方案中,融合剂以溶酶体非依赖性方式促进融合。在实施方案中,融合剂为蛋白质融合剂。在实施方案中,融合剂为脂质融合剂,例如油酸、单油酸甘油酯、甘油酯、二酰甘油或改性不饱和脂肪酸。在实施方案中,融合剂为化学融合剂,例如PEG。在实施方案中,融合剂为小分子融合剂,例如氟烷,NSAID,如美洛昔康(meloxicam)、吡罗昔康(piroxicam)、替诺昔康(tenoxicam)和氯丙嗪。在实施方案中,融合剂为重组的。在实施方案中,融合剂以生物化学方式并入,例如融合剂以纯化蛋白质的形式提供且在允许融合剂与脂质双层缔合的条件下与脂质双层接触。在实施方案中,融合剂以生物合成方式并入,例如在允许融合剂与脂质双层缔合的条件下在源细胞中表达。

[0615] 在实施方案中,融合体结合靶细胞。在实施方案中,靶细胞不是HeLa细胞,或者靶细胞未被转化或永生化。例如,在一些实施方案中,未转化的细胞表现出接触抑制和/或其生长依赖于与相同类型的正常细胞相同的存活因子或生长因子。在一些实施方案中,靶细胞经转化或永生化。

[0616] 在涉及融合体组合物或制剂的一些实施方案中,多个融合体是相同的。在一些实施方案中,多个融合体是不同的。在一些实施方案中,多个融合体来自一个、两个或更多个类型的源细胞。在一些实施方案中,多个融合体是相同的,若融合体组合物中至少0.01%-0.05%、0.05%-0.1%、0.1%-0.5%、0.5%-1%、1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%的融合体共享选自以下的一种特性:包含相同的融合剂;使用相同类型的源细胞产生;或包含相同的膜蛋白有效载荷剂。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的多个融合体具有融合体组合物或制剂中融合体的平均直径的10%、20%、30%、40%或50%内的直径。在一些实施方案中,至少50%的多个融合体具有融合体组合物中融合体的平均直径的10%、20%、30%、40%或50%内的直径。在一些实施方案中,多个融合体具有至少约50nm、约80nm、约100nm、约200nm、约500nm、约1000nm、约1200nm、约1400nm或约1500nm的平均直径。在一些实施方案中,多个融合体包含具有约10nm至约100 μ m的范围内的直径的融合体。在一些实施方案中,多个包含具有约20nm至约200nm、约50nm至约200nm、约50nm至约100nm、约50nm至约150nm或约100nm至约150nm的范围内的的大小的融合体。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的多个融合体具有融合体组合物或制剂中融合体的平均体积的10%、20%、30%、40%或50%内的体积。在一些实施方案中,至少50%的多个融合体具有融合体组合物中融合体的平均体积的10%、20%、30%、40%或50%内的体积。在一些实施方案中,多个包含具有约500nm³至约0.0006mm³或约4,000nm³至约0.005 μ m³、约65,000nm³至约0.005 μ m³、约65,000nm³至约0.0006 μ m³、约65,000nm³至约0.002 μ m³或约0.0006 μ m³至约0.002 μ m³的范围内的体积的融合体。在一些实施方案中,融合体组合物或制剂具有源细胞群体的直径分布变化性的10%、50%或90%内的小于约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%的直径分布变化

性,例如,基于实施例31。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的多个融合体具有融合体组合物或制剂中融合体的平均融合剂拷贝数的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%内的融合剂的拷贝数。在一些实施方案中,至少50%的多个融合体具有融合体组合物中融合体中平均融合剂拷贝数的10%、20%、30%、40%或50%内的融合剂的拷贝数。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的多个融合体具有融合体组合物或制剂中融合体中平均治疗剂拷贝数的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%内的治疗剂的拷贝数。在一些实施方案中,至少50%的多个融合体具有融合体组合物中融合体中平均蛋白质膜有效载荷拷贝数的10%、20%、30%、40%或50%内的膜蛋白有效载荷的拷贝数。在一些实施方案中,融合体组合物或制剂包含至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} 个融合体。在一些实施方案中,融合体组合物或制剂体积为至少1 μ L、2 μ L、5 μ L、10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、500 μ L、1mL、2mL、5mL或10mL。

[0617] 在一些实施方案中,多个融合体包含至少0.01%–0.05%、0.05%–0.1%、0.1%–0.5%、0.5%–1%、1%–2%、2%–3%、3%–4%、4%–5%、5%–10%、10%–20%、20%–30%、30%–40%、40%–50%、50%–60%、60%–70%、70%–80%或80%–90%具有以下特征的一个或多个的融合体:

[0618] (i) 不包含核或功能性核;

[0619] (ii) 基本上不含核DNA;或

[0620] (iii) 不包含线粒体或功能性线粒体。

[0621] 在实施方案中,本文所述的药物组合物具有以下特征的一个或多个:

[0622] a) 药物组合物符合药物或良好生产规范(GMP)标准;

[0623] b) 根据良好生产规范(GMP)制备药物组合物;

[0624] c) 药物组合物具有低于预先确定的参考值的病原体水平,例如,基本上不含病原体;或

[0625] d) 药物组合物具有低于预先确定的参考值的污染物水平(例如核DNA),例如,基本上不含污染物;或

[0626] e) 药物组合物具有低免疫原性,例如如本文所述。

[0627] 在实施方案中,生物学功能选自:

[0628] a) 调控,例如抑制或刺激酶;

[0629] b) 通过例如抑制或刺激合成或通过抑制或刺激因子的降解来调控,例如增加或降低受试者中分子(例如蛋白质、核酸或代谢物、药物或毒素)的水平;

[0630] c) 调控,例如增加或减少靶细胞或组织的存活力;或

[0631] d) 调控蛋白质状态,例如增加或减少蛋白质的磷酸化,或调控蛋白质构象;

[0632] e) 促进伤口愈合;

[0633] f) 调控,例如增加或减少两个细胞之间的相互作用;

[0634] g) 调控,例如促进或抑制细胞分化;

[0635] h) 改变受试者中因子(例如蛋白质、核酸、代谢物、药物或毒素)的分布;

[0636] i) 调控,例如增加或减少免疫应答;或

[0637] j) 调控,例如增加或减少细胞向靶组织的募集。

[0638] 在本文的治疗性方法的一些实施方案中,多个融合体具有局部作用。在一些实施

方案中,多个融合体具有远端作用。在一些实施方案中,多个融合体具有系统性作用。

[0639] 在一些实施方案中,受试者患有癌症、炎症病症、自身免疫疾病、慢性疾病、炎症、器官功能受损、传染性疾病、代谢性疾病、退行性疾病、遗传性疾病(例如,遗传缺陷或显性遗传性病)或损伤。在一些实施方案中,受试者患有传染性疾病,并且融合体包含传染性疾病的抗原。在一些实施方案中,受试者具有遗传缺陷,并且融合体包含受试者对其缺乏的蛋白质或编码该蛋白质的核酸(例如DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA等),或编码该蛋白质的DNA,或编码该蛋白质的染色体,或包含编码该蛋白质的核酸的核。在一些实施方案中,受试者患有显性遗传病症,并且融合体包含显性突变体等位基因的核酸抑制剂(例如,siRNA或miRNA)。在一些实施方案中,受试者患有显性遗传病症,并且融合体包含显性突变等位基因的核酸抑制剂(例如,siRNA或miRNA),并且融合体还包含编码未被核酸抑制剂靶定的突变基因的非突变等位基因的mRNA。在一些实施方案中,受试者需要疫苗接种。在一些实施方案中,受试者需要例如受伤部位的再生。

[0640] 在一些实施方案中,融合体包含核酸,该核酸进一步包含编码一个或多个信号序列的一个或多个序列,例如,其中靶细胞将包含信号序列的蛋白质易位至靶细胞的细胞膜。

[0641] 在一些实施方案中,将融合体组合物或制剂施用于受试者至少1、2、3、4或5次。

[0642] 在一些实施方案中,将融合体组合物或制剂系统性地(例如,口服、胃肠外、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内)或局部地施用于受试者。在一些实施方案中,将融合体组合物或制剂施用于受试者,使得融合体组合物或制剂到达选自肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼的靶组织。在一些实施方案中(例如,其中受试者患有自身免疫疾病),将融合体组合物或制剂与免疫抑制剂例如糖皮质激素、细胞生长抑制剂、抗体或免疫亲和蛋白调节剂共施用。在一些实施方案中(例如,其中受试者患有癌症或传染性疾病),融合体组合物或制剂与免疫刺激剂例如佐剂、白介素、细胞因子或趋化因子共施用。在一些实施方案中,融合体组合物或制剂的施用导致受试者的靶细胞中基因的上调或下调,例如其中融合体包含转录激活物或阻遏物,翻译激活物或阻遏物,或表观遗传激活物或阻遏物。

[0643] 在本文的制备方法的一些实施方案中,提供表达融合剂的源细胞包含在来源细胞中表达外源融合剂或在源细胞中上调内源融合剂的表达。在一些实施方案中,方法包括灭活源细胞的核。

[0644] 在一些实施方案中,多个融合体的至少一个融合体衍生自源细胞。

[0645] 在一些实施方案中,融合体在小于4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80或-160°C的温度下。

[0646] 在实施方案中,融合体制剂包含至少约 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 个融合体。在实施方案中,融合体制剂包含至少10mL、20mL、50mL、100mL、200mL、500mL、1L、2L、5L、10L、20L或50L的体积。在实施方案中,方法包括例如通过化学去核,例如使用机械力,例如使用过滤器或离心机,至少部分破坏细胞骨架,或其组合来使源细胞例如哺乳动物细胞去核。在实施方案中,方法包括表达源细胞中的融合剂或其他膜蛋。在实施方案中,方法包括以下的一个或多个:囊泡化、低渗处理、挤压或离心。在实施方案中,方法包括在源细胞中遗传表达外源药剂或将外源药剂加载至源细胞或融合体中。在实施方案中,方法包括例如在使核失活例如使细胞去核之前,使源细胞与编码多肽药剂

的DNA接触。在实施方案中,方法包括例如在使细胞核失活例如使细胞去核之前或之后,使源细胞与编码多肽药剂的RNA接触。在实施方案中,方法包括例如通过电穿孔将治疗剂(例如核酸或蛋白质,例如膜蛋白有效载荷剂)引入融合体中。

[0647] 在实施方案中,融合体来自具有修饰的基因组的哺乳动物细胞,例如,以降低免疫原性(例如,通过基因组编辑,例如,以去除MHC蛋白)。在实施方案中,方法进一步包括例如在使细胞核失活例如使细胞去核之前或之后,使步骤a)的源细胞与免疫抑制剂接触。

[0648] 在一些实施方案中,如果确定可检测水平,例如高于参考值的值,则丢弃含有多个融合体或融合体组合物或制剂的样品。

[0649] 在一些实施方案中,第一融合剂不是脂肽。

[0650] 在一些实施方案中,提供的融合体和/或其组合物或制剂具有部分或完全的核失活(例如核去除)。

[0651] 在一些实施方案中,源细胞是在贴壁或悬浮条件下生长的细胞。在一些实施方案中,源细胞是原代细胞、培养的细胞、永生化细胞或细胞系(例如原粒细胞细胞系,例如C2C12)。在一些实施方案中,源细胞是同种异体的,例如从与靶细胞相同物种的不同生物体获得的。在一些实施方案中,源细胞是自体的,例如从与靶细胞相同的生物体获得的。在一些实施方案中,源细胞是异源的,例如,从与靶细胞不同的物种的生物体获得的。

[0652] 在一些实施方案中,融合体不被循环中的清除系统或肝窦中的库普弗细胞捕获。在一些实施方案中,融合体不被受试者中的网状内皮系统(RES)捕获,例如通过实施例76的测定法。在一些实施方案中,当向受试者施用多个融合体时,小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的多个在24小时后不被RES捕获,例如通过实施例76的测定法。在一些实施方案中,当向受试者施用多个融合体时,小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的多个在24小时后不被RES捕获,例如通过实施例76的测定法。

[0653] 在一些实施方案中,融合体包含病毒结构蛋白和/或病毒基质蛋白。

[0654] 在一些实施方案中,融合体基本上不含以下细胞器的一个或多个或者具有较低数目的以下细胞器的一个或多个:线粒体、高尔基体、溶酶体、内质网、液泡、内体、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡和应激颗粒,例如,与源细胞相比。

[0655] 在一些实施方案中,融合体不包含Cre或GFP,例如,EGFP。

[0656] 在一些实施方案中,融合体组合物或药物组合物已经在预先确定的温度下维持至少1、2、3、6或12个小时;1、2、3、4、5或6天;1、2、3或4周;1、2、3或6个月;或1、2、3、4或5年。在一些实施方案中,预先确定的温度选自约4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80或-160°C。

[0657] 在一些实施方案中,融合体组合物或药物组合物在维持在所述温度下之前具有多个的活性的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的活性,例如,通过以下的一个或多个:

[0658] i) 融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少10%,例如在实施例54的测定法中;

[0659] ii) 与其他融合体相比,融合体以更高的速率与靶细胞融合,例如高至少50%,例如在实施例54的测定法中;

[0660] iii) 融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂在24小时后得以递送至至少10%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;或

[0661] iv) 融合剂以维持在所述温度下之前的多个的融合剂拷贝数的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的。

[0662] 在一些实施方案中,融合体组合物或药物组合物认为是稳定的,若其具有在所述温度下存储所述时间段之前的多个的活性的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的活性,例如,通过以下的一个或多个:

[0663] i) 融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少10%,例如在实施例54的测定法中;

[0664] ii) 与其他融合体相比,融合体以更高的速率与靶细胞融合,例如高至少50%,例如在实施例54的测定法中;

[0665] iii) 融合体以一定速率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂在24小时后得以递送至至少10%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中;或

[0666] iv) 融合剂以维持在所述温度下之前的多个的融合剂拷贝数的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的拷贝数存在,例如如通过实施例29的测定法所测量的。

[0667] 在一些实施方案中,疾病或病症选自癌症、自身免疫病症或传染性疾病。在一些实施方案中,受试者患有癌症。在一些实施方案中,融合体包含新抗原。在一些实施方案中,融合体组合物施用于受试者至少1,2,3,4或5次。在一些实施方案中,将融合体组合物系统性地(例如,口服、胃肠外、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内)或局部地施用于受试者。在一些实施方案中,其中将融合体组合物施用于受试者,使得融合体组合物到达选自肝、肺、心、脾、胰腺、胃肠道、肾、睾丸、卵巢、脑、生殖器官、中枢神经系统、周围神经系统、骨骼肌、内皮、内耳或眼的靶组织。在一些实施方案中,将融合体组合物与免疫抑制剂例如糖皮质激素、细胞生长抑制剂、抗体或免疫亲和蛋白调节剂共施用。在一些实施方案中,融合体组合物与免疫刺激剂例如佐剂、白介素、细胞因子或趋化因子共施用。

[0668] 在一些实施方案中,多个融合体具有局部、远端或系统性作用。

[0669] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法进一步包括监测癌症进展、肿瘤衰退、肿瘤体积、新生性细胞数减少、融合细胞的数量、包含膜蛋白有效载荷剂的融合细胞的数量、表达核酸蛋白有效载荷的融合细胞的数量以及布置于融合细胞膜中的膜蛋白的数量。

[0670] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法进一步包括监测生物体中不良事件的步骤。在一些实施方案中,不良事件包括以下一种或多种:细胞因子释放综合征、发烧、心动过速、发冷、厌食、恶心、呕吐、肌痛、头痛、毛细血管渗漏综合征、低血压、肺水肿、凝血病、肾功能不全、肾损伤、巨噬细胞活化综合征、吞噬性淋巴细胞组织细胞增多症、器官衰竭、脑水肿、T细胞活化引起的旁观者炎症、神经系统症状、脑病、精神错乱、幻觉、谵妄、迟钝(obtundation)、失语、癫痫发作、B细胞发育不全、肿瘤溶解综合征以及移植物抗宿主疾病。

[0671] 在一些实施方案中,生物是人。在一些实施方案中,人患有疾病、病症或状况。在一些实施方案中,靶细胞的细胞膜脂质双层中的膜蛋白有效载荷剂的存在改善了疾病、病症或状况的一种或多种症状。

[0672] 本发明的其他特征、目标和优势将在具体实施方式和附图以及权利要求书中显而

易见。

[0673] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。本文提及的所有公开案、专利申请、专利和其他参考文献都以全文引用的方式并入。举例来说,本文中,例如本文的任何表中提及的所有GenBank、Unigene和Entrez序列都以引用的方式并入。除非另外规定,否则本文中,包括本文的任何表中指定的序列登录号均指截至2018年2月17日的当前数据库条目。当一个基因或蛋白质引用多个序列登录号时,包涵所有的序列变异体。另外,材料、方法和实施例仅仅是说明性的并且不打算限制性的。

[0674] 附图简述

[0675] 当结合附图阅读时将更好地理解本发明的以下详细描述。出于说明本发明的目的,在本文所述的图式中示出了某些实施方案,其为当前示例的。然而,应理解,本发明不限于图式中示出的实施方案的精确布置和仪器。

[0676] 图1定量了对于内质网,用染料对融合体的染色。

[0677] 图2定量了对于线粒体,用染料对融合体的染色。

[0678] 图3定量了对于溶酶体,用染料对融合体的染色。

[0679] 图4定量了对于F-肌动蛋白,用染料对融合体的染色。

[0680] 图5是示出在对与表达Cre和GFP的融合剂接触的细胞进行光漂白后,GFP荧光的恢复的图示。

[0681] 图6是示出在与融合体或阴性对照接触后,表达RFP的靶细胞的百分比的图示。

[0682] 图7是通过供体与受体HeLa细胞之间的融合的阳性细胞器递送的图像。以白色指示的细胞内区域指示供体与受体线粒体之间的重叠。灰色的细胞内区域指示供体与受体细胞器不重叠的区域。

[0683] 图8是通过供体与受体HeLa细胞之间的融合的阳性细胞器递送的图像。以白色指示的细胞内区域指示供体与受体线粒体之间的重叠。灰色的细胞内区域指示供体与受体细胞器不重叠的区域。

[0684] 图9示出来自注射了融合体的小鼠的指定组织的显微术图像。白色指示代表RFP荧光细胞,指示将蛋白质货物体内递送至细胞。

[0685] 图10是一系列图像,示出通过指定的施用途径将融合体成功地体内递送至鼠类组织,引起通过靶向细胞表达荧光素酶。

[0686] 图11示出鼠类肌肉组织中的tdTomato荧光的显微术图像,表明通过细胞生物物质将蛋白质货物递送至肌细胞。

[0687] 发明详述

[0688] 本发明描述了包括膜蛋白有效载荷剂的融合体,以及相关的方法。

[0689] 定义

[0690] 药剂:通常,如本文所用,术语“药剂”可用于指化合物或实体,包括例如肽、多肽、核酸(例如DNA、染色体(例如人类人工染色体)、RNA、mRNA、siRNA、miRNA)、糖或多糖、脂质、小分子或其组合或复合物。术语可以指是细胞器或其级分、提取物或组分的实体或包含其的实体。

[0691] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指包括足以赋予与特定靶抗原特异性结合的规

范性免疫球蛋白序列元件的多肽。为了本发明的目的,在某些实施方案中,可以将包括足够的免疫球蛋白域序列以赋予与抗原的特异性结合的任何多肽或多肽复合物称为和/或用作“抗体”,无论此类多肽是天然产生的(例如,由与抗原反应的生物体产生),或通过重组工程、化学合成或其他人工系统或方法产生。在一些实施方案中,抗体是多克隆的;在一些实施方案中,抗体是单克隆的。在一些实施方案中,抗体具有恒定区序列,其是小鼠、兔、灵长类或人抗体的特征。在一些实施方案中,抗体序列元件是人源化的、灵长类化的、嵌合的等。在实施方案中,根据本发明使用的抗体的形式选自但不限于完整的IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双特异性或多特异性抗体(例如Zybodies®等);抗体片段,如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段和分离的CDR或其组;单链Fv;多肽-Fc融合物;单域抗体(例如,鲨鱼单域抗体,如IgNAR或其片段);骆驼抗体;被掩盖的抗体(例如Probodies®);小型模块化免疫药物(“SMIPs™”);单链或串联双抗体(TandAb®);VHH; Anticalins®; 纳米抗体®; 小分子抗体(minibody); BiTE®; 锚蛋白重复蛋白或DARPIN®; Avimers®; DART; TCR样抗体; Adnectins®;

Affilins®; Transbodies®; Affibodies®; TrimerX®; MicroProteins; Fynomers®, Centyrins®; 和KALBITOR®。在一些实施方案中,抗体可以缺乏其若天然产生则具有的共价修饰(例如,聚糖的附着)。在一些实施方案中,抗体可以包含共价修饰(例如,聚糖的连接、有效载荷[例如,可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其他侧基[例如,聚乙二醇等])。在一些实施方案中,任何上述形式的抗体包含一个或多个互补决定区,例如CDR1、CD2和/或CDR3。

[0692] 抗原结合域:如本文所用,术语“抗原结合域”是指抗体或嵌合抗原受体的结合抗原的部分。在一些实施方案中,抗原结合域结合细胞的细胞表面抗原。在一些实施方案中,抗原结合域结合癌的特征性抗原,例如新生性细胞中的肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,抗原结合域结合传染性疾病的特征性抗原,例如,病毒感染细胞中与病毒相关的抗原。在一些实施方案中,抗原结合域结合自身免疫疾病中由受试者的免疫系统靶向的细胞的特征性抗原,例如自身抗原。在一些实施方案中,抗原结合域是或包含抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,抗原结合域是或包含scFv或Fab。

[0693] 与……缔合:在一些实施方案中,如果两个或多个实体直接或间接地相互作用,则它们在物理上彼此“缔合”,从而它们在物理上彼此接近和/或保持接近。在一些实施方案中,彼此物理缔合的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施方案中,彼此物理缔合的两个或更多个实体不彼此共价连接,而是例如通过氢键、范德瓦耳相互作用、疏水性相互作用、磁性及其组合非共价结合。

[0694] 癌症:术语“癌症”、“恶性肿瘤”、“新生物”、“肿瘤”和“癌”在本文中用来指表现出相对异常、不受控制和/或自主生长的细胞,从而它们表现出异常的生长表型,其特征在于细胞增殖控制的明显丧失。在一些实施方案中,肿瘤可以是或包含癌前(例如,良性)、恶性、转移前、转移和/或非转移的细胞。本公开具体地标识了其教导可能特别相关的某些癌症。在一些实施方案中,相关癌症可以以实体瘤为特征。在一些实施方案中,肿瘤可以是分散性肿瘤或液体肿瘤。在一些实施方案中,相关癌症可以以血液肿瘤为特征。通常,本领域已知

的不同类型的癌症的实例包括,例如,白血病,淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金),骨髓瘤和骨髓增生性病症;肉瘤,黑素瘤,腺瘤,实体组织癌,口腔、喉(throat)、喉(larynx)和肺鳞状细胞癌,肝癌,泌尿生殖系统癌症(如前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌和子宫内膜癌)以及肾细胞癌,骨癌,胰腺癌,皮肤癌,皮肤或眼内黑素瘤,内分泌系统癌,甲状腺癌,甲状旁腺癌,头颈癌,乳腺癌,胃肠道癌和神经系统癌,良性病变如乳头状瘤等。

[0695] 货物:如本文所用,“货物”或“有效载荷”包含可以由融合体递送至靶细胞的药剂。在一些实施方案中,货物包含一种或多种治疗剂,例如对于源细胞是内源的或外源的治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂选自以下的一个或多个:蛋白质例如酶、跨膜蛋白、受体、抗体;核酸,例如DNA、染色体(例如人类人工染色体)、RNA、mRNA、siRNA、miRNA或小分子。在一些实施方案中,货物是或包含膜蛋白有效载荷剂。在一些实施方案中,货物是或包含细胞器。

[0696] CDR:如本文所用,“CDR”是指互补决定区,例如其可以位于抗体可变区内。重链和轻链的每个可变区中都有三个CDR,分别称为CDR1、CDR2和CDR3,对于每个可变区。“CDR的组”或“CDR组”是指存在于能够结合抗原的单个可变区或能够结合抗原的同源重链和轻链可变区的CDR中的一组三个或六个CDR。在本领域中已经建立了用于定义CDR边界的某些系统(例如,Kabat、Chothia等);本领域技术人员理解这些系统之间的差异,并且能够以理解和实践所要求保护的发明所需的程度理解CDR边界。

[0697] 细胞膜:如本文所用,“细胞膜”是指衍生自细胞例如源细胞或靶细胞的膜。

[0698] 细胞生物物质:如本文所用,“细胞生物物质”是指包含腔和细胞膜的细胞的一部分,或具有部分或完全核失活的细胞。在一些实施方案中,细胞生物物质包含细胞骨架组分、细胞器和核糖体中的一个或多个。在实施方案中,细胞生物物质是去核细胞、微囊泡或细胞影(cell ghost)。

[0699] 胞质溶胶:如本文所用,“胞质溶胶”是指细胞胞质的水性组分。胞质溶胶可以包含蛋白质、RNA、代谢物和离子。

[0700] 内源:如本文所用,术语“内源”是指在相关系统(例如,细胞、组织、生物体、源细胞或靶细胞等)中天然存在的药剂,例如蛋白质或脂质。例如,在一些实施方案中,当相关脂质和/或蛋白质天然存在于获得或衍生融合体或膜封闭制剂的源细胞(例如,融合体或膜封闭制剂的源细胞)中时,可以说融合体或膜封闭制剂含有一种或多种“内源”脂质和/或蛋白质。在一些实施方案中,内源性药剂在源细胞中过表达。

[0701] 外源:如本文所用,术语“外源”是指在相关系统(例如,细胞、组织、生物体、源细胞或靶细胞等)中天然不存在的药剂,例如蛋白质或脂质。在实施方案中,将药剂工程化和/或引入到相关系统中。例如,在一些实施方案中,当相关脂质和/或蛋白质不天然存在于获得或衍生融合体或膜封闭制剂的源细胞(例如,融合体或膜封闭制剂的源细胞)中时,可以说融合体或膜封闭制剂含有一种或多种“外源”脂质和/或蛋白质。在一些实施方案中,外源药剂是内源药剂的变体,如例如蛋白质变体,其在一个或多个结构方面(例如氨基酸序列、翻译后修饰等)与参考内源性蛋白质等不同。

[0702] 功能变体:术语“功能变体”是指具有与参考氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列,或由基本上相同的核苷酸序列编码并且能够具有参考氨基酸序列的一种或多种活性的多肽。

[0703] 融合细胞:如本文所用,“融合细胞”是指通过使一种或多种融合体与靶细胞接触而产生的细胞。在融合细胞的一些实施方案中,一种或多种融合体的脂质双层的至少一部分与靶细胞的膜缔合。

[0704] 融合剂:如本文所用,“融合剂”是指在两个膜包封的腔之间产生相互作用的药剂或分子。在实施方案中,融合剂促进膜的融合。在其他实施方案中,融合剂在两个腔(例如,融合体的腔和靶细胞的细胞质)之间产生连接,例如孔。在一些实施方案中,融合剂包含两种或更多种蛋白质的复合物,例如,其中两种蛋白质都不具有单独的促融合活性。

[0705] 融合剂结合配偶体:如本文所用,“融合剂结合配偶体”是指与融合剂相互作用以促进两个膜之间融合的药剂或分子。在一些实施方案中,融合剂结合配偶体可以是或包含细胞的表面特征。

[0706] 融合体组合物:如本文所用,“融合体组合物”是指包含一个或多个融合体的组合物。

[0707] 膜蛋白有效载荷剂:如本文所用,“膜蛋白有效载荷剂”是指是或包含膜蛋白和/或编码膜蛋白的核酸的货物,该货物可以包含在如本文所述的融合体或膜封闭的制剂中(例如,用于递送至靶细胞)。膜蛋白是与(例如,位于其中和/或其上)细胞膜缔合或能够与细胞膜缔合的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白是跨膜蛋白。在一些实施方案中,膜蛋白包含至少部分地(例如,完全地)跨越膜例如细胞膜的域。在一些实施方案中,膜蛋白与膜脂质双层的内部(例如,胞质)部分缔合。在一些实施方案中,膜蛋白与膜脂质双层的外部部分(例如,与本文所述的细胞表面或与融合体或膜包封的制剂的表面)缔合。在一些实施方案中,与膜脂质双层的外部缔合的膜蛋白是细胞表面蛋白。在一些实施方案中,膜蛋白穿过膜脂质双层并且被分泌。在一些实施方案中,膜蛋白是天然存在的蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白是工程和/或合成蛋白(例如,嵌合抗原受体)。在一些实施方案中,膜蛋白是治疗剂。

[0708] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”是指与一种或多种药学上可接受的载体一起配制的活性剂。在一些实施方案中,活性剂以适合于以治疗方案施用于相关受试者的单位剂量存在。在一些实施方案中,可以将药物组合物特别地配制用于肠胃外施用,例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如无菌溶液或混悬液或缓释制剂。

[0709] 药学上可接受的载体:如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂或赋形剂。

[0710] 纯化的:如本文所用,术语“纯化的”是指从天然状态改变或去除。例如,活体动物中天然存在的细胞或细胞碎片未经“纯化”,而从其自然状态的共存材料中部分或完全分离的同一细胞或细胞碎片经“纯化”。纯化的融合体组合物可以基本上纯的形式存在,或可以存在于非天然环境中,例如培养基,如包含细胞的培养基。

[0711] 源细胞:如本文所用,“源细胞”是指衍生出例如获得融合体的细胞。在一些实施方案中,衍生包括从源细胞获得膜封闭的制剂并添加融合蛋白。

[0712] 基本上相同:在核苷酸序列的上下文中,术语“基本上相同”在本文中用于指第一核苷酸序列,其含有与第二核苷酸序列中比对的核苷酸相同的足够的或最少数目的核苷酸,使得第一和第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构多肽域或共同功能多肽活性,例如,与参考序列(例如本文提供的序列)具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。本文的组合物和方法涵盖具有指定序列

或与其基本相同或相似的序列,例如与指定序列至少85%、90%或95%相同或更高的序列的多肽和核酸。在氨基酸序列的上下文中,术语“基本上相同”在本文中是指含有足够或最少数目的氨基酸残基的第一氨基酸序列,所述氨基酸残基i)与第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基相同或ii)是第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基的保守取代,使得第一和第二氨基酸序列可以具有共同的结构域和/或共同的功能活性,例如,含有具有与参考序列(例如本文提供的序列)至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的共同结构的域的氨基酸序列。

[0713] 靶细胞部分:如本文所用,术语“靶细胞部分”用于指可用于特异性地(相对于相关系统中至少一个其他细胞)将融合体靶向细胞(例如靶细胞)的特征。在一些实施方案中,靶细胞部分是靶细胞的表面特征。在一些实施方案中,靶细胞部分是靶细胞的细胞膜缔合的蛋白质或其一部分。在一些实施方案中,靶细胞部分是靶细胞的膜缔合的肽或蛋白质或其一部分。在一些实施方案中,靶细胞部分是靶细胞的膜缔合的脂质或其一部分。在一些实施方案中,靶细胞部分是靶细胞的膜缔合的糖的一部分或其一部分。

[0714] 靶向域:如本文所用,术语“靶向域”是融合体的特征,其与靶细胞部分缔合或相互作用。在一些实施方案中,靶向域特异性地(在暴露条件下)与靶细胞部分缔合或相互作用。在一些实施方案中,靶向域特异性结合存在于靶细胞上的靶细胞部分。在一些实施方案中,靶向域是或包含融合剂的域,例如与融合剂共价连接,例如是融合剂多肽的一部分。在一些实施方案中,靶向域是与任融合剂的独立实体,例如未与融合剂共价连接,例如,不是融合剂多肽的一部分。

[0715] 稳定:术语“稳定”当应用于本文的组合物时,是指在指定的一组条件下,该组合物在一段时间内保持其物理结构和/或活性的一个或多个方面。在一些实施方案中,指定条件是在冷存储条件下(例如,在约4°C、-20°C或-80°C或以下)。

[0716] 靶细胞:如本文所用,“靶细胞”是指融合体融合的细胞。

[0717] TCR域:如本文所用,“TCR域”是指T细胞受体多肽或其功能片段或变体的一部分,其可引起针对T细胞信号传导途径的至少一些方面的TCR复合物的激活。在一些实施方案中,TCR复合物的活化导致T细胞增殖、激活、分化、细胞因子分泌或细胞溶解活性中的一种或多种。

[0718] 变体:术语“变体”是指具有与参考氨基酸序列基本相同的氨基酸序列,或由基本相同的核苷酸序列编码的多肽。在一些实施方案中,变体是功能变体。

[0719] 融合体

[0720] 本文所述的融合体组合物和方法包含:(a)脂质双层,(b)腔(例如,包含胞质溶胶),其被脂质双层包围;(c)融合剂,其相对于源细胞是外源的或过表达的,例如其中融合剂布置于脂质双层中;和(d)膜蛋白有效载荷剂。在实施方案中,融合体衍生自非植物细胞,例如哺乳动物细胞,或其衍生物(例如线粒体(mitochondrion)、线粒体(chondrisome)、细胞器、囊泡或去核细胞),并且包含融合剂,例如,蛋白质,脂质或化学融合剂。

[0721] 囊封(encapsulation)

[0722] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中包括融合体,例如具有融合剂的天然衍生的两亲性脂质双层。融合体可包含几种不同类型的脂质,例如两亲脂质,例如磷脂。融合体可包含脂质双层作为最外表面。此类组合物可出人意料地用于本发明的方法中。在

一些情况下,膜可采取自体、同种异体、异种或工程化细胞的形式,如Ahmad et al.2014Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport&enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy.EMBO Journal.33(9):994-1010中所述。在一些实施方案中,组合物包括工程化的膜,如例如Orive.et al.2015.Cell encapsulation: technical and clinical advances.Trends in Pharmacology Sciences;36(8):537-46;和Mishra.2016.Handbook of Encapsulation and Controlled Release.CRC Press中所述。在一些实施方案中,组合物包括天然存在的膜(McBride et al.2012.A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from mitochondria to lysosomes.Current Biology 22:135-141)。

[0723] 在一些实施方案中,本文所述的组合物包括天然衍生的膜,例如由细胞或组织制备的膜囊泡。在一些实施方案中,融合体为衍生自MSC或星形胶质细胞的囊泡。

[0724] 在一些实施方案中,融合体为外泌体。

[0725] 示例性外泌体和其他膜封闭体描述于例如US2016137716中,其以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,融合体包含例如可获自细胞的囊泡,例如微囊泡、外泌体、细胞凋亡体(来自凋亡细胞)、微粒(其可衍生自例如血小板)、核外粒体(可衍生自例如血清中的嗜中性粒细胞和单核细胞)、前列腺体(可获自前列腺癌细胞)、心脏体(可衍生自心肌细胞)等。

[0726] 示例性外泌体和其他膜封闭体还描述于W0/2017/161010、W0/2016/077639、US20160168572、US20150290343和US20070298118中,其各自以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,融合体包含细胞外囊泡、纳米囊泡或外泌体。在一些实施方案中,融合体包含细胞外囊泡,例如细胞衍生的囊泡,其包含封闭内部空间的膜且具有比衍生其的细胞更小的直径。在实施方案中,细胞外囊泡的直径为20nm至1000nm。在实施方案中,融合体包含细胞凋亡体、细胞片段、通过直接或间接操纵衍生自细胞的囊泡、小泡状细胞器和由活细胞产生的囊泡(例如通过具有质膜的晚期内体的直接质膜出芽或融合)。在实施方案中,细胞外囊泡衍生自活的或死的生物体、外植的组织或器官或培养的细胞。在实施方案中,融合体包含纳米囊泡,例如细胞衍生的小(例如直径在20-250nm之间,或直径在30-150nm之间)囊泡,所述囊泡包含封闭内部空间的膜,且通过直接或间接操纵由所述细胞产生。在一些情况下,纳米囊泡的产生可导致源细胞的破坏。纳米囊泡可包含脂质或脂肪酸和多肽。在实施方案中,融合体包含外泌体。在实施方案中,外泌体为细胞衍生的小(例如直径在20-300nm之间,或直径在40-200nm之间)囊泡,所述囊泡包含封闭内部空间的膜,且通过直接质膜出芽或通过晚期内体与质膜的融合由所述细胞产生。在实施方案中,外泌体的产生不会导致源细胞的破坏。在实施方案中,外泌体包含脂质或脂肪酸和多肽。

[0727] 示例性外泌体和其他膜封闭体还描述于US 20160354313中,其以全文引用的方式并入本文中。在实施方案中,融合体包含生物相容性递送模块、外泌体(例如直径为约30nm至约200nm)、微囊泡(例如直径为约100nm至约2000nm)、细胞凋亡体(例如直径为约300nm至约2000nm)、膜粒子、膜囊泡、外泌体样囊泡、核外粒体样囊泡、核外粒体或外型囊泡。

[0728] 在一些实施方案中,融合体为微囊泡。在一些实施方案中,融合体为细胞影。在一些实施方案中,囊泡为质膜囊泡,例如巨质膜囊泡。

[0729] 融合体可由若干不同类型的脂质,例如两亲性脂质,如磷脂制成。融合体可包含脂

质双层作为最外表面。此双层可由一个或多个相同或不同类型的脂质构成。实例包括但不限于磷脂,如磷酸胆碱和肌醇磷脂。特定实例包括但不限于DMPC、DOPC和DSPC。

[0730] 融合剂

[0731] 在一些实施方案中,本文所述的融合体(例如包含囊泡或细胞的一部分)包括一种或多种融合剂,例如以便于融合体融合至膜,例如细胞膜。另外,这些组合物可包括在合成期间或之后进行的表面修饰,以包括一种或多种融合剂。表面修饰可包含对膜的修饰,例如将脂质或蛋白质插入至膜中。

[0732] 在一些实施方案中,融合体在其外表面上包含一种或多种融合剂(例如整合至细胞膜中)以靶向特定细胞或组织类型(例如心肌细胞)。融合体可以包含靶向域。融合剂包括但不限于基于蛋白质、基于脂质和基于化学物质的融合剂。融合剂可结合配偶体,例如靶细胞表面上的特征。在一些实施方案中,靶细胞表面上的配偶体是靶细胞部分。在一些实施方案中,包含融合剂的融合体会将膜整合至靶细胞的脂质双层中。

[0733] 在一些实施方案中,本文所述的融合剂中的一种或多种可包括于融合体中。

[0734] 蛋白质融合剂

[0735] 在一些实施方案中,融合剂为蛋白质融合剂,例如哺乳动物蛋白或哺乳动物蛋白的同源物(例如具有50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大一致性);非哺乳动物蛋白,如病毒蛋白或病毒蛋白的同源物(例如具有50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大一致性);天然蛋白或天然蛋白的衍生物;合成蛋白;其片段;其变异体;包含一种或多种融合剂或片段的蛋白质融合物,和其任何组合。

[0736] 在一些实施方案中,融合剂引起融合体中的脂质与靶细胞中的脂质之间的混合。在一些实施方案中,融合剂使得在融合体的内腔与靶细胞的细胞溶质之间形成一个或多个孔,例如融合体为或包含如本文所述的连接蛋白。

[0737] (i) 哺乳动物蛋白

[0738] 在一些实施方案中,融合剂可包括哺乳动物蛋白,参见表1。哺乳动物融合剂的实例可包括但不限于SNARE家族蛋白,如vSNAREs和tSNAREs;合胞素蛋白,如Syncytin-1 (DOI: 10.1128/JVI.76.13.6442-6452.2002) 和Syncytin-2;myomaker ([biorxiv.org/content/early/2017/04/02/123158](https://doi.org/10.1101/123158), doi.org/10.1101/123158, [doi:10.1096/fj.201600945R](https://doi.org/10.1096/fj.201600945R), [doi:10.1038/nature12343](https://doi.org/10.1038/nature12343))、myomixer (www.nature.com/nature/journal/v499/n7458/full/nature12343.html, [doi:10.1038/nature12343](https://doi.org/10.1038/nature12343))、myomixer ([science.sciencemag.org/content/early/2017/04/05/science.aam9361](https://doi.org/10.1126/science.aam9361), DOI:10.1126/science.aam9361);FGFRL1 (成纤维细胞生长因子受体样1)、Minion (doi.org/10.1101/122697);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的同种型(例如如US 6,099,857A中所公开);间隙连接蛋白,如连接蛋白43、连接蛋白40、连接蛋白45、连接蛋白32或连接蛋白37(例如如US 2007/0224176中所公开);Hap2;能够诱导异源细胞之间的合胞体形成的任何蛋白质(参见表2);具有融合剂特性的任何蛋白质(参见表3);其同源物;其片段;其变异体;和包含一种或多种蛋白质或其片段的蛋白质融合物。在一些实施方案中,融合剂由在人类基因组中发现的人类内源反转录病毒元件(hERV)编码。另外的示例性融合剂公开于US 6,099,857A和US 2007/0224176中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0739] 表1:人类和非人类融合剂的非限制性实例。

人类和非人类融合剂类别		
融合剂类别	Uniprot 蛋白质家族 ID	序列编号
EFF-AFF	PF14884	191
SNARE	PF05739	5977
DC-STAMP	PF07782	633
ENV	PF00429	312

[0741] 表2:编码具有融合剂特性的蛋白质的基因。

具有以下基因本体注释的人类基因: 由质膜融合蛋白形成合胞体	
ID	符号
A0A024R0I0	DYRK1B
A0A024R1N1	MYH9
A0A024R2D8	CAV3
A0A096LNV2	FER1L5
A0A096LPA8	FER1L5
A0A096LPB1	FER1L5
A0AVI2	FER1L5
A6NI61	TMEM8C(肌肉标志物(myomaker))
B3KSL7	-
B7ZLI3	FER1L5
H0YD14	MYOF

	O43184	ADAM12
	O60242	ADGRB3
	O60500	NPHS1
	O95180	CACNA1H
	O95259	KCNH1
	P04628	WNT1
	P15172	MYOD1
	P17655	CAPN2
	P29475	NOS1
	P35579	MYH9
[0743]	P56539	CAV3
	Q2NNQ7	FER1L5
	Q4KMG0	CDON
	Q53GL0	PLEKHO1
	Q5TCZ1	SH3PXD2A
	Q6YHK3	CD109
	Q86V25	VASH2
	Q99697	PITX2
	Q9C0D5	TANC1
	Q9H295	DCSTAMP
	Q9NZM1	MYOF
	Q9Y463	DYRK1B

[0744] 表3:人类融合剂候选物

	融合剂类别	基因 ID
	SNARE	O15400
[0745]		Q16623
		K7EQB1
		Q86Y82
		E9PN33

	Q96NA8
	H3BT82
	Q9UNK0
	P32856
	Q13190
	O14662
	P61266
	O43752
	O60499
	Q13277
	B7ZBM8
	A0AVG3
	Q12846
DC-STAMP	Q9H295
[0746]	Q5T1A1
	Q5T197
	E9PJX3
	Q9BR26
ENV	Q9UQF0
	Q9N2K0
	P60507
	P60608
	B6SEH9
	P60508
	B6SEH8
	P61550
	P60509
	Q9N2J8
肌肉融合(肌肉标志物)	H0Y5B2
	H7C1S0

[0747]

	Q9HCN3
	A6NDV4
	K4DI83
肌肉融合(肌肉混合物(Myomixer))	NP_001302423.1
	ACT64390.1
	XP_018884517.1
	XP_017826615.1
	XP_020012665.1
	XP_017402927.1
	XP_019498363.1
	ELW65617.1
	ERE90100.1
	XP_017813001.1
	XP_017733785.1
	XP_017531750.1
	XP_020142594.1
	XP_019649987.1
	XP_019805280.1
	NP_001170939.1
	NP_001170941.1
	XP_019590171.1
	XP_019062106.1
	EPQ04443.1
	EPY76709.1
	XP_017652630.1
	XP_017459263.1
	OBS58441.1
	XP_017459262.1
	XP_017894180.1
	XP_020746447.1

	ELK00259.1
	XP_019312826.1
	XP_017200354.1
	BAH40091.1
HA	P03452
	Q9Q0U6
[0748]	P03460
间隙连接	P36382
	P17302
	P36383
	P08034
	P35212
其他	FGFRL1
	GAPDH

[0749] 在一些实施方案中,融合体包含产生曲率的蛋白质,例如Epsin1、发动蛋白或包含BAR域的蛋白质。参见例如Kozlov et al, Curr Opin Struct Biol 2015, Zimmerberg et al. Nat Rev 2006, Richard et al, Biochem J 2011。

[0750] (ii) 非哺乳动物蛋白

[0751] 病毒蛋白

[0752] 在一些实施方案中,融合剂可包括非哺乳动物蛋白,例如病毒蛋白。在一些实施方案中,病毒融合剂为I类病毒膜融合蛋白、II类病毒膜融合蛋白、III类病毒膜融合蛋白、病毒膜糖蛋白或其他病毒融合蛋白,或其同源物、其片段、其变异体或包含一种或多种蛋白质或其片段的蛋白质融合物。

[0753] 在一些实施方案中,I类病毒膜融合蛋白包括但不限于杆状病毒F蛋白,例如核型多角体病毒(NPV)属的F蛋白,例如甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*) MNPV (SeMNPV) F蛋白和舞毒蛾(*Lymantria dispar*) MNPV (LdMNPV),以及副粘病毒F蛋白。

[0754] 在一些实施方案中,II类病毒膜蛋白包括但不限于蜱骨脑炎E (TBEV E)、胜利基森林病毒(Semliki Forest Virus) E1/E2。

[0755] 在一些实施方案中,III类病毒膜融合蛋白包括但不限于弹状病毒G(例如水泡性口炎病毒的促融合蛋白G (VSV-G))、疱疹病毒糖蛋白B(例如单纯疱疹病毒1 (HSV-1) gB)、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr Virus)糖蛋白B (EBV gB)、索戈托病毒(thogotovirus) G、杆状病毒gp64(例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa California*)多重NPV (AcMNPV) gp64)和博纳病(Borna disease)病毒(BDV)糖蛋白(BDV G)。

[0756] 其他病毒融合剂的实例,例如膜糖蛋白和病毒融合蛋白包括但不限于:病毒合胞体蛋白,如流感病毒血凝素(HA)或突变体,或其融合蛋白;1型人类免疫缺陷病毒包膜蛋白

(HIV-1ENV)、来自HIV结合LFA-1以形成淋巴细胞合胞体的gp120、HIV gp41、HIV gp160或HIV反式转录激活因子(TAT);病毒糖蛋白VSV-G、来自弹状病毒科的水泡性口炎病毒的病毒糖蛋白;水痘-带状疱疹病毒(VZV)的糖蛋白gB和gH-gL;鼠类白血病病毒(MLV)-10A1;长臂猿白血病病毒糖蛋白(GaLV);狂犬病、莫科拉(Mokola)、水泡性口炎病毒和披膜病毒中的G型糖蛋白;鼠类肝炎病毒JHM表面突出蛋白;猪呼吸道冠状病毒纤突和膜糖蛋白;禽类传染性支气管炎纤突糖蛋白和其前体;牛肠道冠状病毒纤突蛋白;麻疹病毒的F和H、HN或G基因;犬瘟热病毒、新城疫病毒、人副流感病毒3、猿猴病毒41、仙台病毒和人类呼吸道合胞病毒;人类疱疹病毒1和猴水痘病毒的gH,具有伴随蛋白gL;人、牛和猕猴疱疹病毒gB;弗云德鼠(Friend murine)白血病病毒和梅森-菲舍猴(Mason Pfizer monkey)病毒的包膜糖蛋白;流行性腮腺炎病毒血凝素神经氨酸酶和糖蛋白F1和F2;来自委内瑞拉马脑脊髓炎的膜糖蛋白;副粘病毒F蛋白;SIV gp160蛋白;埃博拉病毒(Ebola virus)G蛋白;或仙台病毒融合蛋白,或其同源物、其片段、其变异体,和包含一种或多种蛋白质或其片段的蛋白质融合物。

[0757] 非哺乳动物融合剂包括病毒融合剂、其同源物、其片段和包含一种或多种蛋白质或其片段的融合蛋白。病毒融合剂包括I类融合剂、II类融合剂、III类融合剂和IV类融合剂。在实施方案中,I类融合剂,如人类免疫缺陷病毒(HIV)gp41具有特征性的融合后构象,其具有中心卷曲螺旋结构的 α -螺旋发夹的特征性三聚体。I类病毒融合蛋白包括具有中心融合后六螺旋束的蛋白。I类病毒融合蛋白包括流感HA、副流感F、HIV Env、埃博拉GP、来自正粘病毒的血凝素、来自副粘病毒的F蛋白(例如麻疹(Katoh et al. BMC Biotechnology 2010, 10:37))、来自逆转录病毒的ENV蛋白,以及丝状病毒和冠状病毒的融合剂。在实施方案中,II类病毒融合剂,如登革热E糖蛋白具有形成延长的胞外域的 β -折叠的结构特征,所述胞外域再折叠以产生发夹的三聚体。在实施方案中,II类病毒融合剂缺乏中心卷曲螺旋。II类病毒融合剂可发现于甲病毒(例如E1蛋白)和黄病毒(例如E糖蛋白)中。II类病毒融合剂包括来自胜利基森林病毒、辛比斯(Sinbis)、风疹病毒和登革病毒的融合剂。在实施方案中,III类病毒融合剂,如水泡性口炎病毒G糖蛋白组合I类和II类中发现的结构特征。在实施方案中,III类病毒融合剂包含 α 螺旋(例如与I类病毒融合剂一样形成六螺旋束以折叠蛋白质),和在其末端具有两亲性融合肽的 β 折叠,使人联想到II类病毒融合剂。III类病毒融合剂可发现于弹状病毒和疱疹病毒中。在实施方案中,IV类病毒融合剂为融合相关的小跨膜(FAST)蛋白(doi:10.1038/sj.emboj.7600767, Nesbitt, Rae L., “使用以多功能FAST蛋白配制的脂质体的靶向细胞内治疗性递送(Targeted Intracellular Therapeutic Delivery Using Liposomes Formulated with Multifunctional FAST proteins)” (2012). 电子论文和学位论文库(Electronic Thesis and Dissertation Repository.) 论文388),其由非包膜呼肠孤病毒编码。在实施方案中,IV类病毒融合剂足够小以致其不形成发夹(doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122422, doi:10.1016/j.devcel.2007.12.008)。

[0758] 在一些实施方案中,融合剂为副粘病毒融合剂。在一些实施方案中,融合剂为尼帕病毒蛋白F、麻疹病毒F蛋白、图帕伊阿副粘病毒F蛋白、副粘病毒F蛋白、亨德拉病毒F蛋白、亨尼帕病毒F蛋白、麻疹病毒F蛋白、呼吸道病毒F蛋白、仙台病毒F蛋白、腮腺炎病毒F蛋白或禽腮腺炎病毒F蛋白。

[0759] 另外的示例性融合剂公开于US 9,695,446、US 2004/0028687、US 6,416,997、US

7,329,807、US 2017/0112773、US 2009/0202622、WO 2006/027202和US 2004/0009604中，其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0760] (iii) 其他蛋白质

[0761] 在一些实施方案中，融合剂可包括pH依赖性(例如在缺血性损伤的情况下)蛋白、其同源物、其片段和包含一种或多种蛋白质或其片段的蛋白质融合物。融合剂可介导细胞表面处或在体内中或另一细胞膜结合空间中的膜融合。

[0762] 在一些实施方案中，融合剂包括EFF-1、AFF-1、间隙连接蛋白质，例如连接蛋白(如Cn43、GAP43、CX43) (DOI:10.1021/jacs.6b05191)、其他肿瘤连接蛋白、其同源物、其片段、其变异体和包含一种或多种蛋白质或其片段的蛋白质融合物。

[0763] 对蛋白质融合剂的修饰

[0764] 在一些实施方案中，蛋白质融合剂可被改变以降低免疫反应性。例如，蛋白质融合剂可用降低免疫相互作用的分子，如PEG修饰 (DOI:10.1128/JVI.78.2.912-921.2004)。因此，在一些实施方案中，融合剂包含PEG，例如为PEG化的多肽。由免疫系统靶向的融合剂中的氨基酸残基可被改变以无法被免疫系统识别 (doi:10.1016/j.virol.2014.01.027, doi:10.1371/journal.pone.0046667)。在一些实施方案中，融合剂的蛋白质序列被改变以类似于人体中发现的氨基酸序列(人类化)。在一些实施方案中，融合剂的蛋白质序列被改变为结合MHC复合物的强度较弱的蛋白质序列。在一些实施方案中，蛋白质融合剂衍生自不感染人类(且人类尚未针对其进行疫苗接种)的病毒或生物体，从而增加患者的免疫系统未经蛋白质融合剂治疗的可能性(例如存在可忽略的体液或细胞介导的针对融合剂的适应性免疫反应) (doi:10.1006/mthe.2002.0550, doi:10.1371/journal.ppat.1005641, doi:10.1038/gt.2011.209, DOI 10.1182/blood-2014-02-558163)。在一些实施方案中，可改变融合剂的糖基化以改变免疫相互作用或降低免疫反应性。不希望受理论所束缚，在一些实施方案中，衍生自不感染人类的病毒或生物体的蛋白质融合剂在患者中不具有天然融合靶标，且因此具有高特异性。

[0765] 脂质融合剂

[0766] 在一些实施方案中，可用促融合脂质，如饱和脂肪酸来处理融合体。在一些实施方案中，饱和脂肪酸具有10-14个碳。在一些实施方案中，饱和脂肪酸具有更长链的羧酸。在一些实施方案中，饱和脂肪酸为单酯。

[0767] 在一些实施方案中，融合体可用不饱和脂肪酸处理。在一些实施方案中，不饱和脂肪酸具有C16与C18之间的不饱和脂肪酸。在一些实施方案中，不饱和脂肪酸包括油酸、单油酸甘油酯、甘油酯、二酰甘油、改性不饱和脂肪酸和其任何组合。

[0768] 不希望受理论所束缚，在一些实施方案中，负曲率脂质促进膜融合。在一些实施方案中，融合体在膜中包含一种或多种负曲率脂质，例如相对于源细胞外源的负曲率脂质。在实施方案中，将负曲率脂质或其前体添加至包含源细胞或融合体的培养基。在实施方案中，源细胞被工程化以表达或过表达一种或多种脂质合成基因。负曲率脂质可例如为二酰甘油(DAG)、胆固醇、磷脂酸(PA)、磷脂酰乙醇胺(PE)或脂肪酸(FA)。

[0769] 不希望受理论所束缚，在一些实施方案中，正曲率脂质抑制膜融合。在一些实施方案中，融合体在膜中包含降低水平的一种或多种正曲率脂质，例如外源正曲率脂质。在实施方案中，通过抑制脂质合成，例如通过源细胞中的脂质合成基因的基因敲除或基因敲落来

降低水平。正曲率脂质可例如为溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、磷脂酰肌醇 (PtdIns)、溶血磷脂酸 (LPA)、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE) 或单酰基甘油 (MAG)。

[0770] 化学融合剂

[0771] 在一些实施方案中,融合体可用促融合化学物质处理。在一些实施方案中,促融合化学物质为聚乙二醇 (PEG) 或其衍生物。

[0772] 在一些实施方案中,化学融合剂诱导两个膜之间的局部脱水,导致双层的不利分子堆积。在一些实施方案中,化学融合剂诱导脂质双层附近区域的脱水,引起细胞之间的水分子移位并允许两个膜之间的共同相互作用。

[0773] 在一些实施方案中,化学融合剂为正阳离子。正阳离子的一些非限制性实例包括 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 La^{3+} 、 Sr^{3+} 和 H^{+} 。

[0774] 在一些实施方案中,化学融合剂通过改变表面极性而结合至靶膜,这改变了水合依赖性膜间排斥。

[0775] 在一些实施方案中,化学融合剂为可溶的脂溶性物质。一些非限制性实例包括油酰甘油、二油酰甘油、三油酰甘油以及其变异体和衍生物。

[0776] 在一些实施方案中,化学融合剂为水溶性化学物质。一些非限制性实例包括聚乙二醇、二甲基亚砷以及其变异体和衍生物。

[0777] 在一些实施方案中,化学融合剂为小有机分子。非限制性实例包括正己基溴。

[0778] 在一些实施方案中,化学融合剂不改变融合剂或靶膜的构成、细胞活力或离子迁移特性。

[0779] 在一些实施方案中,化学融合剂为激素或维生素。一些非限制性实例包括脱落酸、视黄醇 (维生素A1)、生育酚 (维生素E) 以及其变异体和衍生物。

[0780] 在一些实施方案中,融合体包含肌动蛋白和使聚合的肌动蛋白稳定的药剂。不希望受理论所束缚,融合体中的稳定的肌动蛋白可促进与靶细胞的融合。在实施方案中,使聚合的肌动蛋白稳定的药剂选自肌动蛋白、肌球蛋白、生物素-抗生蛋白链菌素、ATP、神经元韦斯考特-奥德里奇综合症 (Wiskott-Aldrich syndrome) 蛋白 (N-WASP) 或形成蛋白。参见例如 Langmuir.2011Aug 16;27 (16):10061-71 and Wen et al., Nat Commun.2016Aug 31;7。在实施方案中,融合体包含相对于源细胞而言外源或过表达的肌动蛋白,例如野生型肌动蛋白或包含促进聚合的突变的肌动蛋白。在实施方案中,融合体包含 ATP 或磷酸肌酸,例如外源 ATP 或磷酸肌酸。

[0781] 小分子融合剂

[0782] 在一些实施方案中,融合体可用促融合小分子处理。一些非限制性实例包括氟烷、非类固醇消炎药 (NSAID), 如美洛昔康、吡罗昔康、替诺昔康和氯丙嗪。

[0783] 在一些实施方案中,小分子融合剂可以胶束状聚集体存在或不含聚集体。

[0784] 融合剂修饰

[0785] 在一些实施方案中,融合剂连接至可裂解蛋白质。在某些情况下,可裂解蛋白质可通过暴露于蛋白酶而被裂解。工程化融合蛋白可结合跨膜蛋白的任何域。工程化融合蛋白可通过裂解肽与位于膜间空间内的蛋白质域连接。裂解肽可通过一种膜间蛋白酶或膜间蛋白酶的组 (例如 HTRA2/OMI, 其在位置 P1 处需要非极性脂族氨基酸, 缬氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸是优选的, 且在 P2 和 P3 位置处需要亲水性残基, 精氨酸是优选的) 裂解。

[0786] 在一些实施方案中,融合剂连接至亲和标签。在一些实施方案中,亲和标签有助于融合体分离和隔离。在一些实施方案中,亲和标签为可裂解的。在一些实施方案中,亲和标签非共价连接至融合剂。在一些实施方案中,亲和标签存在于融合体上且与融合剂分离。

[0787] 在一些实施方案中,融合剂蛋白通过本领域已知的任何方法或本文所述的任何方法工程化以包含蛋白水解降解序列,例如线粒体或胞质降解序列。融合剂蛋白可被工程化以包括但不限于蛋白水解降解序列,例如凋亡蛋白酶2蛋白质序列(例如Val-Asp-Val-Ala-Asp-|- (SEQ ID NO:1))或其他蛋白水解序列(参见例如Gasteiger等人,《蛋白质组学方案手册(The Proteomics Protocols Handbook)》;2005:571-607)、与野生型蛋白水解降解序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更大一致性的修饰的蛋白水解降解序列、胞质蛋白水解降解序列(例如泛素)或与野生型蛋白水解降解序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更大一致性的修饰的胞质蛋白水解降解序列。在一些实施方案中,组合物包含源细胞或线粒体中的线粒体,其包含经以下各者修饰的蛋白质:蛋白水解降解序列,例如与野生型蛋白水解降解序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更大一致性;胞质蛋白水解降解序列,例如泛素;或与野生型蛋白水解降解序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更大一致性的修饰的胞质蛋白水解降解序列。

[0788] 在一些实施方案中,融合剂可经识别特定蛋白质的蛋白酶域修饰,例如蛋白酶的过表达,例如具有蛋白酶活性的工程化融合蛋白。例如,蛋白酶或来自蛋白酶的蛋白酶域,如MMP、线粒体加工肽酶、线粒体中间肽酶、内膜肽酶。

[0789] 参见Alfonzo, J.D. & Soll, D. Mitochondrial tRNA import-the challenge to understand has just begun. *Biological Chemistry* 390:717-722. 2009; Langer, T. et al. Characterization of Peptides Released from Mitochondria. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 280, No. 4. 2691-2699, 2005; Vlieghe, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*. 15(1/2). 2010; Quiros P.M. et al., New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. V16, 2015; Weber-Lotfi, F. et al. DNA import competence and mitochondrial genetics. *Biopolymers and Cell*. Vol. 30. N 1. 71-73, 2014.

[0790] 非内吞进入靶细胞

[0791] 在一些实施方案中,本文所述的融合体或融合体组合物经由非内吞途径将货物递送至靶细胞。不希望受到理论的束缚,非内吞递送途径可以改善递送至细胞,例如细胞至所需细胞隔室的货物的量或百分比。

[0792] 因此,在一些实施方案中,当在内吞作用抑制剂存在下与靶细胞群体接触时,以及当与未用内吞作用抑制剂处理的参考靶细胞群体接触时,本文所述的多个融合体将货物递送至与参考靶细胞群体相比,至少30%、40%、50%、60%、70%或80%的靶细胞群体中的细胞数。

[0793] 在一些实施方案中,少于10%的货物通过内吞作用进入细胞。

[0794] 在一些实施方案中,内吞作用的抑制剂是溶酶体酸化的抑制剂,例如巴弗洛霉素(bafilomycin) A1。

[0795] 在一些实施方案中,使用内吞作用抑制测定法,例如国际申请W02018/208728的实

施例135的测定法来确定所递送的货物,其通过引用整体并入本文。

[0796] 在一些实施方案中,货物通过不依赖发动蛋白的途径或不依赖溶酶体酸化的途径,不依赖巨胞饮的途径或不依赖发动蛋白的途径进入细胞。

[0797] 在一些实施方案(例如用于分析货物的非内吞递送的实施方案)中,使用以下步骤中的一个或多个(例如全部)来分析货物递送:(a)将30,000个HEK-293T靶细胞置于包含100nM巴弗洛霉素A1的96孔板的第一孔中,且将类似数目的类似细胞置于缺少巴弗洛霉素A1的96孔板的第二孔中,(b)在DMEM培养基中在37°C和5%CO₂下培养靶细胞四小时,(c)使靶细胞与10μg包含货物的融合体接触,(d)在37°C和5%CO₂下温育靶细胞和融合体24小时,和(e)确定第一孔和第二孔中包含货物的细胞的百分比。步骤(e)可包含使用显微法,例如使用免疫荧光来检测货物。步骤(e)可包含间接检测货物,例如检测货物的下游效应,例如报告蛋白的存在。在一些实施方案中,如国际申请W02018/208728的施例135中所述地进行以上步骤(a)-(e)中的一个或多个。

[0798] 在一些实施方案中,内吞作用抑制剂(例如氯喹或巴弗洛霉素A1)抑制内体酸化。在一些实施方案中,货物递送独立于溶酶体酸化。在一些实施方案中,内吞作用抑制剂(例如Dynasore)抑制发动蛋白。在一些实施方案中,货物递送独立于发动蛋白活性。

[0799] 在一些实施方案中,融合体通过内吞作用进入靶细胞,例如,其中经由内吞途径递送的治疗剂的水平为0.01-0.6、0.01-0.1、0.1-0.3或0.3-0.6,或比与相似的融合体接触的氯喹处理的参考细胞至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,例如使用本文施例91的测定法。在一些实施方案中,融合体组合中至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的进入靶细胞的融合体经由非内吞途径进入,例如融合体经由与细胞表面融合进入靶细胞。在一些实施方案中,对于给定的融合体经由非内吞途径递送的治疗剂的水平为0.1-0.95、0.1-0.2、0.2-0.3、0.3-0.4、0.4-0.5、0.5-0.6、0.6-0.7、0.7-0.8、0.8-0.9、0.9-0.95,或比氯喹处理的参考细胞至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,例如使用本文施例90的测定法。在一些实施方案中,进入靶细胞的融合体组合中至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的融合体进入细胞质(例如,不进入内体或溶酶体)。在一些实施方案中,在膜蛋白有效载荷剂进入细胞质后,膜蛋白有效载荷剂或其中编码的多肽定位于细胞膜或被分泌。在一些实施方案中,进入靶细胞的融合体组合中小于90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%或1%的融合体进入内体或溶酶体。在一些实施方案中,融合体通过非内吞途径进入靶细胞,例如,其中递送的治疗剂的水平为氯喹处理的参考细胞的水平的至少90%、95%、98%或99%,例如使用施例91的测定法。在一个实施方案中,融合体经由发动蛋白介导的途径将药剂递送至靶细胞。在一个实施方案中,经由发动蛋白介导的途径递送的药剂的水平在比与相似融合体接触的Dynasore处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如施例92的测定法中所测量。在一个实施方案中,融合体经由巨胞饮作用将药剂递送至靶细胞。在一个实施方案中,经由巨胞饮作用递送的药剂的水平在比与相似融合体接触的EIPA处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如施例92的测定法中所

测量。在一个实施方案中,融合体经由肌动蛋白介导的途径将药剂递送至靶细胞。在一个实施方案中,经由肌动蛋白介导的途径递送的药剂的水平在比与相似融合体接触的拉春库林B处理的靶细胞0.01-0.6或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内,例如,如实施例92的测定法中所测量。

[0800] 在一些实施方案中,使用内吞抑制测定法,例如本文实施例55、90或92的测定法,确定递送至靶细胞的货物。

[0801] 在一些实施方案中,货物通过发动蛋白非依赖性途径或溶酶体酸化非依赖性途径、巨胞饮非依赖性途径(例如其中内吞作用抑制剂为巨胞饮抑制剂,例如5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利(EIPA),例如浓度为25 μ M)、或肌动蛋白非依赖性途径(例如其中内吞作用抑制剂为肌动蛋白聚合抑制剂,例如拉春库林B,例如浓度为6 μ M)进入细胞。

[0802] 在一些实施方案中,融合体当与靶细胞群体接触时,将货物递送至除内体或溶酶体之外的靶细胞位置,例如,递送至胞质溶胶或细胞膜。在实施方案中,小于50%,40%,30%,20%或10%的货物被递送至内体或溶酶体。

[0803] 特异性递送至靶细胞

[0804] 在一些实施方案中,与非靶细胞相比,本文所述的融合体组合物优先将货物递送至靶细胞。因此,在某些实施方案中,本文所述的融合体具有以下一种或两种性质:(i)当多个融合体与包含靶细胞和非靶细胞的细胞群体接触时,与非靶细胞相比,货物在多至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍的靶细胞中存在,或(ii)多个融合体以比非靶细胞高至少50%的速率与靶细胞融合。

[0805] 在一些实施方案中,通过显微术测量货物的存在,例如通过使用国际申请W02018/208728的实施例124的测定法,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,通过显微术测量融合,例如使用本文实施例54的测定法。在一些实施方案中,靶向部分对靶细胞上的细胞表面标志物具有特异性。在一些实施方案中,细胞表面标志物为皮肤细胞、心肌细胞、肝细胞、肠细胞(例如小肠细胞、胰腺细胞、脑细胞、前列腺细胞、肺细胞、结肠细胞或骨髓细胞的细胞表面标志物)。

[0806] 在一些实施方案(例如用于相对于非靶细胞,向靶细胞特异性递送货物的实施方案)中,使用以下步骤中的一个或多个(例如全部)来分析货物递送:(a)将30,000个过表达CD8a和CD8b的HEK-293T靶细胞置于96孔板的第一孔中,且将不过表达CD8a和CD8b的30,000个HEK-293T非靶细胞置于96孔板的第二孔中,(b)在DMEM培养基中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培养靶细胞四小时,(c)使靶细胞与10 μ g包含货物的融合体接触,(d)在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育靶细胞和融合体24小时,和(e)确定第一孔和第二孔中包含货物的细胞的百分比。步骤(e)可包含使用显微法,例如使用免疫荧光来检测货物。步骤(e)可包含间接检测货物,例如检测货物的下游效应,例如报告蛋白的存在。在一些实施例中,如国际申请W02018/208728实施例124中所述地进行以上步骤(a)-(e)中的一个或多个。

[0807] 在一些实施方案中,融合体以比与非靶细胞更高的速率与靶细胞融合,例如,高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,与其他融合体相比,融合体以更高的速率与靶细胞融合,例如高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,例如在实施例54的测定法中。在一些实施方案中,融合体以一定速

率与靶细胞融合,使得融合体中的药剂在24、48或72小时后得以递送至至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的靶细胞,例如在实施例54的测定法中。在实施方案中,靶定的融合物的量为约30%-70%、35%-65%、40%-60%、45%-55%或45%-50%,例如约48.8%,例如在实施例54的测定法中。在实施方案中,靶定的融合物的量为约20%-40%、25%-35%或30%-35%,例如约32.2%,例如在实施例55的测定法中。

[0808] 在一些实施方案中,与参考靶细胞群体或与非靶细胞群体相比,融合体组合物将至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的货物递送至靶细胞群体。在一些实施方案中,与参考靶细胞群体或与非靶细胞群体相比,融合体组合物将多至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的货物递送至靶细胞群体。

[0809] 融合体生成

[0810] 细胞产生的融合体

[0811] 融合体的组合物可从培养的细胞,例如培养的哺乳动物细胞,例如培养的人类细胞产生。细胞可为祖细胞或非祖(例如分化的)细胞。细胞可为初级细胞或细胞系(例如本文所述的哺乳动物,例如人类细胞系)。在实施方案中,培养的细胞为祖细胞,例如骨髓基质细胞、骨髓源性成年祖细胞(MAPC)、内皮祖细胞(EPC)、胚细胞、在室管膜下区中形成的中间祖细胞、神经干细胞、肌肉干细胞、卫星细胞、肝干细胞、造血干细胞、骨髓基质细胞、表皮干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞、脐带干细胞、前体细胞、肌肉前体细胞、成肌细胞、心肌细胞、神经前体细胞、神经胶质前体细胞、神经元前体细胞、成肝细胞。

[0812] 在一些实施方案中,源细胞为内皮细胞、成纤维细胞、血细胞(例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、白细胞)、干细胞(例如间充质干细胞、脐带干细胞、骨髓干细胞、造血干细胞、诱导多能干细胞,例如衍生自个体的细胞的诱导多能干细胞)、胚胎干细胞(例如来自胚胎卵黄囊、胎盘、脐带、胎儿皮肤、青少年皮肤、血液、骨髓、脂肪组织、造红细胞组织、造血组织的干细胞)、成肌细胞、实质细胞(例如肝细胞)、肺泡细胞、神经元(例如视网膜神经元细胞)、前体细胞(例如视网膜前体细胞、成髓细胞、骨髓前体细胞、胸腺细胞、性母细胞、成巨核细胞、幼巨核细胞、成黑素细胞、成淋巴细胞、骨髓前体细胞、正成红细胞或成血管细胞)、祖细胞(例如心肌祖细胞、卫星细胞、放射状胶质细胞、骨髓基质细胞、胰腺祖细胞、内皮祖细胞、胚细胞)或永生化细胞(例如HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080或BJ细胞)。

[0813] 培养的细胞可来自上皮、结缔组织、肌肉或神经组织或细胞,以及其组合。融合体可由来自任何真核(例如哺乳动物)器官系统的培养的细胞产生,例如来自心血管系统(心脏、脉管系统);消化系统(食道、胃、肝脏、胆囊、胰脏、肠、结肠、直肠和肛门);内分泌系统(下丘脑、脑下垂体、松果体或松果体腺体、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺);排泄系统(肾脏、输尿管、膀胱);淋巴系统(淋巴、淋巴结、淋巴管、扁桃体、腺样体、胸腺、脾脏);皮肤系统(皮肤、头发、指甲);肌肉系统(例如骨骼肌);神经系统(脑、脊髓、神经);生殖系统(卵巢、子宫、乳腺、睾丸、输精管、精囊、前列腺);呼吸系统(咽、喉、气管、支气管、肺、隔膜);骨骼系统(骨骼、软骨)以及其组合。在实施方案中,细胞来自高度有丝分裂的组织(例如高度有丝分裂的健康组织,如上皮、胚胎组织、骨髓、肠隐窝)。在实施方案中,组织样品为高代谢组织(例如骨骼组织、神经组织、心肌细胞)。

[0814] 在一些实施方案中,细胞是悬浮细胞。在一些实施方案中,细胞是贴壁细胞。

[0815] 在一些实施方案中,细胞来自年轻的供体,例如25岁、20岁、18岁、16岁、12岁、10岁、8岁、5岁、1岁或更年幼的供体。在一些实施方案中,细胞来自胎儿组织。

[0816] 在一些实施方案中,细胞衍生自个体且施用至相同个体或具有类似基因特征(例如MHC匹配的)的个体。

[0817] 在某些实施方案中,细胞具有平均尺寸(长度)为大于3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10000个核苷酸(例如长度在4,000-10,000个核苷酸之间、长度在6,000-10,000个核苷酸之间)的端粒。

[0818] 融合体可从总体上根据本领域已知的方法培养的细胞产生。在一些实施方案中,细胞可在2个或更多个“分期”中培养,例如生长期,其中在一定条件下培养细胞以倍增和增加培养物的生物量,和“生产”期,其中细胞在一定条件下培养以改变细胞表型(例如最大化线粒体表型、增加线粒体的数目或直径、增加氧化磷酸化状态)。还可存在“表达”期,其中在一定条件下培养细胞,以使蛋白质融合剂或相对于源细胞而言外源的药剂于细胞膜上的表达最大化且限制其他分期中不期望的融合。

[0819] 在一些实施方案中,从例如在生长期或生产期期间同步化的细胞产生融合体。例如,可通过从培养基消除血清(例如持续约12-24小时)或通过培养基中使用DNA合成抑制剂,如胸苷、氨基喋呤、羟基脲和胞嘧啶阿拉伯糖苷而使细胞在G1期同步化。用于哺乳动物细胞周期同步化的其他方法为已知的且公开于例如Rosner et al.2013.Nature Protocols 8:602-626(特别是Rosner中的表1)。

[0820] 在一些实施方案中,可评估细胞且任选地富集所需表型或基因型,以用作如本文所述的融合体组合物的来源。举例来说,可评估细胞且任选地富集例如以下中的一个或多个,例如在培养之前、在培养期间(例如在生长期或生产期期间)或在培养之后但在融合体产生之前:膜电位(例如-5至-200mV的膜电位;心磷脂含量(例如在总脂质的1-20%之间);胆固醇、磷脂酰乙醇胺(PE)、甘油二酯(DAG)、磷脂酸(PA)或脂肪酸(FA)含量;遗传质量>80%、>85%、>90%;融合剂表达或含量;货物表达或含量。

[0821] 在一些实施方案中,从细胞克隆产生融合体,所述细胞克隆基于用作本文所述的融合体组合物的来源所期望的表型或基因型而鉴别、选择或挑选。例如,基于低线粒体突变负荷、长端粒长度、分化状态或特定基因特征(例如与受体匹配的基因特征)而鉴别、选择或挑选细胞克隆。

[0822] 本文所述的融合体组合物可由来自一种细胞或组织来源或来源组合的融合体构成。例如,融合体组合物可包含来自异种来源(例如动物,前述物种的细胞的组织培养物)、同种异体、自体、来自产生不同蛋白质浓度和分布的特定组织(肝脏、骨骼、神经、脂肪等)、来自不同代谢状态(例如糖酵解、呼吸)的细胞的融合体。组合物还可包含处于不同代谢状态(例如偶联或非偶联)的融合体,如本文中其他地方所描述。

[0823] 在一些实施方案中,融合体由表达融合剂,例如本文所述的融合剂的源细胞产生。在一些实施方案中,融合剂被安置于源细胞的膜,例如脂质双层膜,例如细胞表面膜,或亚细胞膜(例如溶酶体膜)中。在一些实施方案中,融合体由源细胞产生,其中融合剂被安置于细胞表面膜中。

[0824] 在一些实施方案中,通过诱导外泌体、微囊泡、膜囊泡、细胞外膜囊泡、质膜囊泡、

巨质膜囊泡、细胞凋亡体、溶酶体、线粒体粒子(mitoparticle)、核细胞(pyrenocyte)或其他膜封闭囊泡的出芽来产生融合体。

[0825] 在一些实施方案中,通过诱导细胞去核而产生融合体。可以使用如遗传、化学(例如使用放线菌素D,参见Bayona-Bafaluyet al.,“A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to ρ° cells”Nucleic Acids Res.2003Aug 15;31(16):e98)、机械方法(例如挤压或抽吸,参见Lee et al.,“A comparative study on the efficiency of two enucleation methods in pig somatic cell nuclear transfer: effects of the squeezing and the aspiration methods.”AnimBiotechnol.2008;19(2):71-9)或其组合的分析来进行去核。去核不仅是指完全去除细胞核,而且还指将细胞核从其典型位置移开,使得细胞含有细胞核但它是无功能的。

[0826] 在实施方案中,制造融合体包含产生细胞影、巨质膜囊泡或细胞凋亡体。在实施方案中,融合体组合物包含细胞影、巨质膜囊泡和细胞凋亡体中的一个或多个。

[0827] 在一些实施方案中,通过诱导细胞片段化而产生融合体。在一些实施方案中,细胞片段化可使用以下方法进行,所述方法包括但不限于:化学方法、机械方法(例如离心(例如超速离心或密度离心)、冻融或超声处理)或其组合。

[0828] 在一些实施方案中,融合体可通过以下方法中的任一种、全部或组合由表达融合剂的源细胞(例如如本文所述)产生:

[0829] i) 诱导线粒体粒子、外泌体或其他膜封闭囊泡的出芽;

[0830] ii) 通过以下方法中的任一种或其组合诱导核灭活,例如去核:

[0831] a) 遗传方法;

[0832] b) 化学方法,例如使用放线菌素D;或

[0833] c) 机械方法,例如挤压或抽吸;或

[0834] iii) 诱导细胞片段化,例如通过以下方法中的任一种或其组合:

[0835] a) 化学方法;

[0836] b) 机械方法,例如离心(例如超速离心或密度离心);冻融;或超声处理。

[0837] 为了避免疑问,应理解,在许多情况下,实际用于制备融合体的源细胞在制成融合体之后将不可用于测试。因此,源细胞与融合体之间的比较不需要分析经实际修饰(例如去核)以制备融合体的源细胞。更确切地,可替代地分析与源细胞另外类似的细胞,例如来自相同培养物、相同基因型、相同组织类型或其任何组合。

[0838] 在融合体生成之前对细胞的修饰

[0839] 在一些方面中,在融合体生成之前对细胞进行修饰,如对个体、组织或细胞的修饰。此类修饰可有效地例如改善融合、融合剂表达或活性、货物的结构或功能或靶细胞的结构或功能。

[0840] (i) 物理修饰

[0841] 在一些实施方案中,细胞在产生融合体之前被物理修饰。例如,如本文中其他地方所描述,融合剂可连接至细胞表面。

[0842] 在一些实施方案中,在产生融合体之前用化学剂处理细胞。例如,可用化学或脂质融合剂处理细胞,使得化学或脂质融合剂与细胞表面非共价或共价相互作用或嵌入细胞表面内。在一些实施方案中,用药剂处理细胞以增强脂质于细胞膜中的促融合特性。

[0843] 在一些实施方案中,细胞在产生具有一个或多个共价或非共价连接位点的融合体之前被物理修饰,所述连接位点用于细胞表面上的增强融合体对器官、组织或细胞类型的靶向的合成或内源小分子或脂质。

[0844] 在实施方案中,融合体包含提高或降低水平的内源分子。例如,融合体可包含内源分子,所述内源分子也天然存在于天然存在的源细胞中,但其水平高于或低于融合体中的水平。在一些实施方案中,多肽由源细胞或融合体中的外源核酸表达。在一些实施方案中,多肽从来源分离并且被装载或结合至源细胞或融合体中。

[0845] 在一些实施方案中,在产生融合体之前用化学剂(例如小分子)处理细胞以增加内源融合剂于细胞中的表达或活性(例如在一些实施方案中,相对于源细胞内源,且在一些实施方案中,相对于靶细胞内源)。在一些实施方案中,小分子可增加内源融合剂的转录活化子的表达或活性。在一些实施方案中,小分子可降低内源融合剂的转录抑制子的表达或活性。在一些实施方案中,小分子为增加内源融合剂表达的表现遗传修饰剂。

[0846] 在一些实施方案中,从用融合抑制化合物,例如溶血磷脂酰胆碱处理的细胞产生融合体。在一些实施方案中,从用不裂解融合剂的解离试剂(例如细胞消化液(Accutase))处理的细胞产生融合体。

[0847] 在一些实施方案中,在产生融合体之前用例如CRISPR活化剂对源细胞进行物理修饰,以增加或提高融合剂的浓度。

[0848] 在一些实施方案中,细胞被物理修饰以增加或减少细胞器,例如线粒体、高尔基体、内质网、细胞内囊泡(如溶酶体、自噬体)的数量,或增强所述细胞器的结构或功能。

[0849] (ii) 遗传修饰

[0850] 在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞进行遗传修饰,以增加内源融合剂于细胞中的表达(例如在一些实施方案中,相对于源细胞内源,且在一些实施方案中,相对于靶细胞内源)。在一些实施方案中,遗传修饰可增加内源融合剂的转录活化子的表达或活性。在一些实施方案中,遗传修饰可降低内源融合剂的转录抑制子的表达或活性。在一些实施方案中,活化子或抑制子是与通过向导RNA靶向内源融合剂的转录活化子或抑制子连接的核酸酶无活性的cas9(dCas9)。在一些实施方案中,遗传修饰表现遗传修饰内源融合剂基因以增加其表达。在一些实施方案中,表现遗传活化子是与通过向导RNA靶向内源融合剂的表现遗传修饰剂连接的核酸酶无活性的cas9(dCas9)。

[0851] 在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞进行遗传修饰,以增加外源融合剂于细胞中的表达,例如转基因的递送。在一些实施方案中,在产生融合体之前将核酸,例如DNA、mRNA或siRNA转移至细胞,例如以增加或减少用于器官、组织或细胞靶向的细胞表面分子(蛋白质、聚糖、脂质或低分子量分子)的表达。在一些实施方案中,核酸靶向融合剂的抑制子,例如shRNA、siRNA构建体。在一些实施方案中,核酸编码融合剂抑制子的抑制剂。

[0852] 在一些实施方案中,方法包含将编码融合剂的相对于源细胞而言外源的核酸引入至源细胞中。外源核酸可以是例如DNA或RNA。在一些实施方案中,外源核酸可以是DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA、miRNA或sRNA等。在一些实施方案中,外源DNA可为线性DNA、环状DNA或人工染色体。在一些实施方案中,DNA被游离地维持。在一些实施方案中,DNA被整合至基因组中。外源RNA可为化学修饰的RNA,例如可包含一种或多种骨架修饰、糖修饰、非规范碱基或帽。骨架修饰包括例如硫代磷酸酯、N3'亚磷酰胺、硼烷磷酸酯、磷酰基乙

酸酯、硫代-PACE、吗啉代亚磷酰胺或PNA。糖修饰包括例如2'-O-Me、2'-F、2'-F-ANA、LNA、UNA和2'-O-MOE。非规范碱基包括例如5-溴-U和5-碘-U、2,6-二氨基嘌呤、C-5丙炔基嘧啶、二氟甲苯、二氟苯、二氯苯、2-硫尿苷、假尿苷和二氢尿苷。帽包括例如ARCA。另外的修饰论述于例如Deleavey et al., "Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing" Chemistry&Biology Volume 19, Issue 8, 24 August 2012, Pages 937-954, 其以全文引用的方式并入本文中。

[0853] 在一些实施方案中,在产生融合体之前用化学剂(例如小分子)处理细胞以增加相对于源细胞外源的融合剂于细胞中的表达或活性。在一些实施方案中,小分子可增加外源融合剂的转录活化子的表达或活性。在一些实施方案中,小分子可降低外源融合剂的转录抑制子的表达或活性。在一些实施方案中,小分子为增加外源融合剂表达的表观遗传修饰剂。

[0854] 在一些实施方案中,核酸编码修饰的融合剂。例如,具有可调节的促融合活性,例如特定细胞类型、组织类型或局部微环境活性的融合剂。此类可调节的促融合活性可包括通过低pH、高pH、热、红外光、细胞外酶活性(真核或原核)或暴露于小分子、蛋白质或脂质来活化和/或引发促融合活性。在一些实施方案中,小分子、蛋白质或脂质显示于靶细胞上。

[0855] 在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞进行遗传修饰,以改变(即,上调或下调)信号传导途径(例如Wnt/ β -连环蛋白途径)的表达。在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞进行遗传修饰,以改变(例如上调或下调)一种或多种所关注基因的表达。在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞进行遗传修饰,以改变(例如上调或下调)一种或多种所关注核酸(例如miRNA或mRNA)的表达。在一些实施方案中,在产生融合体之前将核酸,例如DNA、mRNA或siRNA转移至细胞,例如以增加或减少信号传导途径、基因或核酸的表达。在一些实施方案中,核酸靶向信号传导途径、基因或核酸的抑制子,或抑制信号传导途径、基因或核酸。在一些实施方案中,核酸编码上调或下调信号传导途径、基因或核酸的转录因子。在一些实施方案中,活化子或抑制子是与通过向导RNA靶向信号传导途径、基因或核酸的转录活化子或抑制子连接的核酸酶无活性的cas9(dCas9)。在一些实施方案中,遗传修饰表观遗传修饰内源信号传导途径、基因或核酸以使其表达。在一些实施方案中,表观遗传活化子是与通过向导RNA靶向信号传导途径、基因或核酸的表观遗传修饰剂连接的核酸酶无活性的cas9(dCas9)。在一些实施方案中,在产生融合体之前对细胞的DNA进行编辑,以改变(例如上调或下调)信号传导途径(例如Wnt/ β -连环蛋白途径)、基因或核酸的表达。在一些实施方案中,使用向导RNA和CRISPR-Cas9/Cpf1或其他基因编辑技术编辑DNA。

[0856] 可使用重组方法对细胞进行遗传修饰。可使用重组方法获得编码所需基因的核酸序列,例如通过从表达基因的细胞筛选文库、通过从已知包括基因的载体衍生基因或通过从含有其的细胞和组织直接分离(使用标准技术)。或者,可以合成方式产生所关注基因,而不是克隆所述基因。

[0857] 天然或合成核酸的表达通常通过将编码所关注基因的核酸与启动子可操作地连接,且将构建体并入至表达载体中来实现。载体可适合于在真核细胞中进行复制和整合。典型的克隆载体含有适用于表达所需核酸序列的转录与翻译终止子、起始序列和启动子。

[0858] 在一些实施方案中,可用一个或多个表达区,例如基因对细胞进行遗传修饰。在一些实施方案中,可用外源基因(例如能够表达外源基因产物,如RNA或多肽产物)和/或外源

调节核酸对细胞进行遗传修饰。在一些实施方案中,可用编码相对于靶细胞内源的基因产物的外源序列和/或能够调节内源基因表达的外源调节核酸对细胞进行遗传修饰。在一些实施方案中,可用外源基因和/或调节外源基因表达的调节核酸对细胞进行遗传修饰。在一些实施方案中,可用外源基因和/或调节内源基因表达的调节核酸对细胞进行遗传修饰。本领域技术人员应理解,本文所述的细胞可被遗传修饰以表达多种编码蛋白质或调节分子的外源基因,其可例如作用于靶细胞的内源或外源基因组的基因产物。在一些实施方案中,此类基因赋予融合体特征,例如调节与靶细胞的融合。在一些实施方案中,可对细胞进行遗传修饰以表达内源基因和/或调节核酸。在一些实施方案中,内源基因或调节核酸调节其他内源基因的表达。在一些实施方案中,细胞可被遗传修饰以表达内源基因和/或调节核酸,所述内源基因和/或调节核酸与其他染色体上的内源基因和/或调节核酸型式不同地(例如诱导性地、组织特异性地、组成性地或以更高或更低水平)表达。

[0859] 启动子元件(例如增强子)调节转录起始的频率。通常,这些元件位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管最近已显示许多启动子也含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的,以使得当元件相对于彼此反转或移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间距可在活性开始下降之前增加至相隔50bp。取决于启动子,似乎单个元件可协同或独立地起作用以活化转录。

[0860] 合适的启动子的一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列为强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作连接的任何聚核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一实例为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。但是,还可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)启动子、以及人类基因启动子,如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。

[0861] 另外,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,所述分子开关能够在需要此类表达时接通与其可操作连接的聚核苷酸序列的表达,或在不需要表达时关断所述表达。诱导型启动子的实例包括但不限于组织特异性启动子、金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。在一些实施方案中,在产生融合体之前,例如在产生融合体之前3、6、9、12、24、26、48、60或72小时上调融合剂的表达。

[0862] 引入至源中的表达载体还可含有选择标记基因或报告基因或二者,以便于从寻求被转染或通过病毒载体感染的细胞群体鉴别和选择表达细胞。在其他方面,选择标记可携带在单独的DNA片段上且用于共转染程序。选择标记和报导基因均可侧接有适当的调节序列,以使得能够在宿主细胞中表达。适用的选择标记包括例如抗生素抗性基因,如neo等。

[0863] 报告基因可用于鉴别潜在转染的细胞和评估调节序列的功能。一般来说,报告基因是如下的基因:受体来源中不存在或不被受体来源表达,并且编码通过一些易于检测的特性(例如酶活性)来体现表达的多肽。在DNA已引入至受体细胞之后的合适时间分析报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如Ui-Tei et al., 2000FEBS Letters

479:79-82)。合适的表达系统是众所周知的且可使用已知技术制备或商业上获得。一般来说,将具有最小5'侧接区,显示最高水平的报告基因表达的构建体鉴别为启动子。此类启动子区可与报告基因连接且用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0864] 在一些实施方案中,细胞可被遗传修饰以改变一种或多种蛋白质的表达。一种或多种蛋白质的表达可在特定的时间被修饰,例如来源的发育或分化状态。在一些实施方案中,融合体从被遗传修饰以改变一种或多种影响融合活性、结构或功能的蛋白,例如融合剂蛋白或非融合剂蛋白的表达的细胞来源产生。一种或多种蛋白质的表达可局限于一个或多个特定位置或遍及整个来源。

[0865] 在一些实施方案中,融合剂蛋白的表达被修饰。在一些实施方案中,融合体从具有修饰的融合剂蛋白表达,例如融合剂表达增加或减少至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或更多的细胞产生。

[0866] 在一些实施方案中,细胞可被工程化以表达靶向融合剂蛋白的胞质酶(例如蛋白酶、磷酸酶、激酶、脱甲基酶、甲基转移酶、乙酰基酶)。在一些实施方案中,胞质酶通过改变翻译后修饰来影响一种或多种融合剂。蛋白质的翻译后蛋白质修饰可影响对养分可用性和氧化还原条件的反应性,和蛋白质-蛋白质相互作用。在一些实施方案中,融合体包含具有改变的翻译后修饰,例如翻译后修饰增加或减少至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或更多的融合剂。

[0867] 将修饰引入至细胞中的方法包括物理、生物和化学方法。参见例如Geng,和Lu,用于细胞分析和递送的微流体电穿孔(Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery.)《芯片实验室(Lab on a Chip.)》13(19):3803-21.2013;Sharei,A.等人用于细胞内递送的无载体微流体平台(A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery.)《美国国家科学院院刊(PNAS)》第110卷第6期2013;Yin,H.等人,基于基因的疗法的非病毒载体(Non-viral vectors for gene-based therapy.)《自然综述遗传学(Nature Reviews Genetics.)》15:541-555.2014。修饰用于产生本文所述的融合体的细胞的合适方法包括例如扩散、渗透、渗透脉冲、渗透压休克、低渗溶解、低渗透析、离子电泳作用、电穿孔、超声处理、显微注射、钙沉淀、膜插层、脂质介导的转染、清洁剂处理、病毒感染、受体介导的内吞作用、蛋白质转导域的使用、粒子发射、膜融合、冻融、机械破坏和过滤。

[0868] 确认遗传修饰的存在包括多种测定法。此类测定法包括例如分子生物测定法,如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;生物化学测定法,如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学方法(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定法。

[0869] 融合体修饰

[0870] 在一些方面中,对融合体进行修饰。此类修饰可有效地(例如)改善靶向、功能或结构。

[0871] 在一些实施方案中,用可非共价或共价连接至膜表面的融合剂,例如本文所述的化学融合剂处理融合体。在一些实施方案中,用可将自身非共价或共价连接或嵌入于膜中的融合剂,例如蛋白质或脂质融合剂处理融合体。

[0872] 在一些实施方案中,配体通过存在于融合体表面上的官能性化学基团(羧酸、醛、胺、硫氢基和羟基)结合至融合体表面。

[0873] 此类反应性基团包括但不限于顺丁烯二酰亚胺基团。例如,可合成融合体以包括顺丁烯二酰亚胺结合的磷脂,如但不限于DSPE-MaL-PEG2000。

[0874] 在一些实施方案中,合成或天然的小分子或脂质可共价或非共价连接至融合体表面。在一些实施方案中,融合体中的膜脂质可被修饰以促进、诱导或增强促融合特性。

[0875] 在一些实施方案中,融合体通过装载修饰的蛋白质而修饰(例如实现新颖的功能性、改变翻译后修饰、结合至线粒体膜和/或线粒体膜蛋白、形成具有异源功能的可裂解蛋白质、形成预定用于蛋白水解降解的蛋白质、分析药剂的位置和水平或将药剂以载体形式递送)。在一些实施方案中,融合体装载有一个或多个修饰的蛋白质。

[0876] 在一些实施方案中,相对于源细胞外源的蛋白质非共价结合至融合体。蛋白质可包括用于释放的可裂解域。在一些实施方案中,本发明包括一种融合体,其包含具有可裂解域的外源蛋白。

[0877] 在一些实施方案中,融合体用预定用于蛋白水解降解的蛋白质修饰。多种蛋白酶识别特定的蛋白质氨基酸序列且靶向蛋白质以进行降解。这些蛋白质降解酶可用于特异性降解具有蛋白水解降解序列的蛋白质。在一些实施方案中,融合体包含调节的水平的一种或多种蛋白质降解酶,例如蛋白质降解酶增加或减少至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%更大。

[0878] 如本文所述,可将非融合剂添加剂添加至融合体以对其结构和/或特性进行修饰。例如,可将胆固醇或鞘磷脂添加至膜,以帮助稳定结构且防止内部货物泄漏。另外,可由氢化的卵磷脂酰胆碱或卵磷脂酰胆碱、胆固醇和磷酸二鲸蜡酯制备膜。(关于综述,参见例如Spuch和Navarro,《药物递送杂志》,第2011卷,文章编号469679,第12页,2011.doi:10.1155/2011/469679)。

[0879] 在一些实施方案中,融合体在外表面上包含一个或多个靶向基团(例如靶向蛋白)以靶向特定的细胞或组织类型(例如心肌细胞)。这些靶向基团包括但不限于受体、配体、抗体等。这些靶向基团在靶细胞的表面上结合其搭配物。在实施方案中,靶向蛋白特异性针对本文所述的靶细胞,例如皮肤细胞、心肌细胞、肝细胞、肠细胞(例如小肠细胞)、胰腺细胞、脑细胞、前列腺细胞、肺细胞、结肠细胞或骨髓细胞上的细胞表面标记。

[0880] 在一些实施方案中,靶向蛋白结合靶细胞上的细胞表面标记。在实施方案中,细胞表面标记包含蛋白质、糖蛋白、受体、细胞表面配体、I类跨膜蛋白、II类跨膜蛋白或III类跨膜蛋白。

[0881] 在一些实施方案中,靶向部分由多肽组成,所述多肽是与融合剂独立的多肽。在一些实施方案中,包含靶向部分的多肽包含跨膜域和细胞外靶向域。在实施方案中,细胞外靶向域包含scFv、DARPin、纳米抗体、受体配体或抗原。在一些实施方案中,细胞外靶向域包含抗体或其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、ScFv抗体片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、由VH和CH1域组成的Fd片段、线性抗体、单域抗体(如sdAb(VL或VH))或骆驼VHH域)、抗原结合III型纤连蛋白(Fn3)骨架(如纤连蛋白多肽微型抗体)、配体、细胞因子、趋化因子或T细胞受体(TCR)。

[0882] 在一些实施方案中,本文所述的融合体经诊断剂官能化。诊断剂的实例包括但不限于正电子发射断层扫描(PET)、计算机辅助断层扫描(CAT)、单光子发射计算机断层扫描、x射线、荧光透视法以及磁共振成像(MRI)中所用的市售成像剂;以及造影剂。适用作MRI中

的造影剂的材料实例包括钆螯合物,以及铁、镁、锰、铜和铬。

[0883] 将官能团引入至融合体的另一实例为在制备后期间,通过将融合体和配体与同双官能或异双官能交联剂直接交联。此程序可使用合适的化学物质和一类交联剂(如本文所述论的CDI、EDAC、戊二醛等)或在制备之后通过融合体表面的化学修饰将配体偶联至融合体表面的任何其他交联剂。这还包括一种方法,其中两亲性分子,如脂肪酸、脂质或功能稳定剂能够被动地吸附并粘附至融合体表面,由此引入官能性端基以系栓至配体。

[0884] 货物

[0885] 在一些实施方案中,本文所述的融合体包括作为或包含膜蛋白有效载荷剂的货物。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂可以是或可以编码治疗性蛋白。融合体可以另外包括其他货物,例如,在一些实施方案中,本文所述的融合体包括作为或包含治疗剂的货物。在一些实施方案中,本文所述的融合体包括多个膜有效载荷剂。在一些实施方案中,本文所述的融合体包括作为或包含多种治疗剂的货物。在一些实施方案中,融合体包括包含一种或多种膜蛋白有效载荷剂和一种或多种治疗剂的货物。在一些实施方案中,货物可以是相对于源细胞是外源的或内源的治疗剂。

[0886] 在一些实施方案中,融合体包含与融合体脂质双层缔合的货物。在一些实施方案中,融合体包含布置在融合体腔内的货物。在一些实施方案中,融合体包含与融合体脂质双层缔合的货物和布置在融合体腔内的货物。

[0887] 在一些实施方案中,货物在衍生融合体的细胞中不天然表达。在一些实施方案中,货物在衍生融合体的细胞中天然表达。在一些实施方案中,货物为在衍生融合体的细胞中天然表达的野生型核酸或蛋白质的突变体,或为在衍生融合体的细胞中天然表达的突变体的野生型。

[0888] 在一些实施方案中,货物通过在衍生融合体的细胞中的表达(例如由通过转染、转导或电穿孔引入的DNA的表达)而装载至融合体中。在一些实施方案中,货物由整合至从中衍生出融合体的细胞的基因组中或在从中衍生出融合体的细胞中以游离形式维持的DNA表达。在一些实施方案中,在从中衍生出融合体的细胞中货物的表达为组成性的。在一些实施方案中,在从中衍生出融合体的细胞中货物的表达为诱导性的。在一些实施方案中,紧邻在产生融合体之前在从中衍生出融合体的细胞中诱导货物的表达。在一些实施方案中,与在从中衍生出融合体的细胞中融合剂的表达同时诱导在从中衍生出融合体的细胞中货物的表达。

[0889] 在一些实施方案中,通过电穿孔将货物装载至融合体中,装载至融合体自身中或衍生融合体的细胞中。在一些实施方案中,通过转染将货物装载至融合体中,装载至融合体自身中或衍生融合体的细胞中。

[0890] 在一些方面,本公开提供包含以下的融合体组合物(例如药物组合物):(i)以下中的一个或多个:线粒体(例如如国际申请PCT/US16/64251中所述)、线粒体、细胞器(例如线粒体、溶酶体、细胞核、细胞膜、细胞质、内质网、核糖体、液泡、内体、剪接体、聚合酶、衣壳、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、肌原纤维、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡、应激颗粒和细胞器网络),或去核细胞,例如包含前述中的任一种的去核细胞,和(ii)融合剂,例如成肌蛋白。

[0891] 在实施方案中,融合剂存在于线粒体或线粒体外部的脂质双层中。在实施方案中,

线粒体具有如例如国际申请PCT/US16/64251中所描述的一种或多种特性,所述申请以全文引用的方式并入本文中,包括实例和发明内容。

[0892] 在一些实施方案中,货物可包括一种或多种核酸序列、一种或多种多肽、核酸序列和/或多肽的组合、一种或多种细胞器和其任何组合。在一些实施方案中,货物可包括一种或多种细胞组分。在一些实施方案中,货物包括一种或多种胞质和/或核组分。

[0893] 在一些实施方案中,货物包括核酸,例如DNA、nDNA(核DNA)、mtDNA(线粒体DNA)、蛋白质编码DNA、基因、操纵子、染色体、基因组、转座子、逆转录转座子、病毒基因组、内含子、外显子、修饰的DNA、mRNA(信使RNA)、tRNA(转移RNA)、修饰的RNA、微RNA、siRNA(小干扰RNA)、tmRNA(转移信使RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mtRNA(粒线体RNA)、snRNA(小核RNA)、小核仁RNA(snoRNA)、SmY RNA(mRNA反式剪接RNA)、gRNA(向导RNA)、TERC(端粒酶RNA组分)、aRNA(反义RNA)、顺式NAT(顺式天然反义转录物)、CRISPR RNA(crRNA)、lncRNA(长非编码RNA)、piRNA(piwi相互作用RNA)、shRNA(短发夹RNA)、tasiRNA(反式作用siRNA)、eRNA(增强子RNA)、卫星RNA、pcRNA(蛋白质编码RNA)、dsRNA(双链RNA)、RNAi(干扰RNA)、circRNA(环状RNA)、重编程RNA、适体和其任何组合。在一些实施方案中,核酸为野生型核酸。在一些实施方案中,蛋白质为突变核酸。在一些实施方案中,核酸为多个核酸序列的融合物或嵌合体。

[0894] 在一些实施方案中,使用基因编辑技术,例如向导RNA和CRISPR-Cas9/Cpf1,或使用不同的靶向核酸内切酶(例如锌指核酸酶、转录活化子样核酸酶(TALEN))编辑融合体中的DNA或衍生融合体的细胞中的DNA,以校正基因突变。在一些实施方案中,基因突变与个体的疾病相关。DNA编辑的实例包括小插入/缺失、大缺失、模板DNA的基因校正或DNA的大插入。在一些实施方案中,用非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)来实现基因编辑。在一些实施方案中,编辑为基因敲除。在一些实施方案中,编辑为基因敲入。在一些实施方案中,DNA的两个等位基因都被编辑。在一些实施方案中,单个等位基因被编辑。在一些实施方案中,进行多次编辑。在一些实施方案中,融合体或细胞衍生自个体,或与个体基因匹配,或与个体免疫学相容(例如具有类似MHC)。

[0895] 在一些实施方案中,货物可包括核酸。例如,货物可包含增强内源蛋白的表达的RNA(例如在一些实施方案中,相对于源细胞内源,且在一些实施方案中,相对于靶细胞内源),或抑制内源蛋白的蛋白质表达的siRNA或miRNA。例如,内源蛋白可调节靶细胞中的结构或功能。在一些实施方案中,货物可包括编码工程化蛋白质的核酸,所述工程化蛋白质调节靶细胞中的结构或功能。在一些实施方案中,货物是靶向调节靶细胞中的结构或功能的转录活化子的核酸。

[0896] 在一些实施方案中,货物包含例如本文所述的自复制RNA。在一些实施方案中,自复制RNA是单链RNA和/或线性RNA。在一些实施方案中,自复制RNA编码一种或多种蛋白质,例如本文所述的蛋白质,例如膜蛋白质或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,自复制RNA包含来自小动脉病毒或alpha病毒或其变体的部分或完整基因组。

[0897] 在一些实施方案中,货物可以包含可以被递送至靶细胞的RNA,并且RNA在靶细胞内部复制。自复制RNA的复制可涉及对于宿主细胞外源的RNA复制机制和/或对于宿主细胞内源的RNA复制机制。

[0898] 在一些实施方案中,自复制RNA包含病毒基因组或其自复制部分或类似物。在一些实施方案中,自复制的RNA来自正义单链RNA病毒。在一些实施方案中,自复制的RNA包含部

分或完整的动脉病毒基因组或其变体。在一些实施方案中,动脉病毒包括马动脉炎病毒(EAV)、猪呼吸与生殖综合症病毒(PRRSV)、乳酸脱氢酶升高病毒(LDV)和猿猴出血热病毒(SHFV)。在一些实施方案中,自复制RNA包含部分或完整的alpha病毒基因组或其变体。在一些实施方案中,alpha病毒属于VEEV/EEEV组(例如委内瑞拉马脑炎病毒)、SF组或SIN组。

[0899] 在一些实施方案中,包含自复制RNA的融合体进一步包含:(i)一种或多种促进RNA复制的蛋白质,或(ii)编码一种或多种促进RNA复制的蛋白质的核酸。RNA,例如,作为自复制RNA的一部分或在单独的核酸分子中。

[0900] 在一些实施方案中,相对于相应的野生型基因组,自复制RNA缺乏至少一种编码一种或多种病毒结构蛋白的功能基因。例如,在一些实施方案中,自复制的RNA完全缺乏病毒结构蛋白的一个或多个基因,或包含病毒结构蛋白的非功能性突变基因。在一些实施方案中,自复制的RNA不包含病毒结构蛋白的任何基因。

[0901] 在一些实施方案中,自复制RNA包含病毒衣壳增强子,例如,如国际申请W02018/106615中所述,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,病毒衣壳增强子是RNA结构,其例如通过允许编码序列的eIF2alpha独立翻译来增加顺式中编码序列的翻译。在一些实施方案中,宿主细胞例如由于PKR介导的eIF2alpha的磷酸化而具有受损的翻译。在实施方案中,病毒衣壳增强子包含来自病毒衣壳蛋白或DLP的变体的下游环(DLP)。在一些实施方案中,病毒衣壳增强子来自属于披衣病毒科的病毒,例如披衣病毒科的甲病毒属。在一些实施方案中,病毒衣壳增强子具有W02018/106615的SEQ ID NO:1的序列(该序列通过引用整体并入本文)或与之具有至少70%、80%、85%、90%、95%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,序列具有W02018/106615的图1中所示的相同二级结构。

[0902] 在一些实施方案中,自复制的RNA包含一个或多个动脉病毒序列,例如,如国际申请W02017/180770中所述,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,自复制的RNA包含ORF7(或其功能片段或变体)和/或自复制的RNA缺乏动脉病毒的功能性ORF2a(例如,完全缺乏ORF2a,或包含ORF2a的非功能性突变体)。。在一些实施方案中,自复制RNA缺乏功能性ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5a、ORF5或ORF6或其任何组合(例如、完全缺乏序列或包含序列的无功能突变体)。在一些实施方案中,自复制的RNA缺少ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5a、ORF5或ORF6中的一个或多个的一部分。在一些实施方案中,自复制RNA包含例如位于非天然位点的一个或多个亚基因组(sg)启动子。在一些实施方案中,启动子包括sg启动子1、sg启动子2、sg启动子3、sg启动子4、sg启动子5、sg启动子6、sg启动子7或其功能片段或变体。在一些实施方案中,自复制RNA包含一个或多个转录终止信号,例如T7转录终止信号,例如突变体T7转录终止信号,例如,包含T9001G、T3185A或G3188A的一个或多个(例如其中任两个或全部)的突变体T7转录终止信号。

[0903] 在一些实施方案中,自复制的RNA包含5' UTR,例如,突变体alpha病毒5' UTR,例如,如国际申请W02018/075235中所述,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,突变体alpha病毒5' UTR在位置1、2、4或其组合上包含一个或多个核苷酸取代。在一些实施方案中,突变体alpha病毒5' UTR在位置2处包含U→G取代。

[0904] 在一些实施方案中,货物包括多肽,例如酶、结构多肽、信号传导多肽、调节多肽、转运多肽、感觉多肽、运动多肽、防御多肽、贮存多肽、转录因子、抗体、细胞因子、激素、分解代谢多肽、合成代谢多肽、蛋白水解多肽、代谢多肽、激酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、

连接酶、酶调节剂多肽、蛋白质结合多肽、脂质结合多肽、膜融合多肽、细胞分化多肽、表观遗传多肽、细胞死亡多肽、核转运多肽、核酸结合多肽、重编程多肽、DNA编辑多肽、DNA修复多肽、DNA重组多肽、转座酶多肽、DNA整合多肽、靶向核酸内切酶(例如锌指核酸酶、转录活化子样核酸酶(TALEN)、cas9和其同源物)、重组酶和其任何组合。在一些实施方案中,蛋白质靶向细胞中的蛋白质以进行降解。在一些实施方案中,蛋白质通过将蛋白质定位于蛋白酶体而靶向细胞中的蛋白质以进行降解。在一些实施方案中,蛋白质为野生型蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质为突变蛋白。在一些实施方案中,蛋白质为融合或嵌合蛋白。

[0905] 在一些实施方案中,货物包括小分子,例如离子(例如 Ca^{2+} 、 Cl^{-} 、 Fe^{2+})、碳水化合物、脂质、活性氧类、活性氮类、类异戊二烯、信号传导分子、血红素、多肽辅因子、受电子化合物、给电子化合物、代谢物、配体和其任何组合。在一些实施方案中,小分子为与细胞中的靶标相互作用的药物。在一些实施方案中,小分子靶向细胞中的蛋白质以进行降解。在一些实施方案中,小分子通过将蛋白质定位于蛋白酶体而靶向细胞中的蛋白质以进行降解。在一些实施方案中,小分子为蛋白水解靶向嵌合体分子(PROTAC)。

[0906] 在一些实施方案中,货物包括蛋白质、核酸或代谢物,例如多个多肽、多个核酸、多个小分子的混合物;核酸、多肽和小分子的组合;核糖核蛋白复合物(例如Cas9-gRNA复合物);多个转录因子、多个表观遗传因子、重编程因子(例如Oct4、Sox2、cMyc和Klf4);多个调节RNA;和其任何组合。

[0907] 在一些实施方案中,货物包括一种或多种细胞器,例如线粒体、线粒体、溶酶体、细胞核、细胞膜、细胞质、内质网、核糖体、液泡、内体、剪接体、聚合酶、衣壳、顶体、自噬体、中心粒、糖酵解酶体、乙醛酸循环体、氢化酶体、黑素体、纺锤剩体、肌原纤维、刺丝囊、过氧化物酶体、蛋白酶体、囊泡、应激颗粒、细胞器网络和其任何组合。

[0908] 在一些实施方案中,货物富集于融合体或细胞膜。在一些实施方案中,通过经由肽信号序列靶向至膜来富集货物。在一些实施方案中,货物通过与膜缔合的蛋白质、脂质或小分子结合而富集。在一些实施方案中,货物通过与膜缔合的蛋白质、脂质或小分子二聚而富集。在一些实施方案中,货物为嵌合的(例如嵌合蛋白或核酸)且包含介导与膜缔合的蛋白质、脂质或小分子的结合或二聚化的域。所关注的膜缔合的蛋白质包括但不限于具有与细胞膜稳定结合(例如结合、整合等)的域(即,膜结合域)的任何蛋白质,其中此类域可包括肉豆蔻酰基化域、法呢基化域、跨膜域等。所关注的特定膜缔合的蛋白质包括但不限于:肉豆蔻酰基化蛋白质,例如p 60v-src等;法呢基化蛋白质,例如Ras、Rheb和CENP-E,F(通过结合至磷脂酰丝氨酸,一种细胞膜双层的脂质组分而结合特定脂质双层组分(例如膜联蛋白V)的蛋白质)等;膜锚蛋白;跨膜蛋白,例如转铁蛋白受体和其部分;和膜融合蛋白。在一些实施方案中,膜缔合的蛋白质含有第一二聚化域。第一二聚化域可以是例如直接结合至货物的第二二聚化域或通过二聚化介体结合至第二二聚化域的域。在一些实施方案中,货物含有第二二聚化域。第二二聚化域可以是例如直接或通过二聚化介体与膜缔合的蛋白质的第一二聚化域二聚(例如稳定结合,如通过非共价结合相互作用,直接或通过介体)的域。关于二聚化域,这些域是直接或通过二聚化介体参与结合事件的域,其中结合事件使得产生膜缔合的蛋白质与靶蛋白的所需多聚(例如二聚)复合物。第一和第二二聚化域可以是同二聚体,使得它们由氨基酸的相同序列构成,或异二聚体,使得它们由氨基酸的不同序列构成。二聚化域可变化,其中所关注的域包括但不限于:靶生物分子的配体,如特异性结合至所关

注的特定蛋白质的配体(例如蛋白质:蛋白质相互作用域),如SH2域、Paz域、RING域、转录活化子域、DNA结合域、酶催化域、酶调节域、酶次单位、定位至定义的细胞位置的域、定位域的识别域、如下URL所列的域:pawsonlab.mshri.on.ca/index.php?option=com_content&task=view&id=30&Itemid=63/等。在一些实施方案中,第一二聚化域结合核酸(例如mRNA、miRNA、siRNA、DNA)且第二二聚化域为货物上存在的核酸序列(例如第一二聚化域为MS2且第二二聚化域为MS2RNA的高亲和力结合环)。可使用起二聚化介体作用的任何方便的化合物。多种化合物,包括天然存在的和合成的物质可用作二聚化介体。选择二聚化介体的适用且易于观察或测量的标准包括:(a)配体为生理学上可接受的(即,对使用所述配体的细胞或动物没有异常毒性);(b)其具有合理的治疗剂量范围;(c)其可根据需要穿过细胞膜和其他膜(其中在一些情况下,其可能能够介导细胞外部的二聚化),和(D)以对于所需应用合理的亲和力结合至其所设计用于的嵌合蛋白的靶域。第一个必要标准是化合物在生理上是相对惰性的,但其具有二聚化介体活性。在一些情况下,配体将为非肽和非核酸。另外的二聚化域描述于例如US20170087087和US20170130197中,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0909] 有效载荷剂

[0910] 本文所述的方法和组合物可用于靶向有效载荷剂。例如,可通过例如使用共翻译内质网(ER)信号将有效载荷剂靶向细胞膜。细胞膜可以是例如ER膜、质膜、分泌的膜和/或分泌囊泡或溶酶体膜。在一些实施方案中,有效载荷剂靶向分泌。在一些实施方案中,本文中所述的方法和组合物可用于在ER中翻译后将有效载荷剂靶向细胞器(例如高尔基体、分泌性囊泡或溶酶体)的腔。

[0911] 蛋白质有效载荷剂(例如,膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)可以是或包含例如蛋白质或编码蛋白质的核酸,其选自:跨膜蛋白、细胞表面蛋白、与膜的胞质侧相关的蛋白、内质网蛋白、溶酶体蛋白、高尔基体蛋白、分泌蛋白、分泌性囊泡蛋白或内体蛋白,或其组合。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是天然存在于靶膜中或靶向靶膜的蛋白质的外源形式。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂不是天然存在的或不靶向靶膜。在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂(例如,膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)可以是或包含例如蛋白质或编码蛋白质的核酸,其选自:细胞表面受体蛋白、转运蛋白、离子通道、膜相关酶、细胞粘附蛋白、免疫球蛋白、T细胞受体、内质网蛋白、溶酶体蛋白、高尔基体蛋白、分泌蛋白、分泌性囊泡蛋白、内体蛋白。膜蛋白有效载荷剂可以是例如天然存在的膜蛋白的重组形式,或合成蛋白,例如具有自然界中未发现的序列或自然界中未发现的域的蛋白,例如嵌合膜蛋白,例如,具有衍生自第一天然存在的蛋白质的细胞外域和衍生自第二天然存在的蛋白质的跨膜域和/或细胞内域的跨膜蛋白,例如嵌合抗原受体。

[0912] 在一些实施方案中,融合体包含蛋白质有效载荷剂(例如,膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)。在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂是蛋白质和/或编码其的核酸。在一些实施方案中,蛋白质在细胞系中表达,然后掺入融合体。本领域普通技术人员将理解,在细胞系表达任何此类蛋白质的程度上,细胞系能够进行制备该蛋白质所需的任何翻译后加工。在一些实施方案中,翻译后加工包括以下的一种或多种:蛋白质剪接、蛋白质切割、蛋白质折叠、蛋白质糖基化、二聚化等。

[0913] 在一些实施方案中,蛋白质(例如膜蛋白质或分泌的蛋白质)由源细胞表达,融合

体衍生自所述源细胞。本领域普通技术人员将理解,在源细胞表达任何此类蛋白质的程度上,源细胞能够进行制造该蛋白质所需的任何翻译后加工。在一些实施方案中,翻译后加工包括以下的一种或多种:蛋白质剪接、蛋白质切割、蛋白质折叠、蛋白质糖基化、二聚化等。在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂是核酸。在一些实施方案中,核酸编码细胞表面蛋白。在一些实施方案中,核酸编码内质网蛋白、溶酶体蛋白、高尔基体蛋白、分泌蛋白、分泌囊泡蛋白或内体蛋白。在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂,例如膜蛋白有效载荷剂,是选自本文所述的细胞表面抗原的蛋白质或编码选自本文所述的细胞表面抗原的蛋白质的核酸。在一些实施方案中,核酸编码工程化的细胞表面蛋白。在一些实施方案中,工程化的细胞表面蛋白是嵌合抗原受体。

[0914] 在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂(例如膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)包含由融合的靶细胞表达的核酸。本领域普通技术人员将理解,在通过表达核酸产生任何蛋白质的程度上,蛋白膜有效载荷剂需要翻译后加工,此类翻译后加工将在融合的靶细胞中进行。在一些实施方案中,翻译后加工包括以下的一种或多种:蛋白质剪接、蛋白质切割、蛋白质折叠、蛋白质糖基化、二聚化等。在一些实施方案中,翻译后修饰是脂质例如脂肪酸、类异戊二烯、固醇、磷脂、糖基磷脂酰肌醇(GPI)、胆固醇、法呢基、香叶基香叶基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基的共价连接,其在一些实施方案中将蛋白质靶向质膜。

[0915] 在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂(例如膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)包含核酸,例如RNA或DNA。在一些实施方案中,核酸是一个或多个天然核酸残基、包含一个或多个天然核酸残基或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施方案中,核酸是一个或多个核酸类似物、包含一个或多个核酸类似物或由一个或多个核酸类似物组成。在一些实施方案中,核酸具有编码功能性基因产物(例如RNA或蛋白质)的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸包括一个或多个内含子。在一些实施方案中,通过从天然来源分离,基于互补模板(体内或体外)的聚合酶促合成,在重组细胞或系统中繁殖以及化学合成中的一种或多种来制备核酸。在一些实施方案中,核酸为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000或更多个残基长。在一些实施方案中,核酸为部分或全部单链;在一些实施方案中,核酸为部分或全部双链。在一些实施方案中,核酸具有包含至少一个编码多肽的元件或至少一个与编码多肽的序列的互补的元件的核苷酸序列。核酸可以包括变体,例如与参考核酸具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%整体序列同一性。在一些实施方案中,变体核酸不与参考核酸共享至少一个特征序列元件。在一些实施方案中,变体核酸共享参考核酸的一种或多种生物活性。在一些实施方案中,核酸变体具有与参考物相同的核酸序列,但是在特定位置具有少量的序列改变。在一些实施方案中,与参考物相比,变体中少于约20%、约15%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%或约2%的残基得以取代、插入或缺失。在一些实施方案中,与参考物相比,变体核酸包含约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2或约1个取代的残基。在一些实施方案中,相对于参考物,变体核酸包含非常少数目(例如少于约5、约4、约3、约2或约1)数目的取代、插入或缺失的参与特定生物学活性的功能残基。在一些实施方案中,与参考物相比,变体核酸包含不超过约15、约

12、约9、约3或约1个添加或缺失,并且在一些实施方案中,不包含添加或缺失。在一些实施方案中,与参考物相比,变体核酸包含少于约27、约24、约21、约18、约15、约12、约9、约6、约3个或少于约9、约6、约3或约2个添加或缺失。

[0916] 在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂(例如膜蛋白有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)包含蛋白质。蛋白质可以包括氨基酸以外的部分(例如可以是糖蛋白、蛋白聚糖等)和/或可以其他方式加工或修饰。蛋白质有时可以包括超过一个的多肽链,例如通过一个或多个二硫键连接或通过其他方式缔合。蛋白质可以包含L-氨基酸、D-氨基酸或两者,并且可以包含多种氨基酸修饰或类似物中的任何一种。在一些实施方案中,蛋白质可以包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合。在一些实施方案中,蛋白质是抗体、抗体片段、其生物学活性部分和/或其特征部分。多肽可以包括其变体,例如与参考多肽具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%整体序列同一性。在一些实施方案中,变体多肽不与参考多肽共享至少一个特征序列元件。在一些实施方案中,变体多肽共享参考多肽的一种或多种生物活性。在一些实施方案中,多肽变体具有与参考物相同的氨基酸序列,但是在特定位置具有少量的序列改变。在一些实施方案中,与参考物相比,变体中少于约20%、约15%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%或约2%的残基得以取代、插入或缺失。在一些实施方案中,与参考物相比,变体多肽包含约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2或约1个取代的残基残基。在一些实施方案中,相对于参考物,变体多肽包含非常少数目(例如少于约5、约4、约3、约2或约1)数目的取代、插入或缺失的参与特定生物学活性的功能。在一些实施方案中,与参考物相比,变体多肽包含不超过约5、约4、约3、约2或约1个添加或缺失,并且在一些实施方案中,不包含添加或缺失。在一些实施方案中,与参考物相比,变体多肽包含少于约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约10、约9、约8、约7、约6,并通常少于约5、约4、约3或约2个添加或缺失。

[0917] 信号序列

[0918] 在一些实施方案中,蛋白质有效载荷剂(例如,膜蛋白质有效载荷剂或分泌的蛋白质有效载荷剂)是蛋白质(或编码其的核酸),其包括将蛋白质引导至特定位点或位置(例如至细胞表面)的信号序列。本领域技术人员将理解,在某些情况下,细胞使用“分选信号”,其是至少暂时属于蛋白质的一部分(例如,当最初产生时)的氨基酸基序,以将蛋白质靶向至特定的亚细胞位置(例如,至靶细胞的特定细胞器或表面膜)。在一些实施方案中,分选信号是信号序列、信号肽或前导序列,其将蛋白质引导至称为内质网(ER)的细胞器;在一些此类实施方案中,然后将蛋白质递送至质膜。参见US20160289674A1。在一些这样的实施方案中,然后分泌蛋白质。在一些此类实施方案中,然后将蛋白质运输至溶酶体。在一些此类实施方案中,然后将蛋白质运输至高尔基体。在一些此类实施方案中,然后将蛋白质运输至分泌囊泡,然后可以将其从细胞中分泌出来。在一些此类实施方案中,然后将蛋白质运输至内体。

[0919] 在一些实施方案中,靶向ER的蛋白质是共翻译的。在一些实施方案中,蛋白质易位和膜插入与蛋白质合成偶联。在一些实施方案中,信号序列可以是疏水的。在一些实施方案中,信号序列可以是部分疏水的。在一些实施方案中,信号序列被信号识别粒子(SRP)识别。在一些实施方案中,当信号序列从核糖体出现时,SRP识别信号序列。在一些实施方案中,新生肽链-核糖体复合物通过与SRP受体结合而靶向ER。在一些实施方案中,信号序列与转座

子的Sec61 α 亚基相互作用并起始膜蛋白或所述膜蛋白的部分链的易位。

[0920] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含感兴趣的蛋白质与跨膜蛋白的编码序列的框内融合,或感兴趣的蛋白质与蛋白质的跨膜域或膜锚定域框内融合(例如与转铁蛋白受体膜锚定域融合)。参见例如Winndard,P,et al.Development of novel chimeric transmembrane proteins for multimodality imaging of cancer cells,Cancer Biology&Therapy.12:1889-1899(2007)。

[0921] 在一些实施方案中,将分选信号或信号肽附加到蛋白质(例如膜蛋白或分泌的蛋白质)的N或C末端。参见Goder,V.&Spiess,M.,Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics.FEBS Letters.504(3):87-93(2001)。在一些实施方案中,蛋白质是天然蛋白质。在一些实施方案中,膜蛋白是合成蛋白质。

[0922] 在一些实施方案中,仅在转录物的翻译已经达到终止密码子之后才从核糖体中出现信号。在一些实施方案中,膜蛋白的插入是翻译后的。

[0923] 在一些实施方案中,信号序列选自表4。在一些实施方案中,信号序列包含选自表4的序列。在一些实施方案中,表4的信号序列可以附加至蛋白质,例如膜蛋白或分泌蛋白的N-末端。在一些实施方案中,表4的信号序列可以附加到蛋白质,例如膜蛋白质或分泌的蛋白质的C-末端。本领域普通技术人员将理解,以下信号序列不限于与其各自的天然相关蛋白质一起使用。在一些实施方案中,核酸包含一种或多种调节元件,其指导靶细胞表达编码膜蛋白的序列。

[0924] 表4: 示例性信号序列。

[0925]

SEQ ID NO:	信号序列	天然相关蛋白质	相关蛋白质引导的位置
2	<u>MRVKEKYQHL WRWGKWKWTM</u> <u>LLGILMICSATE</u>	HIV-1 gp41	质膜
3	<u>CAAL</u>	p21ras	质膜
4	<u>KKKKKK</u>	p21ras	质膜
5	<u>RRRRR</u>	p21ras	质膜
6	<u>MRLLLALLGV LLSVPGPPVL S</u>	FGFR4	质膜
7	<u>CSIMNLMCGS TC</u>	ROP7 GTPase	质膜
8	<u>GHKSEEKREK MKRTLKDWK</u> <u>TRLSYFLQNS STPGKPKTGK KSKQQ</u>	RGS2	质膜
9	<u>RSTLKLTTLQ CQYSTVMD</u>	LHR	质膜\基底外侧细胞表面
10	<u>RQGLHNMEDV YELIENSH</u>	TSHR	质膜\基底外侧细胞表面
11	<u>MDCRKMARFS YSVIWIMAI</u> <u>KVFELGLVAG</u>	TDGF1	质膜
12	<u>MPAWGALFLL WATAEA</u>	(GP)IX	质膜
13	<u>RDYR</u>	VPAC2	质膜
14	<u>KMALRVALNN KQSGQITVKT</u> <u>SSSDHLSLAI AGLVPIALSI YQKFKPGVSP</u> <u>SYSIY</u>	Toc159	质膜
15	<u>MGSKIVQVFL MLALFATSAL A</u>	经典阿拉伯半乳聚糖蛋白质 4	质膜
16	<u>MNSKAMQALI FLGFLATSCL A</u>	经典阿拉伯半乳聚糖蛋白质 2	质膜
17	<u>MGAAASIQTT VN</u>	L1R	质膜

[0926]

SEQ ID NO:	信号序列	天然相关蛋白质	相关蛋白质引导的位置
	<u>SVM</u>	GTP 结合蛋白质 Rheb	质膜
18	<u>FALLGTHGAS G</u>	CD147	质膜
19	<u>RRRTFLK</u>	PlcH	质膜
20	<u>MGGKWSKSSV</u>	Nef	质膜
21	<u>DDPERE</u>	Nef	质膜
22	<u>EEANTGENNS LLHPMS</u>	HIV-1 NA7	质膜
23	<u>SRRGLV</u>	DmsA	质膜
24	<u>SRRRFL</u>	TorA/ TorA-MalE	质膜
25	<u>SRRQFI</u>	SufI	质膜 \ 周质
26	<u>QRRDFL</u>	YacK	质膜 \ 周质
27	<u>MNKIYSIKYS AATGGLIAVS ELAKKVICKT NRKISAALLS LAVISYTNII YA</u>	Pet (丝氨酸蛋白酶 pet 自转运蛋白)	质膜
28	<u>MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNII SIWVSHSIQT</u>	甲型流感病毒神经氨酸酶	质膜
29	<u>LRCLACSCFR TPVWPR</u>	prRDH	质膜
30	<u>MGCGCSSHPE</u>	Lck	质膜
31	<u>MPFVNKQFN</u>	BoNT/ A-LC	质膜
32	<u>DEQNAKNAAQ DRNSNKSSKG FFSKLGCC</u>	Yck2p	质膜
33	<u>MLCCMRRTKQ</u>	GAP-43	质膜
34	<u>VTNGSTYILV PLSH</u>	FSHR	质膜
35	<u>AETENFV</u>	M3 mAChR	质膜
36	<u>RARHRRNVDR VSIGSYRT</u>	pIgR	质膜
37	<u>YEDQ</u>	RhBG	质膜

SEQ ID NO:	信号序列	天然相关蛋白质	相关蛋白质引导的位置
[0927] 38	<u>LLVTSLLLCELPHPAFL IP</u>	GM-CSF 受体 (GM_CSFR)	质膜

[0928] 膜蛋白有效载荷剂

[0929] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是天然存在于细胞膜表面(例如质膜表面)上的蛋白质(或编码其的核酸)。

[0930] 示例性的膜蛋白(和/或编码其的核酸)可以在例如美国专利公开号2016/0289674中找到,其内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂(和/或编码其的核酸)具有如美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:8144-16131中的任一个所示的序列或其功能片段。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是美国专利公开号2016/0289674的SEQ ID NO:8144-16131中的任一个中所示的质膜蛋白(编码其的核酸),或质膜蛋白的其片段、变体或其同源物的质膜蛋白(或编码其的核酸)。

[0931] 在一些实施方案中,与本公开相关的膜蛋白是治疗性膜蛋白。在一些实施方案中,与本公开相关的膜蛋白是或包含细胞表面受体、膜转运蛋白(例如,主动或被动转运蛋白,例如离子通道蛋白,成孔蛋白[例如毒素蛋白],膜酶和/或细胞粘附蛋白)。

[0932] 在一些实施方案中,膜蛋白是单跨膜蛋白。在一些实施方案中,单跨膜蛋白可以呈现具有细胞质N端和外质C端(N_{cyt}/C_{exo})或具有相反方向(N_{exo}/C_{cyt})的最终拓扑。

[0933] 在一些实施方案中,膜蛋白是包含N端可裂解信号序列和终止转移序列(N_{exo}/C_{cyt})的I型膜蛋白。在一些实施方案中,信号在C端。在一些实施方案中,N端可裂解信号序列将新生肽靶向ER。在一些实施方案中,N端可裂解的信号序列包含通常为7-15个主要为非极性残基的疏水片段。在一些实施方案中,I型膜蛋白包含终止转移序列,其终止多肽的进一步易位并充当跨膜锚。在一些实施方案中,终止转移序列包含约20个疏水残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,I型膜蛋白的N端是细胞外的,而C端是细胞质的。在一些实施方案中,I型膜蛋白可以是糖蛋白或LDL受体。

[0934] 在一些实施方案中,膜蛋白是包含信号锚序列(N_{cyt}/C_{exo})的II型膜蛋白。在一些实施例中,信号在C端。在一些实施方案中,信号锚序列负责II型膜蛋白的插入和锚定。在一些实施方案中,信号锚序列包含约18-25个主要非极性残基。在一些实施方案中,信号锚序列缺乏信号肽酶切割位点。在一些实施方案中,信号锚序列可以位于多肽链内部。在一些实施方案中,信号锚序列诱导蛋白质的C端跨细胞膜移位。在一些实施方案中,II型膜蛋白的C端是细胞外的,而N端是细胞质的。在一些实施方案中,II型膜蛋白可以是转铁蛋白受体或半乳糖基转移酶受体。

[0935] 在一些实施方案中,膜蛋白是包含反向信号锚序列(N_{exo}/C_{cyt})的III型膜蛋白。在一些实施方案中,信号在N端。在一些实施方案中,反向信号锚序列负责III型膜蛋白的插入和锚定。在一些实施方案中,反向信号锚序列包含约18-25个主要非极性残基。在一些实施方案中,信号锚序列缺乏信号肽酶切割位点。在一些实施方案中,信号锚序列可以位于多肽链内部。在一些实施方案中,信号锚序列诱导蛋白质的N端末端跨细胞膜易位。在一些实施

方案中,III型膜蛋白的N端是细胞外的,而C端是细胞质的。在一些实施方案中,I型膜蛋白可以是突触结合蛋白(synaptogamin)、神经调节蛋白或细胞色素P-450。

[0936] 在一些实施方案中,I型、II型或III型膜蛋白经由包含SRP、SRP受体和Sec61易位子(translocon)的细胞途径插入细胞膜。

[0937] 在一些实施方案中,膜蛋白主要暴露于胞质溶胶并通过C端信号序列锚定至膜,但不与SRP相互作用。在一些实施方案中,蛋白质是细胞色素b5或SNARE蛋白质(例如,小突触泡蛋白(synaptobrevin))。

[0938] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含将有效载荷膜蛋白定位于细胞膜的信号序列。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是核酸,其中核酸编码将由核酸编码的有效载荷膜蛋白定位于细胞膜的信号序列。

[0939] (i) 整联蛋白膜蛋白有效载荷

[0940] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含整联蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表5的整联蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表5的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表5的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0941] 表5: 示例性整联蛋白

[0942]

UniProt ID	条目名称	基因名称
P05556	ITB1_HUMAN	ITGB1 FNRB MDF2 MSK12
P05106	ITB3_HUMAN	ITGB3 GP3A
P06756	ITAV_HUMAN	ITGAV MSK8 VNRA VTNR
P05107	ITB2_HUMAN	ITGB2 CD18 MFI7
P17301	ITA2_HUMAN	ITGA2 CD49B
P23229	ITA6_HUMAN	ITGA6
P26006	ITA3_HUMAN	ITGA3 MSK18
P16144	ITB4_HUMAN	ITGB4
P08514	ITA2B_HUMAN	ITGA2B GP2B ITGAB
P08648	ITA5_HUMAN	ITGA5 FNRA
P13612	ITA4_HUMAN	ITGA4 CD49D
P20701	ITAL_HUMAN	ITGAL CD11A
P11215	ITAM_HUMAN	ITGAM CD11B CR3A
P26010	ITB7_HUMAN	ITGB7
P20702	ITAX_HUMAN	ITGAX CD11C
P56199	ITA1_HUMAN	ITGA1
Q9UKX5	ITA11_HUMAN	ITGA11 MSTP018
P18084	ITB5_HUMAN	ITGB5
Q13683	ITA7_HUMAN	ITGA7 UNQ406/PRO768

P53708	ITA8_HUMAN	ITGA8
P18564	ITB6_HUMAN	ITGB6
P26012	ITB8_HUMAN	ITGB8
P38570	ITAE_HUMAN	ITGAE
075578	ITA10_HUMAN	ITGA10 UNQ468/PRO827
Q13349	ITAD_HUMAN	ITGAD
Q13797	ITA9_HUMAN	ITGA9

[0943] (ii) 离子通道蛋白质

[0944] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含离子通道蛋白质或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表6的离子通道蛋白质或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表6的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表6的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0945] 表6: 示例性离子通道蛋白质

[0946]

UniProt ID	条目名称	基因名称
P46098	5HT3A_HUMAN	HTR3A 5HT3R HTR3
O95264	5HT3B_HUMAN	HTR3B
Q8WXA8	5HT3C_HUMAN	HTR3C
Q70Z44	5HT3D_HUMAN	HTR3D
A5X5Y0	5HT3E_HUMAN	HTR3E
P02708	ACHA_HUMAN	CHRNA1 ACHRA CHNRA
P11230	ACHB_HUMAN	CHRNA1 ACHRB CHRNA
Q07001	ACHD_HUMAN	CHRNA1 ACHRD
Q04844	ACHE_HUMAN	CHRNE ACHRE
P07510	ACHG_HUMAN	CHRNA1 ACHRG
P78348	ASIC1_HUMAN	ASIC1 ACCN2 BNAC2
Q16515	ASIC2_HUMAN	ASIC2 ACCN1 BNAC1 MDEG
Q9UHC3	ASIC3_HUMAN	ASIC3 ACCN3 SLNAC1 TNAC1
Q96FT7	ASIC4_HUMAN	ASIC4 ACCN4
Q9NY37	ASIC5_HUMAN	ASIC5 ACCN5 HINAC
P37088	SCNNA_HUMAN	SCNN1A SCNN1
P51168	SCNNB_HUMAN	SCNN1B
P51172	SCNND_HUMAN	SCNN1D DNACH
P51170	SCNNG_HUMAN	SCNN1G
P48048	KCNJ1_HUMAN	KCNJ1 ROMK1
P78508	KCJ10_HUMAN	KCNJ10
Q14654	KCJ11_HUMAN	KCNJ11
Q14500	KCJ12_HUMAN	KCNJ12 IRK2 KCNJN1
Q9UNX9	KCJ14_HUMAN	KCNJ14 IRK4
Q99712	KCJ15_HUMAN	KCNJ15 KCNJ14
Q15842	KCNJ8_HUMAN	KCNJ8
Q9UGQ2	FLOWR_HUMAN	CACFD1 C9orf7 PSEC0107 PSEC0248 UNQ3071/PRO9903
Q12791	KCMA1_HUMAN	KCNMA1 KCNMA SLO
Q8NEC5	CTSR1_HUMAN	CATSPER1
Q96P56	CTSR2_HUMAN	CATSPER2
Q86XQ3	CTSR3_HUMAN	CATSPER3
Q7RTX7	CTSR4_HUMAN	CATSPER4
P29973	CNGA1_HUMAN	CNGA1 CNCG CNCG1
Q96S66	CLCC1_HUMAN	CLCC1 KIAA0761 MCLC
P35523	CLCN1_HUMAN	CLCN1 CLC1
P51788	CLCN2_HUMAN	CLCN2
P51800	CLCKA_HUMAN	CLCNKA

[0947]

UniProt ID	条目名称	基因名称
P51801	CLCKB_HUMAN	CLCKB
O00299	CLIC1_HUMAN	CLIC1 G6 NCC27
O15247	CLIC2_HUMAN	CLIC2
O95833	CLIC3_HUMAN	CLIC3
Q9Y696	CLIC4_HUMAN	CLIC4
Q9NZA1	CLIC5_HUMAN	CLIC5
Q96NY7	CLIC6_HUMAN	CLIC6 CLIC1L
P51797	CLCN6_HUMAN	CLCN6 KIAA0046
Q494W8	CRFM7_HUMAN	CHRFAM7A
Q16281	CNGA3_HUMAN	CNGA3 CNCG3
Q8IV77	CNGA4_HUMAN	CNGA4
Q14028	CNGB1_HUMAN	CNGB1 CNCG2 CNCG3L CNCG4 RCNC2
Q9NQW8	CNGB3_HUMAN	CNGB3
Q16280	CNGA2_HUMAN	CNGA2 CNCA CNCA1 CNCG2
P48549	KCNJ3_HUMAN	KCNJ3 GIRK1
P48051	KCNJ6_HUMAN	KCNJ6 GIRK2 KATP2 KCNJ7
Q92806	KCNJ9_HUMAN	KCNJ9 GIRK3
P48544	KCNJ5_HUMAN	KCNJ5 GIRK4
P14867	GBRA1_HUMAN	GABRA1
P47869	GBRA2_HUMAN	GABRA2
P34903	GBRA3_HUMAN	GABRA3
P48169	GBRA4_HUMAN	GABRA4
P31644	GBRA5_HUMAN	GABRA5
Q16445	GBRA6_HUMAN	GABRA6
P18505	GBRB1_HUMAN	GABRB1
P47870	GBRB2_HUMAN	GABRB2
P28472	GBRB3_HUMAN	GABRB3
O14764	GBRD_HUMAN	GABRD
P78334	GBRE_HUMAN	GABRE
Q8N1C3	GBRG1_HUMAN	GABRG1
P18507	GBRG2_HUMAN	GABRG2
Q99928	GBRG3_HUMAN	GABRG3
O00591	GBRP_HUMAN	GABRP
P24046	GBRR1_HUMAN	GABRR1
P28476	GBRR2_HUMAN	GABRR2
A8MPY1	GBRR3_HUMAN	GABRR3
Q9UN88	GBRT_HUMAN	GABRQ
P42261	GRIA1_HUMAN	GRIA1 GLUH1 GLUR1
P42262	GRIA2_HUMAN	GRIA2 GLUR2
P42263	GRIA3_HUMAN	GRIA3 GLUR3 GLURC
P48058	GRIA4_HUMAN	GRIA4 GLUR4
Q9ULK0	GRID1_HUMAN	GRID1 KIAA1220
O43424	GRID2_HUMAN	GRID2 GLURD2
P39086	GRIK1_HUMAN	GRIK1 GLUR5
Q13002	GRIK2_HUMAN	GRIK2 GLUR6

[0948]

UniProt ID	条目名称	基因名称
Q13003	GRIK3_HUMAN	GRIK3 GLUR7
Q16099	GRIK4_HUMAN	GRIK4 GRIK
Q16478	GRIK5_HUMAN	GRIK5 GRIK2
Q05586	NMDZ1_HUMAN	GRIN1 NMDAR1
Q12879	NMDE1_HUMAN	GRIN2A NMDAR2A
Q13224	NMDE2_HUMAN	GRIN2B NMDAR2B
Q14957	NMDE3_HUMAN	GRIN2C NMDAR2C
O15399	NMDE4_HUMAN	GRIN2D GluN2D NMDAR2D
Q8TCU5	NMD3A_HUMAN	GRIN3A KIAA1973
O60391	NMD3B_HUMAN	GRIN3B
P23415	GLRA1_HUMAN	GLRA1
P23416	GLRA2_HUMAN	GLRA2
O75311	GLRA3_HUMAN	GLRA3
Q5JXX5	GLRA4_HUMAN	GLRA4
P48167	GLRB_HUMAN	GLRB
P51790	CLCN3_HUMAN	CLCN3
P51793	CLCN4_HUMAN	CLCN4
P51795	CLCN5_HUMAN	CLCN5 CLCK2
P51798	CLCN7_HUMAN	CLCN7
O15554	KCNN4_HUMAN	KCNN4 IK1 IKCA1 KCA4 SK4
O60928	KCJ13_HUMAN	KCNJ13
Q9NPI9	KCJ16_HUMAN	KCNJ16
B7U540	KCJ18_HUMAN	KCNJ18
P63252	KCNJ2_HUMAN	KCNJ2 IRK1
P48050	KCNJ4_HUMAN	KCNJ4 IRK3
Q9GZZ6	ACH10_HUMAN	CHRNA10 NACHRA10
Q15822	ACHA2_HUMAN	CHRNA2
P32297	ACHA3_HUMAN	CHRNA3 NACHRA3
P43681	ACHA4_HUMAN	CHRNA4 NACHRA4
P30532	ACHA5_HUMAN	CHRNA5 NACHRA5
Q15825	ACHA6_HUMAN	CHRNA6
P36544	ACHA7_HUMAN	CHRNA7 NACHRA7
Q9UGM1	ACHA9_HUMAN	CHRNA9 NACHRA9
P17787	ACHB2_HUMAN	CHRN2
Q05901	ACHB3_HUMAN	CHRN3
P30926	ACHB4_HUMAN	CHRN4
O00180	KCNK1_HUMAN	KCNK1 HOHO1 KCNO1 TWIK1
P57789	KCNKA_HUMAN	KCNK10 TREK2

[0949]

UniProt ID	条目名称	基因名称
Q9HB15	KCNKC_HUMAN	KCNK12
Q9HB14	KCNKD_HUMAN	KCNK13
Q9H427	KCNKF_HUMAN	KCNK15 TASK5
Q96T55	KCNKG_HUMAN	KCNK16 TALK1
Q96T54	KCNKH_HUMAN	KCNK17 TALK2 TASK4 UNQ5816/PRO19634
Q7Z418	KCNKI_HUMAN	KCNK18 TRESK TRIK
O95069	KCNK2_HUMAN	KCNK2 TREK TREK1
O14649	KCNK3_HUMAN	KCNK3 TASK TASK1
Q9NYG8	KCNK4_HUMAN	KCNK4 TRAAK
O95279	KCNK5_HUMAN	KCNK5 TASK2
Q9Y257	KCNK6_HUMAN	KCNK6 TOSS TWIK2
Q9Y2U2	KCNK7_HUMAN	KCNK7
Q9NPC2	KCNK9_HUMAN	KCNK9 TASK3
Q5JUK3	KCNT1_HUMAN	KCNT1 KIAA1422
Q6UVM3	KCNT2_HUMAN	KCNT2 SLICK
A8MYU2	KCNU1_HUMAN	KCNU1 KCNMA3 KCNMC1 SLO3
Q09470	KCNA1_HUMAN	KCNA1
Q16322	KCA10_HUMAN	KCNA10
P16389	KCNA2_HUMAN	KCNA2
P22001	KCNA3_HUMAN	KCNA3 HGK5
P22459	KCNA4_HUMAN	KCNA4 KCNA4L
P22460	KCNA5_HUMAN	KCNA5
P17658	KCNA6_HUMAN	KCNA6
Q96RP8	KCNA7_HUMAN	KCNA7
Q14721	KCNB1_HUMAN	KCNB1
Q92953	KCNB2_HUMAN	KCNB2
P48547	KCNC1_HUMAN	KCNC1
Q96PR1	KCNC2_HUMAN	KCNC2
Q14003	KCNC3_HUMAN	KCNC3
Q03721	KCNC4_HUMAN	KCNC4 C1orf30
Q9NSA2	KCND1_HUMAN	KCND1
Q9NZV8	KCND2_HUMAN	KCND2 KIAA1044
Q9UK17	KCND3_HUMAN	KCND3
P15382	KCNE1_HUMAN	KCNE1
A0A087WTH5	KCE1B_HUMAN	KCNE1B
Q9Y6J6	KCNE2_HUMAN	KCNE2
Q9Y6H6	KCNE3_HUMAN	KCNE3
Q8WWG9	KCNE4_HUMAN	KCNE4
Q9UJ90	KCNE5_HUMAN	KCNE5 AMMECR2 KCNE1L
Q9H3M0	KCNF1_HUMAN	KCNF1
Q9UIX4	KCNG1_HUMAN	KCNG1

[0950]

UniProt ID	条目名称	基因名称
Q9UJ96	KCNG2_HUMAN	KCNG2 KCNF2
Q8TAE7	KCNG3_HUMAN	KCNG3
Q8TDN1	KCNG4_HUMAN	KCNG4 KCNG3
O95259	KCNH1_HUMAN	KCNH1 EAG EAG1
Q12809	KCNH2_HUMAN	KCNH2 ERG ERG1 HERG
Q9ULD8	KCNH3_HUMAN	KCNH3 KIAA1282
Q9UQ05	KCNH4_HUMAN	KCNH4
Q8NCM2	KCNH5_HUMAN	KCNH5 EAG2
Q9H252	KCNH6_HUMAN	KCNH6 ERG2
Q9NS40	KCNH7_HUMAN	KCNH7 ERG3
Q96L42	KCNH8_HUMAN	KCNH8
P51787	KCNQ1_HUMAN	KCNQ1 KCNA8 KCNA9 KVLQT1
O43526	KCNQ2_HUMAN	KCNQ2
O43525	KCNQ3_HUMAN	KCNQ3
P56696	KCNQ4_HUMAN	KCNQ4
Q9NR82	KCNQ5_HUMAN	KCNQ5
Q96KK3	KCNS1_HUMAN	KCNS1
Q9ULS6	KCNS2_HUMAN	KCNS2 KIAA1144
Q9BQ31	KCNS3_HUMAN	KCNS3
Q6PIU1	KCNV1_HUMAN	KCNV1
Q8TDN2	KCNV2_HUMAN	KCNV2
O60741	HCN1_HUMAN	HCN1 BCNG1
Q9UL51	HCN2_HUMAN	HCN2 BCNG2
Q9P1Z3	HCN3_HUMAN	HCN3 KIAA1535
Q9Y3Q4	HCN4_HUMAN	HCN4
Q92952	KCNN1_HUMAN	KCNN1 SK
Q9H2S1	KCNN2_HUMAN	KCNN2
Q9UGI6	KCNN3_HUMAN	KCNN3 K3
P35498	SCN1A_HUMAN	SCN1A NAC1 SCN1
Q9Y5Y9	SCNAA_HUMAN	SCN10A
Q9UI33	SCNBA_HUMAN	SCN11A SCN12A SNS2
Q99250	SCN2A_HUMAN	SCN2A NAC2 SCN2A1 SCN2A2
Q9NY46	SCN3A_HUMAN	SCN3A KIAA1356 NAC3
P35499	SCN4A_HUMAN	SCN4A
Q14524	SCN5A_HUMAN	SCN5A
Q01118	SCN7A_HUMAN	SCN7A SCN6A
Q9UQD0	SCN8A_HUMAN	SCN8A MED
Q15858	SCN9A_HUMAN	SCN9A NENA
Q07699	SCN1B_HUMAN	SCN1B
O60939	SCN2B_HUMAN	SCN2B UNQ326/PRO386
Q9NY72	SCN3B_HUMAN	SCN3B KIAA1158
Q8IWT1	SCN4B_HUMAN	SCN4B
Q8IZF0	NALCN_HUMAN	NALCN VGCNL1
Q9ULQ1	TPC1_HUMAN	TPCN1 KIAA1169 TPC1

UniProt ID	条目名称	基因名称
Q8NHX9	TPC2_HUMAN	TPCN2 TPC2
P54289	CA2D1_HUMAN	CACNA2D1 CACNL2A CCHL2A MHS3
Q9NY47	CA2D2_HUMAN	CACNA2D2 KIAA0558
Q8IZS8	CA2D3_HUMAN	CACNA2D3
Q7Z3S7	CA2D4_HUMAN	CACNA2D4
Q13936	CAC1C_HUMAN	CACNA1C CACH2 CACN2 CACNL1A1 CCHL1A1
Q01668	CAC1D_HUMAN	CACNA1D CACH3 CACN4 CACNL1A2 CCHL1A2
O60840	CAC1F_HUMAN	CACNA1F CACNAF1
Q13698	CAC1S_HUMAN	CACNA1S CACH1 CACN1 CACNL1A3
Q02641	CACB1_HUMAN	CACNB1 CACNLB1
Q08289	CACB2_HUMAN	CACNB2 CACNLB2 MYSB
P54284	CACB3_HUMAN	CACNB3 CACNLB3
O00305	CACB4_HUMAN	CACNB4 CACNLB4
Q00975	CAC1B_HUMAN	CACNA1B CACH5 CACNL1A5
O00555	CAC1A_HUMAN	CACNA1A CACH4 CACN3 CACNL1A4
Q15878	CAC1E_HUMAN	CACNA1E CACH6 CACNL1A6
O43497	CAC1G_HUMAN	CACNA1G KIAA1123
O95180	CAC1H_HUMAN	CACNA1H
Q9P0X4	CAC1I_HUMAN	CACNA1I KIAA1120
Q96D96	HVCN1_HUMAN	HVCN1 VSOP UNQ578/PRO1140
Q14722	KCAB1_HUMAN	KCNAB1 KCNA1B
Q13303	KCAB2_HUMAN	KCNAB2 KCNA2B KCNK2
O43448	KCAB3_HUMAN	KCNAB3 KCNA3B
Q5VU97	CAHD1_HUMAN	CACHD1 KIAA1573 VWCD1
Q401N2	ZACN_HUMAN	ZACN L2 LGICZ LGICZ1 ZAC

[0951]

[0952] (iii) 孔形成蛋白

[0953] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含孔形成蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,孔形成蛋白可以是溶血素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表7的溶血素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,孔形成蛋白可以是大肠杆菌素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表8的大肠杆菌素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。

[0954] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表7的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表7的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0955] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表8的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表8的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0956] 表7: 示例性溶血素蛋白质

[0957]

UniProt ID	条目名称	基因名称
P19247	VVHA_VIBVU	vvhA VV2_0404
P09545	HLYA_VIBCH	hlyA VC_A0219
Q08677	HLY4_AERSA	ash4
P55870	HLY1_AERHH	ahh1 AHA_1512
Q4UK99	HLYC_RICFE	tlyC RF_1185
Q68W10	HLYC_RICTY	tlyC RT0725
005961	HLYC_RICPR	tlyC RP740
A8GTI4	HLYC_RICRS	tlyC A1G_06280
Q92GI2	HLYC_RICCN	tlyC RC1141
A8F2M1	HLYC_RICM5	tlyC RMA_1168
Q93RR6	HLYE_SALPA	hlyE clyA sheA SPA1306
Q9REB3	HLYE_EC057	hlyE clyA sheA Z1944 ECs1677
Q8Z727	HLYE_SALTI	hlyE clyA sheA STY1498 t1477
P77335	HLYE_ECOLI	hlyE clyA hpr sheA ycgD b1182 JW5181
P14711	HLYT_GRIHO	
A8GUH1	HLYC_RICB8	tlyC A1I_00305
A8EZU0	HLYC_RICCK	tlyC A1E_04760
A8GPR9	HLYC_RICAH	tlyC A1C_05795
Q1RGX2	HLYC_RICBR	tlyC RBE_1311
Q9RCT3	HLYEL_SHIFL	SF1171 S1259
Q8FI27	HLYEL_ECOL6	c1630
P28030	HLY_VIBMI	tdh
P28031	HLY1_GRIHO	tdh
P19249	HLY1_VIBPA	tdh1 tdh VPA1378
P19250	HLY2_VIBPA	tdh2 tdh trh VPA1314
P28029	HLY3_VIBPH	tdh3 tdh/I tdhX

[0958] 表8: 示例性大肠杆菌素蛋白质

[0959]

UniProt ID	条目名称	基因名称
------------	------	------

UniProt ID	条目名称	基因名称
Q47500	CE05_ECOLX	cfa
Q47125	CE10_ECOLX	cta
P04480	CEA_CITFR	caa
Q47108	CEA_ECOLX	caa
P02978	CEA1_ECOLX	cea
P21178	CEA1_SHISO	cea
P04419	CEA2_ECOLX	col ceaB
P00646	CEA3_ECOLX	ceaC
P18000	CEA5_ECOLX	col
P17999	CEA6_ECOLX	
Q47112	CEA7_ECOLX	colE7 cea
P09882	CEA8_ECOLX	col
P09883	CEA9_ECOLX	col cei
P05819	CEAB_ECOLX	cba
P00645	CEAC_ECOLX	ccl
P17998	CEAD_ECOLX	cda
Q47502	CEAK_ECOLX	cka
P08083	CEAN_ECOLX	cna
P06716	CEIA_ECOLX	cia
P04479	CEIB_ECOLX	cib
P22520	CVAB_ECOLX	cvaB
Q06583	PYS1_PSEAI	pys1
Q06584	PYS2_PSEAE	pys2 PA1150

[0961] (iv) Toll样受体

[0962] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含Toll样受体 (TLR) 或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表9的Toll样受体或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表9的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表9的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0963] 表9: 示例性toll样受体

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q86XR7	TCAM2_HUMAN	TICAM2
Q9BXR5	TLR10_HUMAN	TLR10
Q15399	TLR1_HUMAN	TLR1
O60603	TLR2_HUMAN	TLR2
O15455	TLR3_HUMAN	TLR3
O00206	TLR4_HUMAN	TLR4
O60602	TLR5_HUMAN	TLR5
Q9Y2C9	TLR6_HUMAN	TLR6
Q9NYK1	TLR7_HUMAN	TLR7
Q9NR97	TLR8_HUMAN	TLR8
Q9NR96	TLR9_HUMAN	TLR9

[0966] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含白介素受体或其功能片段、变体

或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表10的白介素受体或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表10的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表10的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0967] (v) 白介素受体有效载荷

[0968] 表10: 示例性白介素受体

[0969]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q5EG05	CAR16_HUMAN	CARD16
Q92851	CASPA_HUMAN	CASP10
P25024	CXCR1_HUMAN	CXCR1
P25025	CXCR2_HUMAN	CXCR2
P31785	IL2RG_HUMAN	IL2RG
Q01167	FOXK2_HUMAN	FOXK2
Q8IU57	INLR1_HUMAN	IFNLR1
Q8IU54	IFNL1_HUMAN	IFNL1
Q8IZJ0	IFNL2_HUMAN	IFNL2
Q8IZI9	IFNL3_HUMAN	IFNL3
Q12905	ILF2_HUMAN	ILF2
Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3
P01583	IL1A_HUMAN	IL1A
P01584	IL1B_HUMAN	IL1B
Q8WWZ1	IL1FA_HUMAN	IL1F10
Q9NPH3	IL1AP_HUMAN	IL1RAP
Q9NZN1	IRPL1_HUMAN	IL1RAPL1
P18510	IL1RA_HUMAN	IL1RN
P14778	IL1R1_HUMAN	IL1R1

[0970]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
P27930	IL1R2_HUMAN	IL1R2
P51617	IRAK1_HUMAN	IRAK1
Q5VVH5	IKBP1_HUMAN	IRAK1BP1
Q9Y616	IRAK3_HUMAN	IRAK3
Q9NWZ3	IRAK4_HUMAN	IRAK4
O43187	IRAK2_HUMAN	IRAK2
Q01638	ILRL1_HUMAN	IL1RL1
Q9HB29	ILRL2_HUMAN	IL1RL2
P22301	IL10_HUMAN	IL10
Q13651	I10R1_HUMAN	IL10RA
Q08334	I10R2_HUMAN	IL10RB
P20809	IL11_HUMAN	IL11
Q14626	I11RA_HUMAN	IL11RA
P42701	I12R1_HUMAN	IL12RB1
Q99665	I12R2_HUMAN	IL12RB2
P29459	IL12A_HUMAN	IL12A
P29460	IL12B_HUMAN	IL12B
P35225	IL13_HUMAN	IL13
P78552	I13R1_HUMAN	IL13RA1
Q14627	I13R2_HUMAN	IL13RA2
P40933	IL15_HUMAN	IL15
Q13261	I15RA_HUMAN	IL15RA
Q96F46	I17RA_HUMAN	IL17RA
Q9NRM6	I17RB_HUMAN	IL17RB
Q8NAC3	I17RC_HUMAN	IL17RC
Q8NFM7	I17RD_HUMAN	IL17RD
Q8NFR9	I17RE_HUMAN	IL17RE
Q16552	IL17_HUMAN	IL17A
Q9UHF5	IL17B_HUMAN	IL17B
Q9P0M4	IL17C_HUMAN	IL17C
Q8TAD2	IL17D_HUMAN	IL17D
Q96PD4	IL17F_HUMAN	IL17F
Q13478	IL18R_HUMAN	IL18R1
O95256	I18RA_HUMAN	IL18RAP
O95998	I18BP_HUMAN	IL18BP
P60568	IL2_HUMAN	IL2
P01589	IL2RA_HUMAN	IL2RA
P14784	IL2RB_HUMAN	IL2RB
Q9NYY1	IL20_HUMAN	IL20
Q9UHF4	I20RA_HUMAN	IL20RA
Q6UXL0	I20RB_HUMAN	IL20RB
Q9HBE4	IL21_HUMAN	IL21
Q9HBE5	IL21R_HUMAN	IL21R
Q9GZX6	IL22_HUMAN	IL22
Q8N6P7	I22R1_HUMAN	IL22RA1

[0971]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q969J5	I22R2_HUMAN	IL22RA2
Q5VWK5	IL23R_HUMAN	IL23R
Q9NPF7	IL23A_HUMAN	IL23A
Q9H293	IL25_HUMAN	IL25
Q9NPH9	IL26_HUMAN	IL26
Q6UWB1	I27RA_HUMAN	IL27RA
Q8NEV9	IL27A_HUMAN	IL27
Q14213	IL27B_HUMAN	EBI3
P08700	IL3_HUMAN	IL3
P26951	IL3RA_HUMAN	IL3RA
Q6EBC2	IL31_HUMAN	IL31
Q8NII7	IL31R_HUMAN	IL31RA
O95760	IL33_HUMAN	IL33
Q6ZMJ4	IL34_HUMAN	IL34
Q9UHA7	IL36A_HUMAN	IL36A
Q9NZH7	IL36B_HUMAN	IL36B
Q9NZH8	IL36G_HUMAN	IL36G
Q9UBH0	I36RA_HUMAN	IL36RN
Q9NZH6	IL37_HUMAN	IL37
P05112	IL4_HUMAN	IL4
P24394	IL4RA_HUMAN	IL4R
P05113	IL5_HUMAN	IL5
Q01344	IL5RA_HUMAN	IL5RA
P05231	IL6_HUMAN	IL6
P08887	IL6RA_HUMAN	IL6R
P40189	IL6RB_HUMAN	IL6ST
P13232	IL7_HUMAN	IL7
P16871	IL7RA_HUMAN	IL7R
P10145	IL8_HUMAN	CXCL8
P15248	IL9_HUMAN	IL9
Q01113	IL9R_HUMAN	IL9R
Q16649	NFIL3_HUMAN	NFIL3
Q99650	OSMR_HUMAN	OSMR
Q8NDX1	PSD4_HUMAN	PSD4
Q14005	IL16_HUMAN	IL16
Q6ZVW7	I17EL_HUMAN	IL17REL
O43353	RIPK2_HUMAN	RIPK2
Q6IA17	SIGIR_HUMAN	SIGIRR
Q8IUC6	TCAM1_HUMAN	TICAM1
Q86XR7	TCAM2_HUMAN	TICAM2
Q9Y4K3	TRAF6_HUMAN	TRAF6
P58753	TIRAP_HUMAN	TIRAP
Q15399	TLR1_HUMAN	TLR1
O60603	TLR2_HUMAN	TLR2
O60602	TLR5_HUMAN	TLR5

	UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
[0972]	Q8TDR0	MIPT3_HUMAN	TRAF3IP1
	Q13445	TMED1_HUMAN	TMED1
	Q08881	ITK_HUMAN	ITK
	Q9NP60	IRPL2_HUMAN	IL1RAPL2

[0973] (vi) 细胞粘附蛋白有效载荷

[0974] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含细胞粘附蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表11的细胞粘附蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,细胞粘附蛋白可以是钙粘蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表12的钙粘蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,细胞粘附蛋白可以是选择素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表13的选择素或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,细胞粘附蛋白可以是粘蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表14的粘蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。

[0975] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表11的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表11的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0976] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表12的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表12的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0977] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表13的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表13的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0978] 在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表14的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表14的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0979] 表11: 示例性细胞间粘附分子蛋白质

	UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
[0980]	P05362	ICAM1_HUMAN	ICAM1

P13598	ICAM2_HUMAN	ICAM2
P32942	ICAM3_HUMAN	ICAM3
Q14773	ICAM4_HUMAN	ICAM4
Q9UMF0	ICAM5_HUMAN	ICAM5

[0981] 表12: 示例性钙粘蛋白

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
P07949	RET_HUMAN	RET
P12830	CADH1_HUMAN	CDH1
P55290	CAD13_HUMAN	CDH13
Q9H251	CAD23_HUMAN	CDH23
P19022	CADH2_HUMAN	CDH2
O60716	CTND1_HUMAN	CTNND1
P35221	CTNA1_HUMAN	CTNNA1
P22223	CADH3_HUMAN	CDH3
P33151	CADH5_HUMAN	CDH5
Q9NYQ6	CELR1_HUMAN	CELSR1
Q14126	DSG2_HUMAN	DSG2
Q9HBB8	CDHR5_HUMAN	CDHR5
Q96JQ0	PCD16_HUMAN	DCHS1
O94985	CSTN1_HUMAN	CLSTN1
Q02487	DSC2_HUMAN	DSC2
Q6V0I7	FAT4_HUMAN	FAT4
Q02413	DSG1_HUMAN	DSG1
Q14517	FAT1_HUMAN	FAT1
Q9BYE9	CDHR2_HUMAN	CDHR2
P55291	CAD15_HUMAN	CDH15

[0982]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
A7KAX9	RHG32_HUMAN	ARHGAP32
Q12864	CAD17_HUMAN	CDH17
P55287	CAD11_HUMAN	CDH11
Q9NYQ7	CELR3_HUMAN	CELSR3
Q14574	DSC3_HUMAN	DSC3
Q9NYQ8	FAT2_HUMAN	FAT2
P55283	CADH4_HUMAN	CDH4
P55285	CADH6_HUMAN	CDH6
P55286	CADH8_HUMAN	CDH8
Q9Y6N8	CAD10_HUMAN	CDH10
P55289	CAD12_HUMAN	CDH12
Q13634	CAD18_HUMAN	CDH18
Q9UJ99	CAD22_HUMAN	CDH22
O75309	CAD16_HUMAN	CDH16
Q9H159	CAD19_HUMAN	CDH19
Q9HBT6	CAD20_HUMAN	CDH20
Q8IXH8	CAD26_HUMAN	CDH26
Q9ULB5	CADH7_HUMAN	CDH7
Q9ULB4	CADH9_HUMAN	CDH9
Q6ZTQ4	CDHR3_HUMAN	CDHR3
Q9HCU4	CELR2_HUMAN	CELSR2
Q86UP0	CAD24_HUMAN	CDH24
Q96JP9	CDHR1_HUMAN	CDHR1
A6H8M9	CDHR4_HUMAN	CDHR4
Q9UI47	CTNA3_HUMAN	CTNNA3
A4D0V7	CPED1_HUMAN	CPED1
Q08554	DSC1_HUMAN	DSC1
P32926	DSG3_HUMAN	DSG3
Q86SJ6	DSG4_HUMAN	DSG4
Q8TDW7	FAT3_HUMAN	FAT3
Q9NPG4	PCD12_HUMAN	PCDH12
O60330	PCDGC_HUMAN	PCDHGA12
Q6V1P9	PCD23_HUMAN	DCHS2
Q9UN71	PCDGG_HUMAN	PCDHGB4
Q08174	PCDH1_HUMAN	PCDH1

[0983]

[0984] 表13: 示例性选择素蛋白质

[0985]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
P16109	LYAM3_HUMAN	SELP
P16581	LYAM2_HUMAN	SELE
Q14242	SELPL_HUMAN	SELPLG
P14151	LYAM1_HUMAN	SELL

[0986] 表14: 示例性粘蛋白

[0987]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
P15941	MUC1_HUMAN	MUC1

[0988]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q99102	MUC4_HUMAN	MUC4
Q8TDQ0	HAVR2_HUMAN	HAVCR2
Q9HC84	MUC5B_HUMAN	MUC5B
P98088	MUC5A_HUMAN	MUC5AC
Q685J3	MUC17_HUMAN	MUC17
Q9UJU6	DBNL_HUMAN	DBNL
Q9HBB8	CDHR5_HUMAN	CDHR5
Q8WXI7	MUC16_HUMAN	MUC16
Q9UHX3	AGRE2_HUMAN	ADGRE2
Q02817	MUC2_HUMAN	MUC2
Q8TAX7	MUC7_HUMAN	MUC7
Q96D42	HAVR1_HUMAN	HAVCR1
Q9H3R2	MUC13_HUMAN	MUC13
Q8N307	MUC20_HUMAN	MUC20
Q6W4X9	MUC6_HUMAN	MUC6
Q02505	MUC3A_HUMAN	MUC3A
Q7L513	FCRLA_HUMAN	FCRLA
Q14246	AGRE1_HUMAN	ADGRE1
Q86WA6	BPHL_HUMAN	BPHL
Q7Z5P9	MUC19_HUMAN	MUC19
Q9UKN1	MUC12_HUMAN	MUC12
Q5SSG8	MUC21_HUMAN	MUC21
Q9BY15	AGRE3_HUMAN	ADGRE3
Q6UWI2	PARM1_HUMAN	PARM1
O95395	GCNT3_HUMAN	GCNT3
Q86SQ3	AGRE4_HUMAN	ADGRE4P
Q6BAA4	FCRLB_HUMAN	FCRLB
Q96DR8	MUCL1_HUMAN	MUCL1
E2RYF6	MUC22_HUMAN	MUC22
Q9H195	MUC3B_HUMAN	MUC3B
Q9ULC0	MUCEN_HUMAN	EMCN
Q8N387	MUC15_HUMAN	MUC15
Q12889	OVGP1_HUMAN	OVGP1
E2RYF7	PBMU2_HUMAN	HCG22
Q96H15	TIMD4_HUMAN	TIMD4

[0989] (vii) 转运蛋白有效载荷

[0990] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含转运蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含选自表15的转运蛋白或其功能片段、变体或同源物,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表15的蛋白质的多肽序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的蛋白质,或编码其的核酸。在实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含具有与表15的基因的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%相同的序列的核酸。

[0991] 表15:示例性转运蛋白

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q9NRA8	4ET_HUMAN	EIF4ENIF1
Q9NS82	AAA1_HUMAN	SLC7A10
Q15758	AAAT_HUMAN	SLC1A5
O95477	ABCA1_HUMAN	ABCA1
Q9BZC7	ABCA2_HUMAN	ABCA2
Q99758	ABCA3_HUMAN	ABCA3
P78363	ABCA4_HUMAN	ABCA4
Q8IZY2	ABCA7_HUMAN	ABCA7
Q86UK0	ABCAC_HUMAN	ABCA12
Q9NP58	ABCB6_HUMAN	ABCB6
O75027	ABCB7_HUMAN	ABCB7
Q9NP78	ABCB9_HUMAN	ABCB9
Q9NRK6	ABCBA_HUMAN	ABCB10
Q9UG63	ABCF2_HUMAN	ABCF2
P45844	ABCG1_HUMAN	ABCG1
Q9UNQ0	ABCG2_HUMAN	ABCG2
O00400	ACATN_HUMAN	SLC33A1
P82251	BAT1_HUMAN	SLC7A9
[0992] Q8N1D0	BWR1B_HUMAN	SLC22A18AS
Q12864	CAD17_HUMAN	CDH17
Q53S99	CB083_HUMAN	C2orf83
P51790	CLCN3_HUMAN	CLCN3
P51793	CLCN4_HUMAN	CLCN4
P51795	CLCN5_HUMAN	CLCN5
P51798	CLCN7_HUMAN	CLCN7
Q9NRU3	CNNM1_HUMAN	CNNM1
Q9H8M5	CNNM2_HUMAN	CNNM2
Q8NE01	CNNM3_HUMAN	CNNM3
Q6P4Q7	CNNM4_HUMAN	CNNM4
O15431	COPT1_HUMAN	SLC31A1
O15432	COPT2_HUMAN	SLC31A2
Q8WW15	CTL1_HUMAN	SLC44A1
Q8IWA5	CTL2_HUMAN	SLC44A2
Q8N4M1	CTL3_HUMAN	SLC44A3
Q53GD3	CTL4_HUMAN	SLC44A4
Q8NCS7	CTL5_HUMAN	SLC44A5
P30825	CTR1_HUMAN	SLC7A1
P52569	CTR2_HUMAN	SLC7A2

[0993]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q8WY07	CTR3_HUMAN	SLC7A3
O43246	CTR4_HUMAN	SLC7A4
P43003	EAA1_HUMAN	SLC1A3
P43004	EAA2_HUMAN	SLC1A2
P43005	EAA3_HUMAN	SLC1A1
P48664	EAA4_HUMAN	SLC1A6
O00341	EAA5_HUMAN	SLC1A7
P55899	FCGRN_HUMAN	FCGRT
Q9UPI3	FLVC2_HUMAN	FLVCR2
Q96A29	FUCT1_HUMAN	SLC35C1
O43826	G6PT1_HUMAN	SLC37A4
O95528	GTR10_HUMAN	SLC2A10
Q9BYW1	GTR11_HUMAN	SLC2A11
Q8TD20	GTR12_HUMAN	SLC2A12
Q8TDB8	GTR14_HUMAN	SLC2A14
P11166	GTR1_HUMAN	SLC2A1
P11168	GTR2_HUMAN	SLC2A2
P11169	GTR3_HUMAN	SLC2A3
P14672	GTR4_HUMAN	SLC2A4
P22732	GTR5_HUMAN	SLC2A5
Q9UGQ3	GTR6_HUMAN	SLC2A6
Q6PXP3	GTR7_HUMAN	SLC2A7
Q9NY64	GTR8_HUMAN	SLC2A8
Q9NRM0	GTR9_HUMAN	SLC2A9
Q9HCP6	HHATL_HUMAN	HHATL
Q6PIK1	HRG1_HUMAN	SLC48A1
Q12756	KIF1A_HUMAN	KIF1A
Q6ZP29	LAAT1_HUMAN	PQLC2
Q15012	LAP4A_HUMAN	LAPTM4A
Q01650	LAT1_HUMAN	SLC7A5
Q9GIP4	LAT1L_HUMAN	SLC7A5P2
Q8MH63	LAT1N_HUMAN	SLC7A5P1
Q9UHI5	LAT2_HUMAN	SLC7A8
O75387	LAT3_HUMAN	SLC43A1
Q8N370	LAT4_HUMAN	SLC43A2
Q9NUN5	LMBD1_HUMAN	LMBRD1
Q9H0U3	MAGT1_HUMAN	MAGT1
Q8N8R3	MCATL_HUMAN	SLC25A29
Q96MC6	MF14A_HUMAN	MFSD14A
Q9NYZ2	MFRN1_HUMAN	SLC25A37
Q96A46	MFRN2_HUMAN	SLC25A28
Q14728	MFS10_HUMAN	MFSD10
Q5TF39	MFS4B_HUMAN	MFSD4B
Q6N075	MFSD5_HUMAN	MFSD5
Q9H2D1	MFTC_HUMAN	SLC25A32

[0994]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q8N4V1	MMGT1_HUMAN	MMGT1
Q8TF71	MOT10_HUMAN	SLC16A10
Q8NCK7	MOT11_HUMAN	SLC16A11
Q6ZSM3	MOT12_HUMAN	SLC16A12
Q7RTY0	MOT13_HUMAN	SLC16A13
Q7RTX9	MOT14_HUMAN	SLC16A14
P53985	MOT1_HUMAN	SLC16A1
O60669	MOT2_HUMAN	SLC16A7
O95907	MOT3_HUMAN	SLC16A8
O15427	MOT4_HUMAN	SLC16A3
O15374	MOT5_HUMAN	SLC16A4
O15375	MOT6_HUMAN	SLC16A5
O15403	MOT7_HUMAN	SLC16A6
P36021	MOT8_HUMAN	SLC16A2
Q7RTY1	MOT9_HUMAN	SLC16A9
P33527	MRP1_HUMAN	ABCC1
Q92887	MRP2_HUMAN	ABCC2
O15438	MRP3_HUMAN	ABCC3
O15439	MRP4_HUMAN	ABCC4
O15440	MRP5_HUMAN	ABCC5
O95255	MRP6_HUMAN	ABCC6
Q9HD23	MRS2_HUMAN	MRS2
Q7RTP0	NIPA1_HUMAN	NIPA1
Q8N8Q9	NIPA2_HUMAN	NIPA2
Q6NVV3	NIPA3_HUMAN	NIPAL1
Q0D2K0	NIPA4_HUMAN	NIPAL4
P49281	NRAM2_HUMAN	SLC11A2
Q12908	NTCP2_HUMAN	SLC10A2
Q9Y619	ORNT1_HUMAN	SLC25A15
Q9BXI2	ORNT2_HUMAN	SLC25A2
Q86UW1	OSTA_HUMAN	SLC51A
Q86UW2	OSTB_HUMAN	SLC51B
Q04671	P_HUMAN	OCA2
Q96NT5	PCFT_HUMAN	SLC46A1
O75915	PRAF3_HUMAN	ARL6IP5
Q02094	RHAG_HUMAN	RHAG
Q9H310	RHBG_HUMAN	RHBG
Q9UBD6	RHCG_HUMAN	RHCG
Q92681	RSCA1_HUMAN	RSC1A1
Q9BXP2	S12A9_HUMAN	SLC12A9
Q8WWT9	S13A3_HUMAN	SLC13A3
Q86YT5	S13A5_HUMAN	SLC13A5
P46059	S15A1_HUMAN	SLC15A1
Q16348	S15A2_HUMAN	SLC15A2
Q8IY34	S15A3_HUMAN	SLC15A3

[0995]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q8N697	S15A4_HUMAN	SLC15A4
Q6NT16	S18B1_HUMAN	SLC18B1
P41440	S19A1_HUMAN	SLC19A1
O60779	S19A2_HUMAN	SLC19A2
Q9BZV2	S19A3_HUMAN	SLC19A3
Q8WUM9	S20A1_HUMAN	SLC20A1
Q08357	S20A2_HUMAN	SLC20A2
O15245	S22A1_HUMAN	SLC22A1
O15244	S22A2_HUMAN	SLC22A2
O75751	S22A3_HUMAN	SLC22A3
Q9H015	S22A4_HUMAN	SLC22A4
O76082	S22A5_HUMAN	SLC22A5
Q4U2R8	S22A6_HUMAN	SLC22A6
Q9Y694	S22A7_HUMAN	SLC22A7
Q8TCC7	S22A8_HUMAN	SLC22A8
Q8IVM8	S22A9_HUMAN	SLC22A9
Q63ZE4	S22AA_HUMAN	SLC22A10
Q9NSA0	S22AB_HUMAN	SLC22A11
Q96S37	S22AC_HUMAN	SLC22A12
Q9Y226	S22AD_HUMAN	SLC22A13
Q9Y267	S22AE_HUMAN	SLC22A14
Q8IZD6	S22AF_HUMAN	SLC22A15
Q86VW1	S22AG_HUMAN	SLC22A16
Q8WUG5	S22AH_HUMAN	SLC22A17
Q96BI1	S22AI_HUMAN	SLC22A18
A6NK97	S22AK_HUMAN	SLC22A20
Q6T423	S22AP_HUMAN	SLC22A25
Q9UHI7	S23A1_HUMAN	SLC23A1
Q9UGH3	S23A2_HUMAN	SLC23A2
Q6PIS1	S23A3_HUMAN	SLC23A3
Q86VD7	S2542_HUMAN	SLC25A42
Q86WA9	S2611_HUMAN	SLC26A11
Q9H2B4	S26A1_HUMAN	SLC26A1
P50443	S26A2_HUMAN	SLC26A2
O43511	S26A4_HUMAN	SLC26A4
Q9BXS9	S26A6_HUMAN	SLC26A6
Q8TE54	S26A7_HUMAN	SLC26A7
Q96RN1	S26A8_HUMAN	SLC26A8
Q7LBE3	S26A9_HUMAN	SLC26A9
O00337	S28A1_HUMAN	SLC28A1
O43868	S28A2_HUMAN	SLC28A2
Q99808	S29A1_HUMAN	SLC29A1
Q14542	S29A2_HUMAN	SLC29A2
Q9BZD2	S29A3_HUMAN	SLC29A3
Q7RTT9	S29A4_HUMAN	SLC29A4

[0996]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
P78382	S35A1_HUMAN	SLC35A1
P78381	S35A2_HUMAN	SLC35A2
Q9Y2D2	S35A3_HUMAN	SLC35A3
Q96G79	S35A4_HUMAN	SLC35A4
Q9BS91	S35A5_HUMAN	SLC35A5
P78383	S35B1_HUMAN	SLC35B1
Q8TB61	S35B2_HUMAN	SLC35B2
Q9H1N7	S35B3_HUMAN	SLC35B3
Q969S0	S35B4_HUMAN	SLC35B4
Q9NTN3	S35D1_HUMAN	SLC35D1
Q76EJ3	S35D2_HUMAN	SLC35D2
Q8IY50	S35F3_HUMAN	SLC35F3
Q7Z2H8	S36A1_HUMAN	SLC36A1
Q495M3	S36A2_HUMAN	SLC36A2
Q495N2	S36A3_HUMAN	SLC36A3
Q6YBV0	S36A4_HUMAN	SLC36A4
Q9H2H9	S38A1_HUMAN	SLC38A1
Q96QD8	S38A2_HUMAN	SLC38A2
Q99624	S38A3_HUMAN	SLC38A3
Q969I6	S38A4_HUMAN	SLC38A4
Q8WUX1	S38A5_HUMAN	SLC38A5
Q8IZM9	S38A6_HUMAN	SLC38A6
Q9NVC3	S38A7_HUMAN	SLC38A7
A6NNN8	S38A8_HUMAN	SLC38A8
Q8NBW4	S38A9_HUMAN	SLC38A9
Q9HBR0	S38AA_HUMAN	SLC38A10
Q08AI6	S38AB_HUMAN	SLC38A11
Q9NY26	S39A1_HUMAN	SLC39A1
Q9NP94	S39A2_HUMAN	SLC39A2
Q9BRY0	S39A3_HUMAN	SLC39A3
Q6P5W5	S39A4_HUMAN	SLC39A4
Q6ZMH5	S39A5_HUMAN	SLC39A5
Q13433	S39A6_HUMAN	SLC39A6
Q92504	S39A7_HUMAN	SLC39A7
Q9C0K1	S39A8_HUMAN	SLC39A8
Q9NUM3	S39A9_HUMAN	SLC39A9
Q9ULF5	S39AA_HUMAN	SLC39A10
Q8N1S5	S39AB_HUMAN	SLC39A11
Q504Y0	S39AC_HUMAN	SLC39A12
Q96H72	S39AD_HUMAN	SLC39A13
Q15043	S39AE_HUMAN	SLC39A14
Q9NP59	S40A1_HUMAN	SLC40A1
Q9Y2W3	S45A1_HUMAN	SLC45A1
Q9UMX9	S45A2_HUMAN	SLC45A2
Q8NBS3	S4A11_HUMAN	SLC4A11

[0997]

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q9Y6M7	S4A7_HUMAN	SLC4A7
Q9NWF4	S52A1_HUMAN	SLC52A1
Q9HAB3	S52A2_HUMAN	SLC52A2
Q9NQ40	S52A3_HUMAN	SLC52A3
P48066	S6A11_HUMAN	SLC6A11
P48065	S6A12_HUMAN	SLC6A12
Q9NSD5	S6A13_HUMAN	SLC6A13
Q9UN76	S6A14_HUMAN	SLC6A14
Q9H2J7	S6A15_HUMAN	SLC6A15
Q9GZN6	S6A16_HUMAN	SLC6A16
Q9H1V8	S6A17_HUMAN	SLC6A17
Q96N87	S6A18_HUMAN	SLC6A18
Q695T7	S6A19_HUMAN	SLC6A19
Q9NP91	S6A20_HUMAN	SLC6A20
Q8TCU3	S7A13_HUMAN	SLC7A13
Q8TBB6	S7A14_HUMAN	SLC7A14
Q70HW3	SAMC_HUMAN	SLC25A26
P43007	SATT_HUMAN	SLC1A4
P53794	SC5A3_HUMAN	SLC5A3
Q9Y289	SC5A6_HUMAN	SLC5A6
Q9GZV3	SC5A7_HUMAN	SLC5A7
Q8N695	SC5A8_HUMAN	SLC5A8
Q8WWX8	SC5AB_HUMAN	SLC5A11
Q1EHB4	SC5AC_HUMAN	SLC5A12
P30531	SC6A1_HUMAN	SLC6A1
P23975	SC6A2_HUMAN	SLC6A2
Q01959	SC6A3_HUMAN	SLC6A3
P31645	SC6A4_HUMAN	SLC6A4
Q9Y345	SC6A5_HUMAN	SLC6A5
P31641	SC6A6_HUMAN	SLC6A6
Q99884	SC6A7_HUMAN	SLC6A7
P48029	SC6A8_HUMAN	SLC6A8
P48067	SC6A9_HUMAN	SLC6A9
P46721	SO1A2_HUMAN	SLCO1A2
Q9Y6L6	SO1B1_HUMAN	SLCO1B1
Q9NPD5	SO1B3_HUMAN	SLCO1B3
G3V0H7	SO1B7_HUMAN	SLCO1B7
Q9NYB5	SO1C1_HUMAN	SLCO1C1
Q92959	SO2A1_HUMAN	SLCO2A1
O94956	SO2B1_HUMAN	SLCO2B1
Q9UIG8	SO3A1_HUMAN	SLCO3A1
Q96BD0	SO4A1_HUMAN	SLCO4A1
Q6ZQN7	SO4C1_HUMAN	SLCO4C1
Q9H2Y9	SO5A1_HUMAN	SLCO5A1
Q86UG4	SO6A1_HUMAN	SLCO6A1

UniProt ID	条目名称	基因名称(主要)
Q3KNW5	SOAT_HUMAN	SLC10A6
O95149	SPN1_HUMAN	SNUPN
Q8N434	SVOPL_HUMAN	SVOPL
Q9BRV3	SWET1_HUMAN	SLC50A1
Q03518	TAP1_HUMAN	TAP1
Q03519	TAP2_HUMAN	TAP2
Q13454	TUSC3_HUMAN	TUSC3
Q13336	UT1_HUMAN	SLC14A1
Q15849	UT2_HUMAN	SLC14A2
Q16572	VACHT_HUMAN	SLC18A3
Q9P2U7	VGLU1_HUMAN	SLC17A7
Q9P2U8	VGLU2_HUMAN	SLC17A6
Q8NDX2	VGLU3_HUMAN	SLC17A8
Q9H598	VIAAT_HUMAN	SLC32A1
P54219	VMAT1_HUMAN	SLC18A1
Q05940	VMAT2_HUMAN	SLC18A2
Q9UPY5	XCT_HUMAN	SLC7A11
Q9UM01	YLAT1_HUMAN	SLC7A7
Q92536	YLAT2_HUMAN	SLC7A6
Q6XR72	ZNT10_HUMAN	SLC30A10
Q9Y6M5	ZNT1_HUMAN	SLC30A1
Q9BRI3	ZNT2_HUMAN	SLC30A2
Q99726	ZNT3_HUMAN	SLC30A3
O14863	ZNT4_HUMAN	SLC30A4
Q8TAD4	ZNT5_HUMAN	SLC30A5
Q6NXT4	ZNT6_HUMAN	SLC30A6
Q8NEW0	ZNT7_HUMAN	SLC30A7
Q8IWU4	ZNT8_HUMAN	SLC30A8
Q6PML9	ZNT9_HUMAN	SLC30A9

[0998]

[0999] (viii) 嵌合抗原受体有效载荷

[1000] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含CAR,例如第一代CAR或编码第一代CAR的核酸。在一些实施方案中,第一代CAR包含抗原结合域、跨膜域和信号传导域。在一些实施方案中,信号传导域在T细胞激活期间介导下游信号传导。

[1001] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含第二代CAR或编码第二代CAR的核酸。在一些实施方案中,第二代CAR包含抗原结合域、跨膜域和两个信号传导域。在一些实施方案中,信号传导域在T细胞激活期间介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导域是共刺激域。在一些实施方案中,共刺激域在T激活期间增强细胞因子的产生、CAR T细胞的增殖和/或CAR T细胞的持久性。

[1002] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含第三代CAR或编码第三代CAR的核酸。在一些实施方案中,第三代CAR包含抗原结合域、跨膜域和至少三个信号传导域。在一些实施方案中,信号传导域在T细胞激活期间介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导域是共刺激域。在一些实施方案中,共刺激域在T激活期间增强细胞因子的产生、CAR T细胞的增殖和/或CAR T细胞的持久性。在一些实施方案中,第三代CAR包含至少两个共刺激域。在一些实施方案中,至少两个共刺激域不相同。

[1003] 在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂是或包含第四代CAR或编码第四代CAR的核酸。在一些实施方案中,第四代CAR包含抗原结合域、跨膜域和至少两个、三个或四个信号传导域。在一些实施方案中,信号传导域在T细胞激活期间介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导域是共刺激域。在一些实施方案中,共刺激域在T激活期间增强细胞因子的产生、CAR T细胞的增殖和/或CAR T细胞的持久性。

[1004] 在一些实施方案中,第一代、第二代、第三代或第四代CAR进一步包含域,该域在CAR的成功信号传导后诱导细胞因子基因的表达。在一些实施方案中,细胞因子基因对于包含CAR的靶细胞是内源的或外源的,所述靶细胞包含域,所述域在CAR的成功信号传导后诱导细胞因子基因的表达。在一些实施方案中,细胞因子基因编码促炎性细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子基因编码IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF或IFN-gamma或其功能片段。在一些实施方案中,在CAR的成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的域是或包含转录因子或功能域或其片段。在一些实施方案中,在CAR的成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的域是或包含转录因子或功能域或其片段。在一些实施方案中,转录因子或其功能域或其片段是或包含活化的T细胞的核因子(NFAT)、NF- κ B或其功能域或其片段。参见例如Zhang.C.et al.,Engineering CAR-T cells.Biomarker Research.5:22(2017);WO 2016126608;Sha,H.et al.Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy.Bioscience Reports Jan 27,2017,37(1)。

[1005] (a) CAR抗原结合域

[1006] 在一些实施方案中,CAR抗原结合域是或包含抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,CAR抗原结合域是或包含scFv或Fab。在一些实施方案中,CAR抗原结合域包含以下的scFv或Fab片段:T-cell α 链抗体;T-cell β 链抗体;T-cell γ 链抗体;T-cell δ 链抗体;CCR7抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD80抗体;CD95抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD163抗体;F4/80抗体;IL-4Ra抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

[1007] 在一些实施方案中,抗原结合域与细胞的细胞表面抗原结合。在一些实施方案中,细胞表面抗原是一种细胞类型的特征。在一些实施方案中,细胞表面抗原是超过一种细胞类型的特征。

[1008] 在一些实施方案中,CAR抗原结合域结合T细胞的特征性细胞表面抗原。在一些实施方案中,T细胞的特征性抗原可以是T细胞的特征性细胞表面受体,膜转运蛋白(例如,主动或被动转运蛋白,如例如离子通道蛋白、孔形成蛋白等),跨膜受体,膜酶和/或细胞粘附蛋白。在一些实施方案中,T细胞的特征性抗原可以是G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。

[1009] 在一些实施方案中,T细胞特征性抗原可以是T细胞受体。在一些实施方案中,T细胞受体可以是AKT1;AKT2;AKT3;ATF2;BCL10;CALM1;CD3D(CD3 δ);CD3E(CD3 ϵ);CD3G(CD3 γ);CD4;CD8;CD28;CD45;CD80(B7-1);CD86(B7-2);CD247(CD3 ζ);CTLA4(CD152);ELK1;

ERK1 (MAPK3); ERK2; FOS; FYN; GRAP2 (GADS); GRB2; HLA-DRA; HLA-DRB1; HLA-DRB3; HLA-DRB4; HLA-DRB5; HRAS; IKKKA (CHUK); IKKKB; IKBKE; IKKBG (NEMO); IL2; ITPR1; ITK; JUN; KRAS2; LAT; LCK; MAP2K1 (MEK1); MAP2K2 (MEK2); MAP2K3 (MKK3); MAP2K4 (MKK4); MAP2K6 (MKK6); MAP2K7 (MKK7); MAP3K1 (MEKK1); MAP3K3; MAP3K4; MAP3K5; MAP3K8; MAP3K14 (NIK); MAPK8 (JNK1); MAPK9 (JNK2); MAPK10 (JNK3); MAPK11 (p38 β); MAPK12 (p38 γ); MAPK13 (p38 δ); MAPK14 (p38 α); NCK; NFAT1; NFAT2; NFKB1; NFKB2; NFKBIA; NRAS; PAK1; PAK2; PAK3; PAK4; PIK3C2B; PIK3C3 (VPS34); PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3R1; PKCA; PKCB; PKCM; PKCQ; PLCY1; PRF1 (穿孔素); PTEN; RAC1; RAF1; RELA; SDF1; SHP2; SLP76; SOS; SRC; TBK1; TCRA; TEC; TRAF6; VAV1; VAV2; 或ZAP70。

[1010] 在一些实施方案中, CAR抗原结合域结合癌症的特征性抗原。在一些实施方案中, 癌症的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、表皮生长因子受体 (EGFR) (包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3和ErbB4/HER4)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) (包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18和FGF21)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR) (包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF)、RET受体和Eph受体家族 (包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophin、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘氨醇-1-磷酸受体 (S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多跨越跨膜蛋白、T细胞受体基序; T细胞 α 链; T细胞 β 链; T细胞 γ 链; T细胞 δ 链; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD52; CD56; CD62L; CD68; CD80; CD95; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD163; F4/80; IL-4Ra; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 颗粒酶B; LFA-1; 转铁蛋白受体; NKp46、穿孔素、CD4+; Th1; Th2; Th17; Th40; Th22; Th9; Tfh、规范Treg、FoxP3+; Tr1; Th3; Treg17; T_{RE}G; CDCP1、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂 (例如, CD2、CD3、GM2)、Lewis- γ^2 、VEGF、VEGFR 1/2/3、 α V β 3、 α 5 β 1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、生腱蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1 β 、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、平滑受体 (Smoothened)、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR或ANTXR1、叶酸受体 α (FR α)、ERBB2 (Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生长因子受体 (EGFR)、间皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFR ν III、GD2、GD3、BCMA、MUC16 (CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13R α 1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、白介素-11受体 α (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生长因子受体-beta (PDGFR-beta)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMMWAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体beta、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、

PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、legumain、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活蛋白、端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受体、周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A,B,C) CD49f、CD151 CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC,或其抗原性片段或抗原性部分。

[1011] 在一些实施方案中,CAR抗原结合域结合传染性疾病的特征性抗原。在一些实施方案中,抗原是传染性疾病的特征性的,选自HIV、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人疱疹病毒、人疱疹病毒8 (HHV-8,卡波济肉瘤相关疱疹病毒 (KSHV)),人T淋巴营养性病毒-1 (HTLV-1)、默克尔细胞多瘤病毒 (MCV)、猿猴病毒40 (SV40)、埃巴病毒、CMV、人乳头瘤病毒。在一些实施方案中,传染性疾病的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体,受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。在一些实施方案中,CAR抗原结合域结合传染性疾病的特征性抗原,其中抗原选自HIV Env、gp120或CD4诱导HIV-1Env上的表位。参见例如,WO2015/077789,其内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,CAR抗原结合域包含CD4或其HIV结合片段。

[1012] 在一些实施方案中,CAR抗原结合域结合自身免疫或炎症病症的特征性抗原。在一些实施方案中,抗原是自身免疫或炎症病症特征性的,其选自慢性移植物抗宿主病 (GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、肺出血肾炎 (goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化、冷凝集素疾病、寻常性天疱疮、格雷夫氏病、自身免疫性溶血性贫血、血友病A、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、伊文氏综合征、IgM介导的神经病变、冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia)、皮炎、特发性血小板减少、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多发性神经病和自身免疫性血小板减少症或中性粒细胞减少症或纯红细胞再生障碍,而同种免疫疾病的示例性非限制性实例包括同种致敏作用 (参见例如Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15 (4) :931-41) 或造血或实体器官移植的异种致敏作用、输血,妊娠伴胎儿同种致敏作用、新生儿同种免疫性血小板减少症、新生儿溶血性疾病、对外来抗原的致敏作用,如可以发生在用酶或蛋白质替代疗法、血液产品和基因疗法治的遗传性或获得性缺陷疾病的替代中。在一些实施方案中,自身免疫或炎症病症的特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联的受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。在一些实施方案中,CAR抗原结合域与在B细胞、浆细胞、浆母细胞上表达的配体。在一些实施方案中,CAR抗原结合域结合自身免疫或炎症病症的特征性抗原,其中抗原选自CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、干扰素受体、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3 gamma、CD5或CD2。参见US 2003/0077249;WO 2017/058753;WO 2017/058850,其内容通过引用并入本文。

[1013] (b) CAR跨膜域

[1014] 在一些实施方案中,CAR包含跨膜域。在一些实施方案中,CAR包含至少以下的跨膜区:T细胞受体的alpha、beta或zeta链、CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含至少以下的跨膜区:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B或其功能变体。

[1015] (c) CAR信号传导域

[1016] 在一些实施方案中,CAR包含以下的一个或多个的信号传导域:B7-1/CD80;B7-2/CD86;B7-H1/PD-L1;B7-H2;B7-H3;B7-H4;B7-H6;B7-H7;BTLA/CD272;CD28;CTLA-4;Gi24/VISTA/B7-H5;ICOS/CD278;PD-1;PD-L2/B7-DC;PDCD6);4-1BB/TNFSF9/CD137;4-1BB配体/TNFSF9;BAFF/BLyS/TNFSF13B;BAFF R/TNFRSF13C;CD27/TNFRSF7;CD27配体/TNFSF7;CD30/TNFRSF8;CD30配体/TNFSF8;CD40/TNFRSF5;CD40/TNFSF5;CD40配体/TNFSF5;DR3/TNFRSF25;GITR/TNFRSF18;GITR配体/TNFSF18;HVEM/TNFRSF14;LIGHT/TNFSF14;淋巴毒素-alpha/TNF-beta;OX40/TNFRSF4;OX40配体/TNFSF4;RELT/TNFRSF19L;TACI/TNFRSF13B;TL1A/TNFSF15;TNF-alpha;TNF RII/TNFRSF1B);2B4/CD244/SLAMF4;BLAME/SLAMF8;CD2;CD2F-10/SLAMF9;CD48/SLAMF2;CD58/LFA-3;CD84/SLAMF5;CD229/SLAMF3;CRACC/SLAMF7;NTB-A/SLAMF6;SLAM/CD150);CD2;CD7;CD53;CD82/Kai-1;CD90/Thy1;CD96;CD160;CD200;CD300a/LMIR1;HLA I类;HLA-DR;Ikaros;整联蛋白alpha 4/CD49d;整联蛋白alpha 4beta 1;整联蛋白alpha 4beta 7/LPAM-1;LAG-3;TCL1A;TCL1B;CRTAM;DAP12;Dectin-1/CLEC7A;DPPIV/CD26;EphB6;TIM-1/KIM-1/HAVCR;TIM-4;TSLP;TSLP R;淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1);NKG2C、CD3 zeta域、基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)或其功能变体。

[1017] 在一些实施方案中,CAR包含作为共刺激域的信号传导域。在一些实施方案中,CAR包含第二共刺激域。在一些实施方案中,CAR包含至少两个共刺激域。在一些实施方案中,CAR包含至少三个共刺激域。在一些实施方案中,CAR包含以下的一个或多个的共刺激域:CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体。

[1018] 在一些实施方案中,CAR包含CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)或其功能变体;(ii) CD28域或其功能变体;和(iii) 4-1BB域或CD134域或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 zeta域或基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)或其功能变体;(ii) CD28域或其功能变体;(iii) 4-1BB域或CD134域或其功能变体;和(iv) 细胞因子或共刺激配体转基因。

[1019] (d) CAR间隔区

[1020] 在一些实施方案中,CAR包含一个或多个间隔区。在一些实施方案中,CAR在抗原结合域和跨膜域之间包含间隔区。在一些实施方案中,CAR在跨膜域和细胞内信号传导域之间包含间隔区。

[1021] (e) CAR膜蛋白有效载荷剂

[1022] 除了本文描述的CAR之外,各种嵌合抗原受体和编码它们的核苷酸序列在本领域

中是已知的,并且将适合于本文所述的体内和体外的靶细胞的融合体递送和重编程。参见,例如W02013040557;W02012079000;W02016030414;Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI:10.1038/NNANO.2017.57,其公开通过引用并入本文。

[1023] 在一些实施方案中,包含膜蛋白有效载荷剂的融合体是或包含CAR或编码CAR的核酸(例如,DNA、gDNA、cDNA、RNA、pre-mRNA、mRNA、miRNA、siRNA等)递送至靶细胞。在一些实施方案中,靶细胞是效应细胞,例如表达一种或多种Fc受体并介导一种或多种效应子功能的免疫系统细胞。在一些实施方案中,靶细胞可以包括但不限于以下的一种或多种:单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞、T淋巴细胞(例如T细胞)、Gamma delta T细胞、B淋巴细胞(例如B细胞),并且抗原来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。

[1024] (ix) T细胞受体有效载荷

[1025] 在一些实施方案中,本文所述的膜蛋白有效载荷剂包含或编码包含T细胞受体的多肽,例如T细胞受体融合蛋白(TFP)。在一些实施方案中,TFP包含衍生自包含TCR的各种多肽的重组多肽,所述TCR通常能够i) 结合靶细胞上的表面抗原,和ii) 与完整TCR复合物的其他多肽组分相互作用,通常当共定位于T细胞内或表面上时。在一些实施方案中,当在T细胞中表达时,TFP掺入TCR。在一些实施方案中,膜蛋白有效载荷剂包含或编码(i) 抗原结合域,其与(ii) TCR域可操作地连接。

[1026] 抗原结合域可以包含例如scFv,例如,结合癌细胞所包含的抗原的scFv,例如癌细胞表面的抗原。抗原结合域可以是人的或人源化的。在一些实施方案中,抗原结合域是本文例如在标题为“CAR抗原结合域”的部分中描述的抗原结合域。

[1027] 在一些实施方案中,抗原结合域结合抗体的Fc域。在一些实施方案中,抗原结合域选择性结合IgG1抗体。在一些实施方案中,抗原结合域结合细胞表面抗原,例如肿瘤细胞表面上的细胞表面抗原。在一些实施方案中,抗原结合域包含单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,抗原结合域不包含抗体或其片段。在一些实施方案中,抗原结合域包含CD16多肽或其片段。在一些实施方案中,抗原结合域包含CD16结合多肽。

[1028] 在一些实施方案中,TFP包括TCR亚基的胞外域,其包含选自下组的蛋白质的胞外域或其部分:T细胞受体的alpha或beta链,CD3 delta、CD3 epsilon或CD3 gamma或其功能片段或变体。在一些实施方案中,TCR域包括跨膜域,例如,至少TCR alpha链、TCR beta链、CD3 epsilon TCR亚基、CD3 gamma TCR亚基、CD3 delta TCR亚基或CD3 zeta TCR亚基的跨膜域的跨膜区,或其功能片段或变体。

[1029] 在进一步的实施方案中,TCR域包含TCR细胞内域,其包含选自CD3 epsilon、CD3 gamma或CD3 delta或其变体的细胞内信号传导域的刺激域。

[1030] 在进一步的实施方案中,TCR域包含(i) TCR细胞外域,(ii) TCR跨膜域,和(iii) TCR细胞内域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个或全部三个来自同一个TCR亚基。

[1031] 在一些实施方案中,TCR域包含CD3 ϵ 或其功能片段或变体。在一些实施方案中,TCR域(例如,基于CD3 ϵ 的TCR域)结合内源CD3 ζ 。在一些实施方案中,TCR域包含CD3 α 或其功能片段或变体。在一些实施方案中,TCR域包含CD3 β 或其功能片段或变体。在一些实施方案中,TCR域(例如,基于CD3 α 或基于CD3 β 的TCR域)结合内源CD3 ζ 。在一些实施方案中,TCR域(例

如,基于CD3 α 的TCR域)结合内源CD3 β 。在一些实施方案中,TCR域(例如,基于CD3 β 的TCR域)结合内源CD3 α 。在一些实施方案中,TCR域(例如,基于CD3 α 的或基于CD3 β 的TCR域)结合内源CD3 δ 。

[1032] 在一些实施方案中,TFP包含TCR亚基,其包含TCR细胞外域的至少一部分,和TCR细胞内域,其包含来自CD3(例如,CD3 epsilon、CD3 gamma、CD3 delta、TCR alpha或TCR beta)的细胞内信号传导域的刺激域;以及人或人源化抗原结合域,其中TCR亚基和抗原结合域可操作地连接,并且其中TFP在T细胞中表达时掺入TCR。在一些实施方案中,TFP包含TCR亚基和人或人源化抗体域,所述人或人源化抗体域包含作为抗CD19结合域或抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合域的抗原结合域。

[1033] 示例性TFP描述于例如W02016187349、W02018026953、W02018067993、W02018098365、W02018119298和W02018232020中,其每一篇通过引用整体并入本文。

[1034] 分泌的有效载荷剂,例如分泌的蛋白质有效载荷剂

[1035] 有效载荷剂,例如蛋白质有效载荷剂,也可以靶向分泌。在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物可以用于在ER中翻译后将有效载荷靶向细胞器(例如高尔基体,分泌性囊泡)的腔。在一些实施方案中,分泌的蛋白质有效载荷剂包含分泌的蛋白质或编码其的核酸。

[1036] 线粒体(Chondrisome)

[1037] 在一些实施方案中,融合体或融合体组合物进一步包含线粒体或线粒体制剂。在一些实施方案中,融合体或融合体组合物包含衍生自线粒体的细胞来源的修饰的线粒体制剂。在一些实施方案中,融合体或融合体组合物包含表达外源蛋白质的线粒体制剂。在一些实施方案中,外源蛋白质对于所述线粒体是外源的。在一些实施方案中,外源蛋白对于所述线粒体的细胞源是外源的。本发明考虑了包括线粒体、线粒体制剂、方法和用途的其他特征和实施方案,例如,如国际申请PCT/US16/64251中所述。

[1038] 免疫原性

[1039] 在本文所述的任何方面的一些实施方案中,融合体组合物为基本上非免疫原性的。免疫原性可以被定量,例如如本文所述。

[1040] 在一些实施方案中,融合体组合物具有细胞的膜对称性,所述细胞为或已知为基本上非免疫原性的,例如干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、塞特利氏细胞(sertoli cell)或视网膜色素上皮细胞。在一些实施方案中,融合体的免疫原性比干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、塞特利氏细胞或视网膜色素上皮细胞的免疫原性高不超过5%、10%、20%、30%、40%或50%,如根据本文所述的测定法所测量。

[1041] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,融合体组合物包含升高水平的免疫抑制剂。在一些实施方案中,升高的水平为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍。在一些实施方案中,融合体组合物包含参考细胞中不存在的免疫抑制剂。在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,融合体组合物包含降低水平的免疫活化剂。在一些实施方案中,降低的水平为相比于参考细胞的至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%。在一些实施方案中,免疫活化剂基本上不存在于融合体中。

[1042] 在一些实施方案中,融合体组合物包含膜,所述膜具有与源细胞,例如基本上非免疫原性的源细胞基本上类似(例如根据蛋白质组学所测量)的组成。在一些实施方案中,融合体组合物包含膜,所述膜包含源细胞的膜蛋白的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,融合体组合物包含膜,所述膜包含以源细胞膜上的膜蛋白的表达水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%表达的膜蛋白。

[1043] 在一些实施方案中,融合体组合物,或衍生融合体组合物的源细胞具有以下特征中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个:

[1044] a. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或HeLa细胞,MHC I类或MHC II类的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1045] b. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或本文所述的参考细胞,包括但不限于以下的一种或多种共刺激蛋白的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小:LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L 4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3或B7-H4;

[1046] c. 抑制巨噬细胞吞噬的表面蛋白(例如CD47)的表达,例如通过本文所述的方法可检测的表达,例如相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,抑制巨噬细胞吞噬的表面蛋白(例如CD47)的表达为大于1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更大;

[1047] d. 可溶性免疫抑制细胞因子(例如IL-10)的表达,例如通过本文所述的方法可检测的表达,例如相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,可溶性免疫抑制细胞因子(例如IL-10)的表达为大于1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更大;

[1048] e. 可溶性免疫抑制蛋白(例如PD-L1)的表达,例如通过本文所述的方法可检测的表达,例如相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,可溶性免疫抑制蛋白(例如PD-L1)的表达为大于1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更大;

[1049] f. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或U-266细胞,可溶性免疫刺激细胞因子,例如IFN- γ 或TNF- α 的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1050] g. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或A549细胞或SK-BR-3细胞,内源性免疫刺激抗原,例如Zg16或Hormad1的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1051] h. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,HLA-E或HLA-G的表达,例如通过本文所述的方法可检测的表达;

[1052] i. 表面糖基化分布,例如含有唾液酸,其用以例如抑制NK细胞活化;

[1053] j. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,TCR α/β 的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1054] k. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或HeLa细胞,ABO血型的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1055] l. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细

胞,次要组织相容性抗原(MHA)的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;或

[1056] m. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,具有少于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的线粒体MHA,或具有不可检测的线粒体MHA。

[1057] 在实施方案中,共刺激蛋白为4-1BB、B7、SLAM、LAG3、HVEM或LIGHT,且参考细胞为HDLM-2。在一些实施方案中,共刺激蛋白为BY-H3且参考细胞为HeLa。在一些实施方案中,共刺激蛋白为ICOSL或B7-H4,且参考细胞为SK-BR-3。在一些实施方案中,共刺激蛋白为ICOS或OX40,且参考细胞为MOLT-4。在一些实施方案中,共刺激蛋白为CD28,且参考细胞为U-266。在一些实施方案中,共刺激蛋白为CD30L或CD27,且参考细胞为Daudi。

[1058] 在一些实施方案中,融合体组合物基本上不引发免疫系统,例如先天免疫系统的免疫原性应答。在实施方案中,免疫原性应答可以被定量,例如如本文所述。在一些实施方案中,先天免疫系统的免疫原性应答包含先天免疫细胞的应答,所述先天免疫细胞包括但不限于NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞或 γ/δ T细胞。在一些实施方案中,先天免疫系统的免疫原性应答包含补体系统的应答,所述补体系统包括可溶性血液组分和膜结合组分。

[1059] 在一些实施方案中,融合体组合物基本上不引发免疫系统,例如适应性免疫系统的免疫原性应答。在实施方案中,免疫原性应答可以被定量,例如如本文所述。在一些实施方案中,适应性免疫系统的免疫原性应答包含适应性免疫细胞的免疫原性应答,包括但不限于T淋巴细胞(例如CD4 T细胞、CD8 T细胞和或 $\gamma-\delta$ T细胞)或B淋巴细胞的数目或活性的变化,例如增加。在一些实施方案中,适应性免疫系统的免疫原性应答包括增加的可溶血液组分水平,包括但不限于细胞因子或抗体(例如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD)的数目或活性的变化,例如增加。

[1060] 在一些实施方案中,融合体组合物被修饰以具有降低的免疫原性。免疫原性可以被定量,例如如本文所述。在一些实施方案中,融合体组合物的免疫原性比参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞的免疫原性低小于5%、10%、20%、30%、40%或50%。

[1061] 在本文所述的任何方面的一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,例如具有修饰的基因组(例如使用本文所述的方法修饰)的哺乳动物细胞,以降低(例如减少)免疫原性。免疫原性可以被定量,例如如本文所述。

[1062] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞耗尽以下中的一、二、三、四、五、六、七个或更多个(例如将其基因敲除):

[1063] a. MHC I类、MHC II类或MHA;

[1064] b. 一种或多种共刺激蛋白,包括但不限于:LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L 4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3或B7-H4;

[1065] c. 可溶性免疫刺激细胞因子,例如IFN- γ 或TNF-a;

[1066] d. 内源性免疫刺激抗原,例如Zg16或Hormad1;

[1067] e. T细胞受体(TCR);

[1068] f. 编码ABO血型的基因,例如ABO基因;

[1069] g. 驱动免疫活化的转录因子,例如NFkB;

[1070] h. 控制MHC表达的转录因子,例如II类反式活化子(CIITA)、Xbox 5的调节因子(RFX5)、RFX相关蛋白(RFXAP)或RFX锚蛋白重复序列(RFXANK;也称为RFXB);或

[1071] i. TAP蛋白,例如TAP2、TAP1或TAPBP,其降低MHC I类表达。

[1072] 在一些实施方案中,融合体衍生自具有遗传修饰的源细胞,所述遗传修饰使得免疫抑制剂,例如以下中的一种、两种、三种或更多种的表达增加(例如其中在遗传修饰之前,细胞不表达因子):

[1073] a. 抑制巨噬细胞吞噬的表面蛋白,例如CD47;例如相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞增加的CD47的表达;

[1074] b. 可溶性免疫抑制细胞因子,例如IL-10,例如相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞增加的IL-10的表达;

[1075] c. 可溶性免疫抑制蛋白,例如PD-1、PD-L1、CTLA4或BTLA;例如相比于参考细胞,例如另外与细胞来源类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞增加的免疫抑制蛋白的表达;或

[1076] d. 致耐受性蛋白,例如ILT-2或ILT-4激动剂,例如HLA-E或HLA-G或任何其他内源性ILT-2或ILT-4激动剂,例如相比于参考细胞,例如另外与细胞来源类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞增加的HLA-E、HLA-G、ILT-2或ILT-4的表达。

[1077] 在一些实施方案中,增加的表达水平为相比于参考细胞高至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍。

[1078] 在一些实施方案中,融合体衍生自源细胞,所述源细胞被修饰以具有降低的免疫活化剂的表达,例如以下中的一、二、三、四、五、六、七、八个或更多个:

[1079] a. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或HeLa细胞,MHC I类或MHC II类的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1080] b. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或本文所述的参考细胞,包括但不限于以下的一种或多种共刺激蛋白的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小:LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L 4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3或B7-H4;

[1081] c. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或U-266细胞,可溶性免疫刺激细胞因子,例如IFN- γ 或TNF- α 的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1082] d. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或A549细胞或SK-BR-3细胞,内源性免疫刺激抗原,例如Zg16或Hormad1的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1083] e. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,T细胞受体(TCR)的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1084] f. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或HeLa细胞,ABO血型的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;

[1085] g. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,驱动免疫活化的转录因子,例如NFkB的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小

[1086] h. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或Jurkat细胞,控制MHC表达的转录因子,例如II类反式活化子(CIITA)、Xbox 5的调节因子(RFX5)、RFX相关蛋白(RFXAP)或RFX锚蛋白重复序列(RFXANK;也称为RFXB)的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小;或

[1087] i. 相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,或HeLa细胞,降低MHC I类表达的TAP蛋白,例如TAP2、TAP1或TAPBP的表达为小于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%或更小。

[1088] 在一些实施方案中,相比于未修饰的细胞,例如未修饰的间充质干细胞,衍生自使用表达shRNA的慢病毒修饰以降低MHC I类表达的哺乳动物细胞(例如间充质干细胞)的融合体组合物具有较低的MHC I类表达。在一些实施方案中,相比于未修饰的细胞,例如未修饰的间充质干细胞,衍生自使用表达HLA-G的慢病毒修饰以增加HLA-G表达的哺乳动物细胞(例如间充质干细胞)的融合体组合物具有增加的HLA-G表达。

[1089] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自基本上没有免疫原性的源细胞,例如哺乳动物细胞,其中源细胞以0pg/mL至>0pg/mL的水平刺激(例如诱导)T细胞IFN- γ 分泌,例如通过IFN- γ ELISPOT测定法在体外所分析。

[1090] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,例如哺乳动物细胞,其中哺乳动物细胞来自用免疫抑制剂,例如糖皮质激素(例如地塞米松)、细胞生长抑制剂(例如甲氨喋呤)、抗体(例如莫罗单抗(Muromonab)-CD3)或免疫亲和素调节剂(例如环孢菌素或雷帕霉素)处理的细胞培养物。

[1091] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,例如哺乳动物细胞,其中哺乳动物细胞包含外源药剂,例如治疗剂。

[1092] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,例如哺乳动物细胞,其中哺乳动物细胞为重组细胞。

[1093] 在一些实施方案中,融合体衍生自哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞经遗传修饰以表达病毒逃避蛋白,例如hCMV US2或US11。

[1094] 在一些实施方案中,用聚合物,例如降低免疫原性和免疫介导的清除的生物相容性聚合物(例如PEG)来共价或非共价修饰融合体的表面,或衍生融合体的哺乳动物细胞的表面。

[1095] 在一些实施方案中,用唾液酸,例如含糖聚合物的唾液酸来共价或非共价修饰融合体的表面,或衍生融合体的哺乳动物细胞的表面,所述糖聚合物含有NK抑制性聚糖表位。

[1096] 在一些实施方案中,用酶处理,例如用糖苷酶,例如 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶处理融合体的表面,或衍生融合体的哺乳动物细胞的表面以去除ABO血型。

[1097] 在一些实施方案中,用酶处理融合体的表面,或衍生融合体的哺乳动物细胞的表面以产生,例如诱导与受体的血型匹配的ABO血型的表达。

[1098] 评估免疫原性的参数

[1099] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,例如哺乳动物细胞,其基本上没有免疫原性,或被修饰(例如使用本文所述的方法修饰)以降低免疫原性。源细胞和融合体组合物的免疫原性可通过本文所述的任何测定法来确定。

[1100] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的体内移植物存活率增加,例如增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量体内移植物存活率的测定法来确定移植物存活率。

[1101] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的畸胎瘤形成增加,例如增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量畸胎瘤形成的测定法来确定畸胎瘤形成。

[1102] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的畸胎瘤存活率增加,例如增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,融合体组合物在畸胎瘤存活率测定法中存活一或多天。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量畸胎瘤存活率的测定法来确定畸胎瘤存活率。在实施方案中,如实施例中所述,通过固定组织(例如冷冻或福尔马林固定)的成像分析,例如IHC染色、荧光染色或H&E来测量畸胎瘤形成。在一些实施方案中,固定组织可用以下抗体中的任何一种或全部来染色:抗人类CD3、抗人类CD4或抗人类CD8。

[1103] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的向移植物或畸胎瘤中的CD8⁺ T细胞浸润降低,例如降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量CD8⁺ T细胞浸润的测定法,例如组织学分析来确定CD8⁺ T细胞浸润。在一些实施方案中,衍生自融合体组合物的畸胎瘤在0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的组织学组织切片的50×像场中具有CD8⁺ T细胞浸润。

[1104] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的向移植物或畸胎瘤中的CD4⁺ T细胞浸润降低,例如降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量CD4⁺ T细胞浸润的测定法,例如组织学分析来确定CD4⁺ T细胞浸润。在一些实施方案中,衍生自融合体组合物的畸胎瘤在0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的组织学组织切片的50×像场中具有CD4⁺ T细胞浸润。

[1105] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的向移植物或畸胎瘤中的CD3+NK细胞浸润降低,例如降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,在适当动物模型,例如本文所述的动物模型中通过如本文所述的测量CD3+NK细胞浸润的测定法,例如组织学分析来确定CD3+NK细胞浸润。在一些实施方案中,衍生自融合体组合物的畸胎瘤在0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的组织学组织切片的50×像场中具有CD3+NK T细胞浸润。

[1106] 在一些实施方案中,相比于在将参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞一次或多次植入至适当动物模型,例如本文所述的动物模型中之后的体液反应,

融合体组合物的免疫原性降低,如根据在将衍生的融合体一次或多次植入至适当动物模型,例如本文所述的动物模型中之后的体液反应的降低所测量。在一些实施方案中,通过抗细胞抗体滴度,例如抗融合体抗体滴度,例如通过ELISA来测量血清样品中的体液反应的降低。在一些实施方案中,相比于来自施用未修饰的细胞的动物的血清样品,来自施用融合体组合物的动物的血清样品的抗细胞抗体滴度降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,来自施用融合体组合物的动物的血清样品具有增加的抗细胞抗体滴度,例如与基线相比增加了1%、2%、5%、10%、20%、30%或40%,例如其中基线是指在施用融合体组合物之前来自相同动物的血清样品。

[1107] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的巨噬细胞吞噬作用降低,例如巨噬细胞吞噬作用降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中巨噬细胞吞噬作用的降低是通过体外分析吞噬作用指数来确定,例如如实施例82中所述。在一些实施方案中,当在巨噬细胞吞噬作用的体外测定法中与巨噬细胞一起温育时,融合体组合物具有0、1、10、100或更大的吞噬作用指数,例如根据实施例82的测定法所测量。

[1108] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞或间充质干细胞,源细胞的细胞毒性介导的通过PBMC的细胞溶解降低,例如细胞溶解降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,例如使用实施例83的测定法。在实施方案中,源细胞表达外源HLA-G。

[1109] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的NK介导的细胞溶解降低,例如NK介导的细胞溶解降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中通过铬释放测定法或铈释放测定法在体外分析NK介导的细胞溶解。

[1110] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的CD8⁺ T细胞介导的细胞溶解降低,例如CD8⁺ T细胞介导的细胞溶解降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中通过铬释放测定法或铈释放测定法在体外分析CD8⁺ T细胞介导的细胞溶解。在实施方案中,如实施例85中所述地测量活化和/或增殖。

[1111] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的CD4⁺ T细胞增殖和/或活化降低,例如降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中在体外分析CD4⁺ T细胞增殖(例如修饰或未修饰的哺乳动物源细胞,和CD4⁺ T细胞与CD3/CD28戴诺珠粒(Dynabeads)的共培养测定法),例如如实施例86中所述。

[1112] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的T细胞IFN- γ 分泌降低,例如T细胞IFN- γ 分泌降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中在体外分析T细胞IFN- γ 分泌,例如通过IFN- γ ELISPOT。

[1113] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的免疫原性细胞因子分泌降低,例如免疫原性细胞因子分泌降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用ELISA或ELISPOT

在体外分析免疫原性细胞因子分泌。

[1114] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物使得免疫抑制细胞因子的分泌增加,例如免疫抑制细胞因子的分泌增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用ELISA或ELISPOT在体外免疫抑制细胞因子的分泌。

[1115] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的HLA-G或HLA-E的表达增加,例如HLA-G或HLA-E的表达增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用流式细胞测量术,例如FACS在体外分析HLA-G或HLA-E的表达。在一些实施方案中,融合体组合物衍生自源细胞,所述源细胞经修饰以具有增加的HLA-G或HLA-E的表达,例如相比于未修饰的细胞,例如HLA-G或HLA-E的表达增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用流式细胞测量术,例如FACS在体外分析HLA-G或HLA-E的表达。在一些实施方案中,衍生自具有增加的HLA-G表达的修饰的细胞的融合体组合物在畸胎瘤形成测定法,例如如本文所述的畸胎瘤形成测定法中展现降低的免疫原性,例如根据降低的免疫细胞浸润所测量。

[1116] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的T细胞抑制剂配体(例如CTLA4、PD1、PD-L1)的表达增加,例如T细胞抑制剂配体的表达增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用流式细胞测量术,例如FACS在体外分析T细胞抑制剂配体的表达。

[1117] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞,融合体组合物的共刺激配体的表达降低,例如共刺激配体的表达降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用流式细胞测量术,例如FACS在体外分析共刺激配体的表达。

[1118] 在一些实施方案中,相比于参考细胞,例如在其它方面与源细胞类似的未修饰的细胞或HeLa细胞,融合体组合物的MHC I类或MHC II类的表达降低,例如MHC I类或MHC II类的表达降低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大,其中使用流式细胞测量术,例如FACS在体外分析MHC I类或II类的表达。

[1119] 在一些实施方案中,融合体组合物衍生自基本上非免疫原性的细胞来源,例如哺乳动物细胞来源。在一些实施方案中,免疫原性可以被定量,例如如本文所述。在一些实施方案中,哺乳动物细胞来源包含以下特征中的任何一个、全部或组合:

[1120] a. 其中源细胞是从自体细胞来源获得的;例如从将接受(例如施用)融合体组合物的受体获得的细胞;

[1121] b. 其中源细胞是从与受体,例如将接受(例如施用)融合体组合物的本文所述的受体具有匹配(例如相同)性别的同种异体细胞来源获得的;

[1122] c. 其中源细胞是从HLA与受体的HLA匹配(例如在一个或多个等位基因处)的同种异体细胞来源获得的;

[1123] d. 其中源细胞是从作为HLA纯合子的同种异体细胞来源获得的;

[1124] e. 其中源细胞是从缺乏(或与参考细胞相比水平降低)MHC I类和II类的同种异体细胞来源获得的;或

[1125] f. 其中源细胞是从已知基本上非免疫原性的细胞来源,包括但不限于干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、塞特利氏细胞或视网膜色素上皮细胞获得的。

[1126] 在一些实施方案中,待施用融合体组合物的受试者具有或已知具有与融合体反应的预先存在的抗体(例如IgG或IgM),或关于所述抗体进行测试。在一些实施方案中,待施用融合体组合物的受试者不具有可检测水平的与融合体反应的预先存在的抗体。抗体的测试描述于例如实施例78中。

[1127] 在一些实施方案中,已接受融合体组合物的受试者具有或已知具有与融合体反应的抗体(例如IgG或IgM),或关于所述抗体进行测试。在一些实施方案中,已接受融合体组合物(例如至少一次、两次、三次、四次、五次或更多次)的受试者不具有可检测水平的与融合体反应的抗体。在实施方案中,抗体水平在两个时间点之间不升高超过1%、2%、5%、10%、20%或50%,第一时间点在第一次施用融合体之前,且第二时间点在一次或多次施用融合体之后。抗体的测试描述于例如实施例79中。

[1128] 其他治疗剂

[1129] 在一些实施方案中,向受试者,例如受体,例如本文所述的受体共同施用融合体组合物与其他药剂,例如治疗剂。在一些实施方案中,共同施用的治疗剂为免疫抑制剂,例如糖皮质激素(例如地塞米松)、细胞生长抑制剂(例如甲氨蝶呤)、抗体(例如莫罗单抗-CD3)或免疫亲和素调节剂(例如环孢菌素或雷帕霉素)。在实施方案中,免疫抑制剂降低免疫介导的融合体清除。在一些实施方案中,融合体组合物与免疫刺激剂,例如佐剂、白介素、细胞因子或趋化因子共同施用。

[1130] 在一些实施方案中,在相同时间施用,例如同时施用融合体组合物和免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用免疫抑制剂之前施用融合体组合物。在一些实施方案中,在施用免疫抑制剂之后施用融合体组合物。

[1131] 在一些实施方案中,免疫抑制剂为小分子,如布洛芬、对乙酰氨基酚、环孢灵、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸酯、环磷酰胺、糖皮质激素、西罗莫司、硫唑嘌呤或甲氨蝶呤。

[1132] 在一些实施方案中,免疫抑制剂为抗体分子,包括但不限于:莫罗诺单抗(muronomab)(抗CD3)、达利珠单抗(Daclizumab)(抗IL12)、巴利昔单抗(Basiliximab)、英利昔单抗(Infliximab)(抗TNF α)或利妥昔单抗(rituximab)(抗CD20)。

[1133] 在一些实施方案中,相比于单独施用融合体组合物,共同施用融合体组合物与免疫抑制剂使得融合体组合物在受试者中的持久性增强。在一些实施方案中,相比于单独施用时融合体组合物的持久性,共同施用的融合体组合物的持久性增强至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更久。在一些实施方案中,相比于单独施用时融合体组合物的持久性,共同施用的融合体组合物的持久性增强至少1、2、3、4、5、6、7、10、15、20、25或30天或更久。

[1134] 递送

[1135] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后向靶细胞或组织递送融合剂(例如蛋白质、脂质或化学融合剂)或融合剂结合配偶体。

[1136] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后向非靶细胞或组织递送融合剂(例如蛋白质、脂质或化学融合剂)或融合剂结合配偶体。

[1137] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后向靶细胞或组织递送编码融

合剂(例如蛋白质或脂质融合剂)或融合剂结合配偶体的核酸。

[1138] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后向靶细胞或组织递送上调或下调融合剂(例如蛋白质、脂质或化学融合剂)或融合剂结合配偶体的表达的多肽、核酸、核糖核蛋白或小分子。

[1139] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后向非靶细胞或组织递送上调或下调融合剂(例如蛋白质、脂质或化学融合剂)或融合剂结合配偶体的表达的多肽、核酸、核糖核蛋白或小分子。

[1140] 在一些实施方案中,在递送融合体之前、同时或之后通过(例如诱导应激或细胞分裂)来修饰靶细胞或组织以增加融合率。一些非限制性实例包括诱导缺血、化学疗法治疗、抗生素、照射、毒素、发炎、炎性分子、抗炎分子、酸性损伤、碱性损伤、烧伤、聚乙二醇、神经递质、骨髓毒性药物、生长因子或激素、组织切除、饥饿和/或运动。

[1141] 在一些实施方案中,用血管舒张剂(例如氧化氮(NO)、一氧化碳、前列环素(PGI₂)、硝酸甘油、酚妥拉明)或血管收缩剂(例如血管紧张素(AGT)、内皮素(EDN)、去甲肾上腺素)治疗靶细胞或组织以增加融合体转运至靶组织的速率。

[1142] 在一些实施方案中,用化学剂,例如化学治疗剂来治疗靶细胞或组织。在此类实施方案中,化学治疗剂诱导增强靶细胞或组织的促融合活性的对靶细胞或组织的损伤。

[1143] 在一些实施方案中,用物理应力,例如电融合来治疗靶细胞或组织。在此类实施方案中,物理应力使靶细胞或组织的膜不稳定,以增强靶细胞或组织的促融合活性。

[1144] 在一些实施方案中,靶细胞或组织可用药剂治疗以增强与融合体的融合。例如,可用抗抑郁药刺激特定神经元受体以增强促融合特性。

[1145] 包含本文所述的融合体的组合物可施用或靶向至循环系统、肝系统、肾系统、心肺系统、中枢神经系统、外周神经系统、肌肉骨骼系统、淋巴系统、免疫系统、感觉神经系统(视觉、听觉、嗅觉、触觉、味觉)、消化系统、内分泌系统(包括脂肪组织代谢调节)和生殖系统。

[1146] 在实施方案中,将本文所述的融合体组合物离体递送至细胞或组织,例如人类细胞或组织。在一些实施方案中,将组合物递送至处于受伤状态(例如由于创伤、疾病、缺氧、缺血或其他损伤)的离体组织。

[1147] 在一些实施方案中,将融合体组合物递送至离体移植物(例如组织外植体或用于移植的组织,例如人类静脉,肌肉骨骼移植物(如骨骼或肌腱)、角膜、皮肤、心脏瓣膜、神经;或分离或培养的器官,例如要向人类移植的器官,例如人类心脏、肝脏、肺脏、肾脏、胰脏、肠、胸腺、眼睛)。组合物改善移植物的活力、呼吸或其他功能。组合物可在移植之前、期间和/或之后递送至组织或器官。

[1148] 在一些实施方案中,将本文所述的融合体组合物离体递送至衍生自受试者的细胞或组织。在一些实施方案中,向受试者重新施用细胞或组织(即,细胞或组织为自体的)。

[1149] 融合体可与来自任何哺乳动物(例如人类)组织,例如来自上皮、结缔组织、肌肉或神经组织或细胞,以及其组合的细胞融合。融合体可递送至任何真核(例如哺乳动物)器官系统,例如心血管系统(心脏、脉管系统);消化系统(食道、胃、肝脏、胆囊、胰脏、肠、结肠、直肠和肛门);内分泌系统(下丘脑、脑下垂体、松果体或松果体腺体、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺);排泄系统(肾脏、输尿管、膀胱);淋巴系统(淋巴、淋巴结、淋巴管、扁桃体、腺样体、胸腺、脾脏);皮肤系统(皮肤、头发、指甲);肌肉系统(例如骨骼肌);神经系统(脑、脊髓、神

经);生殖系统(卵巢、子宫、乳腺、睾丸、输精管、精囊、前列腺);呼吸系统(咽、喉、气管、支气管、肺、隔膜);骨骼系统(骨骼、软骨)以及其组合。

[1150] 在实施方案中,融合体在向受试者施用时靶向组织,例如肝脏、肺脏、心脏、脾脏、胰脏、胃肠道、肾脏、睾丸、卵巢、大脑、生殖器官、中枢神经系统、外周神经系统、骨骼肌、内皮、内耳、脂肪组织(例如棕色脂肪组织或白色脂肪组织)或眼睛,例如其中在24、48或72小时之后,施用的融合体群体中至少0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的融合体存在于靶组织中,例如根据实施例87或100的测定法。

[1151] 在实施方案中,融合体可与来自干细胞或祖细胞来源的细胞融合,例如骨髓基质细胞、骨髓源性成年祖细胞(MAPC)、内皮祖细胞(EPC)、胚细胞、在室管膜下区中形成的中间祖细胞、神经干细胞、肌肉干细胞、卫星细胞、肝干细胞、造血干细胞、骨髓基质细胞、表皮干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞、脐带干细胞、前体细胞、肌肉前体细胞、成肌细胞、心肌细胞、神经前体细胞、神经胶质前体细胞、神经元前体细胞、成肝细胞。

[1152] 融合剂结合配偶体,例如用于降落垫实施方案

[1153] 在某些方面,本公开提供一种将融合体递送至受试者的靶细胞的方法。在一些实施方案中,方法包含向受试者施用融合体,所述融合体包含编码融合剂(例如成肌蛋白)的核酸,其中核酸在允许融合剂表达于受试者的融合体表面上的条件下不存在或不表达(例如存在但不转录或不翻译)于细胞内。在一些实施方案中,方法进一步包含在允许融合体上的融合剂和融合剂结合配偶体融合的条件下向受试者施用组合物,所述组合物包含药剂,例如治疗剂,和融合剂结合配偶体,任选地包含载体,例如膜。在一些实施方案中,载体包含膜,例如脂质双层,例如药剂安置于脂质双层内。在一些实施方案中,脂质双层与靶细胞融合,从而将药剂递送至受试者的靶细胞。

[1154] 在一些实施方案中,融合剂结合配偶体为安置于靶细胞,例如本文公开的靶细胞的膜(例如脂质双层)中的部分,例如蛋白质分子。在一些实施方案中,膜可为细胞表面膜,或细胞器(例如线粒体、溶酶体或高尔基体)的亚细胞膜。在一些实施方案中,融合剂结合配偶体可内源性表达、过表达或外源性表达(例如通过本文所述的方法)。在一些实施方案中,融合剂结合配偶体可与其他融合剂结合配偶体聚集于膜处。

[1155] 在一些实施方案中,融合剂结合配偶体或多个融合剂结合配偶体在靶细胞膜中的存在产生了界面,所述界面可促进靶细胞(例如本文所述的细胞)上的融合剂结合配偶体与融合体(例如本文所述的融合体)上的融合剂之间的相互作用,例如结合。在一些实施方案中,融合体上的融合剂与靶细胞,例如靶细胞膜(例如脂质双层)上的融合剂结合配偶体相互作用(例如结合),以诱导融合体与靶膜的融合。在一些实施方案中,融合剂与包括线粒体的亚细胞细胞器上的降落垫上的融合剂结合配偶体相互作用(例如结合),以诱导融合体与亚细胞细胞器的融合。

[1156] 融合剂结合配偶体可通过下文论述的任何方法引入靶细胞,例如本文公开的靶细胞中。

[1157] 在一些实施方案中,将融合剂结合配偶体引入至靶细胞的方法包含从受试者(例如本文所述的受试者)去除(例如提取)靶细胞(例如经由血球分离术或活检),和在允许融合剂结合配偶体表达于靶细胞膜上的条件下施用(例如暴露于)融合剂结合配偶体。在一些

实施方案中,方法包含使表达融合剂结合配偶体的靶细胞离体与包含融合剂的融合体接触以诱导融合体与靶细胞膜的融合。在一些实施方案中,融合至融合体的靶细胞被重新引入至受试者中,例如通过静脉内。

[1158] 在一些实施方案中,表达融合剂结合配偶体的靶细胞被重新引入至受试者中,例如通过静脉内。在一些实施方案中,方法包含向受试者施用包含融合剂的融合体以允许融合体上的融合剂与靶细胞上的融合剂结合配偶体相互作用(例如结合),和融合体与靶细胞膜融合。

[1159] 在一些实施方案中,用表观遗传修饰剂,例如小分子表观遗传修饰剂处理靶细胞,以增加或减少内源性细胞表面分子(例如在一些实施方案,相对于靶细胞内源),例如融合剂结合配偶体,例如器官、组织或细胞靶向分子的表达,其中细胞表面分子为蛋白质、聚糖、脂质或低分子量分子。在一些实施方案中,靶细胞被遗传修饰以增加内源性细胞表面分子,例如融合剂结合配偶体,例如器官、组织或细胞靶向分子的表达,其中细胞表面分子为蛋白质、聚糖、脂质或低分子量分子。在一些实施方案中,遗传修饰可降低例如融合剂结合配偶体的内源性细胞表面分子的转录活化子的表达。

[1160] 在一些实施方案中,靶细胞被遗传修饰以表达(例如过表达)外源性细胞表面分子,例如融合剂结合配偶体,其中细胞表面分子为蛋白质、聚糖、脂质或低分子量分子。

[1161] 在一些实施方案中,靶细胞被遗传修饰以增加外源融合剂于细胞中的表达,例如转基因的递送。在一些实施方案中,将核酸,例如DNA、mRNA或siRNA转移至靶细胞,例如以增加或减少细胞表面分子(蛋白质、聚糖、脂质或低分子量分子)的表达。在一些实施方案中,核酸靶向融合剂结合配偶体的抑制子,例如shRNA或siRNA构建体。在一些实施方案中,核酸编码融合剂结合配偶体抑制子的抑制剂。

[1162] 使用方法

[1163] 本文所述的药物组合物的施用可通过口服、吸入、经皮或非经肠(包括静脉内、瘤内、腹膜内、肌肉内、腔内和皮下)施用。融合体可单独施用或被配制成药物组合物。

[1164] 融合体可以单位剂量组合物,如单位剂量经口、非经肠、经皮或吸入组合物的形式施用。此类组合物是通过混合制备的,并且适合于经口、吸入、经皮或非经肠施用,并且因此可呈片剂、胶囊、口服液体制剂、粉末、颗粒、口含剂、可重构散剂、可注射和可输注溶液或悬浮液或栓剂或气雾剂的形式。

[1165] 在一些实施方案中,经由本文所述的融合体组合物的膜蛋白有效载荷剂的递送可诱导或阻断细胞分化、去分化或转分化。靶哺乳动物细胞可以是前体细胞。或者,靶哺乳动物细胞可以是分化细胞,且细胞命运改变包括驱动去分化为多能前体细胞,或阻断此类去分化。在需要细胞命运改变的情况下,在使得诱导细胞命运改变的条件下将有效量的编码细胞命运诱导分子或信号的本文所述的融合体引入至靶细胞中。在一些实施方案中,本文所述的融合体适用于将细胞亚群从第一表型重编程为第二表型。此类重编程可为临时或永久的。任选地,重编程诱导靶细胞采取中间表型。

[1166] 还提供减少靶细胞群体中的细胞分化的方法。例如,在使得组合物减少前体细胞分化的条件下,使含有一种或多种前体细胞类型的靶细胞群体与本文所述的融合体组合物接触。在某些实施方案中,靶细胞群体含有哺乳动物受试者中的受损组织或受外科手术影响的组织。前体细胞为例如基质前体细胞、神经前体细胞或间充质前体细胞。

[1167] 包含膜蛋白有效载荷剂的本文所述的融合体组合物可用于将此类药剂递送至细胞组织或受试者。通过施用本文所述的融合体组合物来递送膜蛋白有效载荷剂可修饰细胞蛋白表达水平。在某些实施方案中,施用的引导一种或多种膜蛋白有效载荷剂(例如多肽或核酸)的上调(经由细胞中的表达、细胞中的递送或细胞内的诱导),其提供在递送膜蛋白有效载荷剂的细胞中基本上不存在或降低的功能活性。例如,缺失的功能活性可在本质上为酶的、结构的、信号传导或调节的。在相关实施方案中,施用的组合物引导一种或多种膜蛋白有效载荷剂的上调,其增加(例如协同地)在上调膜蛋白有效载荷剂的细胞中存在但基本上缺乏的功能活性。在相关实施方案中,施用的组合物引导一种或多种多肽的下调,其降低(例如协同地)在下调多肽的细胞中存在或上调的功能活性。在某些实施方案中,施用的组合物引导某些功能活性的上调和其他功能活性的下调。

[1168] 在实施方案中,融合体组合物介导对靶细胞的作用,且所述作用持续至少1、2、3、4、5、6或7天、2、3或4周、或1、2、3、6或12个月。在一些实施方案中(例如其中融合体组合物包含外源蛋白),所述作用持续小于1、2、3、4、5、6或7天、2、3或4周、或1、2、3、6或12个月。

[1169] 离体应用

[1170] 在实施方案中,将本文所述的融合体组合物离体递送至细胞或组织,例如人类细胞或组织。在实施方案中,组合物改善离体细胞或组织的功能,例如改善细胞活力、信号传导、呼吸或其他功能(例如本文所述的另一功能)。

[1171] 在一些实施方案中,将组合物递送至处于受伤状态(例如由于创伤、疾病、缺氧、缺血或其他损伤)的离体组织。

[1172] 在一些实施方案中,将组合物递送至离体移植物(例如组织外植体或用于移植的组织,例如人类静脉,肌肉骨骼移植物(如骨骼或肌腱)、角膜、皮肤、心脏瓣膜、神经;或分离或培养的器官,例如要向人类移植的器官,例如人类心脏、肝脏、肺脏、肾脏、胰脏、肠、胸腺、眼睛)。组合物可在移植之前、期间和/或之后递送至组织或器官。

[1173] 在一些实施方案中,组合物被递送、施用或与细胞(例如细胞制剂)接触。细胞制剂可为细胞疗法制剂(意图向人类受试者施用的细胞制剂)。在实施方案中,细胞制剂包含表达嵌合抗原受体(CAR),例如表达重组CAR的细胞。表达CAR的细胞可以是例如T细胞、自然杀手(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节T细胞。在实施方案中,细胞制剂为神经干细胞制剂。在实施方案中,细胞制剂为间充质干细胞(MSC)制剂。在实施方案中,细胞制剂为造血干细胞(HSC)制剂。在实施方案中,细胞制剂为胰岛细胞制剂。

[1174] 体内使用

[1175] 可向受试者,例如哺乳动物,例如人类施用本文所述的融合体组合物。在此类实施方案中,受试者可处于特定疾病或病况(例如本文所述的疾病或病况)的风险下、可具有所述疾病或病况的症状或可诊断患有或鉴别为患有所述疾病或病况。在一个实施方案中,受试者患有癌症。在一个实施方案中,受试者患有传染性疾病。

[1176] 在一些实施方案中,融合体来源来自施用融合体组合物的相同受试者。在其他实施方案中,其为不同的。例如,融合体和受体组织的来源可为自体的(来自相同受试者)或异源的(来自不同受试者)。在任一情况下,本文所述的融合体组合物的供体组织可为与受体组织不同的组织类型。例如,供体组织可为肌肉组织且受体组织可为结缔组织(例如脂肪组织)。在其他实施方案中,供体组织和受体组织可为相同或不同类型,但来自不同器官系统。

[1177] 本文所述的融合体组合物可向患有癌症、自身免疫疾病、传染病、代谢疾病、神经退化性疾病或遗传病(例如酶缺乏)的受试者施用。在一些实施方案中,受试者的组织需要再生。

[1178] 在一些实施方案中,将治疗有效量的本文所述的融合体组合物施用于受试者。在一些实施方案中,物质的治疗有效量是当施用于患有或易患疾病、病症和/或状况的受试者时足以治疗和/或延缓疾病、病症和/或状况发作的量。例如,在实施方案中,用于治疗疾病、病症和/或状况的配制剂中的融合体的有效量是减轻、改善、缓解、抑制疾病、病症和/或状况的一种或多种症状或特征,延迟其发作,降低其严重性和/或降低其发生率的量。

[1179] 在一些实施方案中,用融合体组合物治疗受试者。在一些实施方案中,治疗部分或完全减轻、改善、缓解、抑制特定疾病、病症和/或状况的一种或多种症状、特征和/或原因,延迟其发作,降低其严重性和/或降低其发生率。在一些实施方案中,可以对已经被诊断患有相关疾病、病症和/或状况的受试者进行治疗。在一些实施方案中,可以对已知具有一种或多种易感因素的受试者进行治疗,所述易感因素在统计学上与相关疾病、病症和/或状况发展的风险增加相关。在一些实施方案中,治疗部分或完全改善了相关疾病、病症和/或状况的根本原因。

[1180] 在一些实施方案中,融合体组合物有效治疗疾病,例如癌症。在一些实施方案中,与施用前受试者中癌细胞的数量相比,融合体组合物有效减少受试者中癌细胞的数量。在一些实施方案中,与未治疗的预期疾病进程相比,融合体组合物有效减少受试者中癌细胞的数量。在一些实施方案中,受试者在施用融合体组合物后经历完全应答或部分应答。

[1181] 在一些实施方案中,融合体与抑制膜融合的蛋白质的抑制剂共同施用。举例来说,Suppressyn为抑制细胞-细胞融合的人类蛋白质(Sugimoto et al., "A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion" Scientific Reports 3: 1462DOI:10.1038/srep01462)。因此,在一些实施方案中,融合体与sypressyn的抑制剂,例如siRNA或抑制抗体共同施用。

[1182] 非人类应用

[1183] 本文所述的组合物还可用于类似地调节包括但不限于以下的多种其他生物体的细胞或组织功能或生理技能:农场或役用动物(马、牛、猪、鸡等)、宠物或动物园动物(猫、狗、蜥蜴、鸟类、狮子、老虎和熊等)、水产养殖动物(鱼、蟹、虾、牡蛎等)、植物物种(树木、农作物、观赏花卉等)、发酵物种(酵母等)。本文所述的融合体组合物可由此类非人类来源制成且向非人类靶细胞或组织或受试者施用。

[1184] 融合体组合物对于靶标可为自体的、同种异体的或异种的。

[1185] 本文引用的所有参考文献和出版物都以引用的方式并入本文中。

[1186] 提供以下实施例以进一步说明本发明的一些实施方案,但并不打算限制本发明的范围;通过其示例性性质应了解,可替代地使用本领域技术人员已知的其他程序、方法或技术。

实施例

[1187] 实施例1.通过化学处理(PEG)产生去核的促融合细胞

[1188] 用0.25%胰蛋白酶使表达Mito-DsRed(线粒体特异性靶向染料)的供体HeLa细胞

进行胰蛋白酶处理、收集、以500xg旋转5分钟、在PBS中洗涤一次且计数。随后将 10×10^6 个细胞再悬浮于补充有10 μ g/ml细胞松弛素-B的3ml含12.5%聚蔗糖(ficoll)的完全MEM- α (+10%FBS、+1%青霉素/链霉素、+谷氨酰胺)中15分钟。为了使细胞去核,将其转移至由以下聚蔗糖级分(从上到下)组成的不连续聚蔗糖梯度液:2mL 12.5%聚蔗糖、0.5mL 15%聚蔗糖、0.5mL 16%聚蔗糖、2mL 17%聚蔗糖梯度、2mL 25%聚蔗糖。所有聚蔗糖梯度级分在补充有10 μ g/ml细胞松弛素-B的完全DMEM中制成。将梯度在37 $^{\circ}$ C下在Beckman SW-40超速离心机,Ti-70转子上以107971xg旋转1小时。在离心后,从12.5%、15%、16%和1/2的17%聚蔗糖级分收集去核的HeLa细胞且再悬浮于完全DMEM(+10%FBS、+1%青霉素/链霉素、+谷氨酰胺)中,且以500xg旋转5分钟以制成集结粒。将去核的Mito-DsRed供体细胞在DMEM中洗涤2次。同时,使表达Mito-GFP(线粒体特异性靶向染料)的受体HeLa细胞进行胰蛋白酶处理、计数且准备融合。

[1189] 为了融合,将去核的Mito-DsRed供体HeLa细胞与Mito-GFP受体HeLa细胞在37 $^{\circ}$ C下以1:1比率(各200,000个)在50%聚乙二醇溶液(50%w/v PEG制备于完全DMEM中,不含10%DMSO)中组合1分钟。随后将细胞在10mL完全DMEM中洗涤3次且以50k个细胞/象限的密度涂铺于35mm玻璃底象限成像培养皿上,其中每个象限的面积为1.9cm 2 。

[1190] 实施例2.通过化学处理(PEG)产生有核的促融合细胞

[1191] 用0.25%胰蛋白酶使表达Mito-DsRed(线粒体特异性靶向染料)的供体HeLa细胞进行胰蛋白酶处理、收集、以500xg旋转5分钟、在PBS中洗涤一次且计数。随后将 2×10^6 个细胞再悬浮于完全DMEM(+10%FBS、+1%青霉素/链霉素、+谷氨酰胺)中、计数且准备融合。

[1192] 将Mito-DsRed供体细胞在DMEM中洗涤3次。同时,使表达Mito-GFP(线粒体特异性靶向染料)的受体HeLa细胞进行胰蛋白酶处理、计数且准备融合。

[1193] 为了融合,将Mito-DsRed供体HeLa细胞与Mito-GFP受体HeLa细胞在37 $^{\circ}$ C下以1:1比率(各200,000个)在50%聚乙二醇溶液(50%w/v PEG制备于完全DMEM中,不含10%DMSO)中组合1分钟。随后将细胞在10ml完全DMEM中洗涤3次且以50k个细胞/象限的密度涂铺于35mm玻璃底象限成像培养皿上,其中每个象限的面积为1.9cm 2 。

[1194] 实施例3.产生表达外源融合剂的HeLa细胞

[1195] 此实施例描述产生表达外源融合剂的组织培养细胞。以下实施例同样适用于任何基于蛋白质的融合剂且同样适用于产生初级细胞(悬浮液中或粘附细胞)和组织。在某些情况下,融合剂对用于诱导融合(描述为融合剂和融合剂结合配偶体)。

[1196] 将融合剂基因,融合失败1(fusion failure 1, EFF-1)克隆至pIRES2-AcGFP1载体(Clontech)中,且接着使用Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen)将此构建体转染至HeLa细胞(CCL-2 $^{\text{TM}}$, ATCC)中。将融合剂结合配偶体基因,锚细胞融合失败1(AFF-1)克隆至pIRES2 DsRed-Express 2载体(Clontech)中,且接着使用Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen)将此构建体转染至HeLa细胞(CCL-2 $^{\text{TM}}$, ATCC)中。将转染的HeLa细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下保持于补充有GlutaMAX(GIBCO)、10%胎牛血清(GIBCO)和500mg/mL博莱霉素的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)中。通过分选荧光活化细胞分选(FACS)分离表达EFF-1的细胞,以获得表达EFF-1融合剂的GFP+HeLa细胞的纯群体。通过分选荧光活化细胞分选(FACS)分离表达AFF-1的细胞,以获得表达AFF-1融合剂结合配偶体的DSRED+HeLa细胞的纯群体。

[1197] 实施例4.通过化学增强的促融合去核细胞递送细胞器

[1198] 将如实施例1中所述产生和融合的促融合细胞(Mito-DsRed供体去核细胞和Mito-GFP受体HeLa细胞)在沉积于成像培养皿中之后24小时在Zeiss LSM 780倒置共聚焦显微镜上以63倍放大率成像。对仅单独表达Mito-DsRed和单独表达Mito-GFP的细胞分别成像以配置采集设置,以此方式确保在同时存在和采集Mito-DsRed和Mito-GFP的条件下,两个通道之间没有信号重叠。以完全无偏的方式选择十个所关注区域,唯一的标准是每个ROI内含有最少10个细胞,使得最少100个细胞可用于下游分析。如果这些图像中的给定像素的任一通道(mito-DsRed和mito-GFP)的强度大于所有三个ROI中每个通道的最大强度值的10%,则将其确定为线粒体阳性。

[1199] 基于以下标准鉴别细胞器递送的融合事件:基于上文指示的阈限,细胞中>50%的线粒体(通过为mito-GFP+或mito-Ds-Red+的所有像素鉴别)对于mitoDs-Red和mito-GFP均呈阳性,表明含有这些蛋白质的细胞器(在此情况下为线粒体)已被递送、融合且其内容物被掺混。在24小时的时间点,多个细胞展现通过融合的阳性细胞器递送,如图7中所指示。这是供体与受体HeLa细胞之间通过融合的阳性细胞器递送的图像。以白色指示的细胞内区域指示供体与受体线粒体之间的重叠。灰色的细胞内区域指示供体与受体细胞器不重叠的区域。

[1200] 实施例5.通过化学增强的促融合有核细胞递送细胞器

[1201] 将如实施例2中所述产生和组合的促融合细胞(Mito-DsRed供体细胞和Mito-GFP受体HeLa细胞)在沉积于成像培养皿中之后24小时在Zeiss LSM 780倒置共聚焦显微镜上以63倍放大率成像。对仅单独表达Mito-DsRed和单独表达Mito-GFP的细胞分别成像以配置采集设置,以此方式确保在同时存在和采集Mito-DsRed和Mito-GFP的条件下,两个通道之间没有信号重叠。以完全无偏的方式选择十个所关注区域,唯一的标准是每个ROI内含有最少10个细胞,使得最少100个细胞可用于下游分析。如果这些图像中的给定像素的任一通道(mito-DsRed和mito-GFP)的强度大于所有三个ROI中每个通道的最大强度值的20%,则将其确定为线粒体阳性。

[1202] 基于以下标准鉴别细胞器递送的融合事件:基于上文指示的阈限,细胞中>50%的线粒体(通过为mito-GFP+或mito-Ds-Red+的所有像素鉴别)对于mitoDs-Red和mito-GFP均呈阳性,表明含有这些蛋白质的细胞器(在此情况下为线粒体)已被递送、融合且其内容物被掺混。在24小时的时间点,多个细胞展现通过融合的阳性细胞器递送,如图8中所指示。这是供体与受体HeLa细胞之间通过融合的阳性细胞器递送的图像。以白色指示的细胞内区域指示供体与受体线粒体之间的重叠。灰色的细胞内区域指示供体与受体细胞器不重叠的区域。

[1203] 实施例6.通过蛋白质增强的促融合去核细胞递送线粒体

[1204] 将如实施例3中所述产生和组合的促融合细胞在沉积于成像培养皿中之后24小时在Zeiss LSM 780倒置共聚焦显微镜上以63倍放大率成像。对仅单独表达Mito-DsRed和单独表达Mito-GFP的细胞分别成像以配置采集设置,以此方式确保在同时存在和采集Mito-DsRed和Mito-GFP的条件下,两个通道之间没有信号重叠。以完全无偏的方式选择十个所关注区域,唯一的标准是每个ROI内含有最少10个细胞,使得最小数目个细胞可用于下游分析。如果这些图像中的给定像素的任一通道(mito-DsRed和mito-GFP)的强度大于所有三个

ROI中每个通道的最大强度值的10%，则将其确定为线粒体阳性。

[1205] 将基于以下标准鉴别细胞器递送的融合事件：基于上文指示的阈限，细胞中>50%的线粒体(通过为mito-GFP+或mito-Ds-Red+的所有像素鉴别)对于mitoDs-Red和mito-GFP均呈阳性，其将表明含有这些蛋白质的细胞器(在此情况下为线粒体)被递送、融合且其内容物被掺混。在24小时的时间点，预期多个细胞展现通过融合的阳性细胞器递送。

[1206] 实施例7：通过核酸电穿孔产生融合体

[1207] 此实施例描述通过用编码融合剂的核酸(例如mRNA或DNA)对细胞或囊泡进行电穿孔来产生融合体。

[1208] 将包括嘌呤霉素抗性基因的开放阅读框架连同克隆片段的开放阅读框架的转座酶载体(System Biosciences, Inc.) (例如来自水泡性口炎病毒的糖蛋白[VSV-G], Oxford Genetics#0G592)使用电穿孔器(Amaxa)和293T细胞系特异性核转染试剂盒(Lonza)电穿孔至293Ts中。

[1209] 在含有20%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中用1μg/μL嘌呤霉素选择3-5天后，细胞接着用1×PBS，冰冷的溶解缓冲液(150mM NaCl、0.1% Triton X-100、0.5%脱氧胆酸钠、0.1% SDS、50mM Tris-HCl, pH 8.0和蛋白酶抑制剂混合液(Abcam, ab201117))洗涤，超声处理3次，每次10-15秒，且以16,000x g离心20分钟。用特异性针对VSV-G的探针对回收的上清液级分进行蛋白质印迹，以确定来自自由稳定转染的细胞或对照细胞制备的融合体的VSV-G的非膜特异性浓度且相比于VSV-G蛋白的标准。

[1210] 在实施方案中，来自稳定转染的细胞的融合体将比从未被稳定转染的细胞产生的融合体具有更多VSV-G。

[1211] 实施例8：通过蛋白质电穿孔产生融合体

[1212] 此实施例描述融合剂电穿孔以产生融合体。

[1213] 使用电穿孔转染系统(Thermo Fisher Scientific)将大致 5×10^6 个细胞或囊泡用于电穿孔。为了形成预混液，将24μg纯化的蛋白质融合剂添加至再悬浮缓冲液(提供于试剂盒中)。将混合物在室温下温育10分钟。同时，将细胞或囊泡转移至无菌试管中且在 $500 \times g$ 下离心5分钟。吸出上清液且将集结粒再悬浮于1mL不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS中。具有融合剂的缓冲液接着用于再悬浮细胞或囊泡的集结粒。细胞或囊泡悬浮液还用于优化条件，其在脉冲电压、脉冲宽度和脉冲数方面不同。在电穿孔之后，将具有融合剂的电穿孔细胞或囊泡用PBS洗涤，再悬浮于PBS中，且保持于冰上。

[1214] 参见例如Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015。

[1215] 实施例9：通过囊泡形成和离心产生和分离融合体

[1216] 此实施例描述通过囊泡化和离心来产生和分离融合体。这是可分离融合体的方法之一。

[1217] 如下制备融合体。将大致 4×10^6 个HEK-293T细胞在10cm培养皿中接种于完全培养基(DMEM+10%FBS+Pen/Strep)中。在接种之后一天，将15μg融合剂表达质粒或病毒递送至细胞。在融合剂表达的足够时段之后，将培养基用补充有100μM ATP的新鲜培养基小心地替换。在融合剂表达之后48-72小时收获上清液，通过过滤通过0.45μm过滤器澄清，且在150，

000×g下超速离心1小时。将粒化的材料再悬浮于冰冷的PBS中过夜。将融合体再悬浮于所需的缓冲液中以进行实验。

[1218] 参见例如Mangeot et al., *Molecular Therapy*, vol.19no.9,1656-1666, Sept.2011

[1219] 实施例10:产生和分离巨质膜融合体

[1220] 此实施例描述通过囊泡化和离心来产生和分离融合体。这是可分离融合体的方法之一。如下制备融合体。

[1221] 简单来说,将表达融合剂的HeLa细胞在缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、2mM CaCl₂,pH 7.4)中洗涤两次,再悬浮于溶液(1mM DTT、12.5mM三聚甲醛和1mM N-乙基哌丁烯二酰亚胺于GPMV缓冲液中)中,且在37℃下温育1小时。通过首先在100×g下离心10分钟来去除细胞,且接着在4℃下在20,000×g下收获融合体1小时而使融合体从细胞澄清。将融合体再悬浮于所需的缓冲液中以进行实验。

[1222] 参见例如Sezgin E et al. *Elucidating membrane structure and protein behavior using giant membrane plasma vesicles*. *Nat. Protocols*.7(6):1042-51 2012。

[1223] 实施例11:产生和分离融合体影

[1224] 此实施例描述通过低渗处理和离心来产生和分离融合体。这是可产生融合体的方法之一。

[1225] 首先,主要通过使用低渗处理将融合体从表达融合剂的间充质干细胞(10⁹个细胞)分离,使得细胞破裂且形成融合体。细胞再悬浮于低渗溶液Tris-镁缓冲液(TM,例如在4℃下为pH 7.4或pH 8.6,用HCl进行pH调节)中。通过相差显微镜检查来监测细胞溶胀。一旦细胞溶胀且形成融合体,将悬浮液置于均质机中。通常,约95%细胞破裂为足够的,如通过细胞计数和标准AOPI染色所测量。接着将膜/融合体置于蔗糖(0.25M或更高)中进行保存。或者,融合体可由本领域中已知溶解细胞的其他方法形成,如轻度超声处理(*Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*;1979, Aug, 77(8)5-13; PMID:496657)、冻融(*Nature*.1999, Dec 2; 402(6761):551-5; PMID:10591218)、弗氏压碎(French-press)(*Methods in Enzymology*, Volume 541, 2014, Pages 169-176; PMID:24423265)、针传代(www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/nuclear-protein-extraction.html)或在含清洁剂的溶液中增溶(www.thermofisher.com/order/catalog/product/89900)。

[1226] 为了避免粘附,将融合体置于塑料管中且离心。产生层压的集结粒,其中最顶部的浅灰色薄层包括大多融合体。但是,整个集结粒被加工以增加产率。可重复离心(例如在4℃下以3,000rpm持续15分钟)和洗涤(例如20体积的Tris镁/TM-蔗糖pH 7.4)。

[1227] 在下一步中,通过以不连续的蔗糖密度梯度浮选来分离融合体级分。洗涤的集结粒残留少量过剩的上清液,所述集结粒现在包括融合体、细胞核和不完全破裂的全细胞。向悬浮液添加另外的含60%w/w蔗糖的TM, pH 8.6,以在折射计上得到45%蔗糖的读数。在此步骤之后,所有溶液均为TM pH 8.6。将15mL悬浮液置于SW-25.2硝酸纤维素管中且通过分别添加40%和35%w/w蔗糖的15mL层,且接着添加5mL TM-蔗糖(0.25M)而在悬浮液上形成不连续梯度。接着将样品在4℃下以20,000rpm离心10分钟。细胞核沉淀物形成集结粒,在

40%-45%界面收集不完全破裂的全细胞,且在35%-40%界面收集融合体。收集且合并来自多个管的融合体。参见例如国际专利公开案W02011024172A2。

[1228] 实施例12:通过挤压产生融合体

[1229] 此实施例描述通过挤压穿过膜制造融合体。

[1230] 简单来说,表达融合剂的造血干细胞在37°C悬浮液中,在含有蛋白酶抑制剂混合液(Set V,Calbiochem 539137-1ML)的无血清培养基中的密度为 1×10^6 个细胞/毫升。用鲁尔锁注射器吸出细胞且一次穿过一次性的5mm针筒过滤器进入清洁的管中。如果膜结垢且变得堵塞,则将其放在一边且附接新的过滤器。在整个细胞悬浮液穿过过滤器之后,使5mL无血清培养基穿过用于所述过程的所有过滤器,以洗涤通过过滤器的任何残留物质。溶液接着与挤出的融合体在滤液中组合。

[1231] 融合体可通过遵循相同方法以介于5mm至0.2mm范围内的越来越小的过滤器孔隙尺寸继续挤压而使直径进一步减小。当完成最终挤压时,悬浮液通过离心(所需的时间和速度因尺寸而异)粒化且再悬浮于培养基中。

[1232] 另外,此过程可以使用肌动蛋白细胞骨架抑制剂来补充,以减少现有细胞骨架结构对挤压的影响。简单来说,将 1×10^6 个细胞/毫升悬浮液在具有500nM拉春库林B(ab144291,Abcam,Cambridge,MA)的无血清培养基中温育且在37°C下在5%CO₂存在下温育30分钟。在温育之后,添加蛋白酶抑制剂混合液且将细胞抽吸至鲁尔锁注射器中,如先前所述地进行挤压。

[1233] 将融合体粒化且在PBS中洗涤一次以去除细胞骨架抑制剂,随后再悬浮于培养基中。

[1234] 实施例13:通过用蛋白质的化学处理产生融合体

[1235] 此实施例描述化学介导的融合剂递送以产生融合体。大致 5×10^6 个细胞或囊泡用于化学介导的融合剂递送。将细胞或囊泡悬浮于50 μ L Opti-MEM培养基中。为了形成预混液,将24 μ g纯化的蛋白质融合剂与25 μ L Opti-MEM培养基混合,接着添加25 μ L含有2 μ L脂质转染试剂3000的Opti-MEM。通过轻轻地旋转板且在37°C下温育6小时来混合细胞或囊泡和融合剂溶液,使得融合剂将被并入细胞或囊泡膜中。接着将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中且保持于冰上。

[1236] 另外参见Liang et al.,Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection,Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015。

[1237] 实施例14:通过用含融合剂的脂质体处理来产生融合体

[1238] 此实施例描述脂质体介导的递送融合剂至源细胞以产生融合体。大致 5×10^6 个细胞或囊泡用于脂质体介导的融合剂递送。将细胞或囊泡悬浮于50 μ L Opti-MEM培养基中。融合剂蛋白在正辛基b-D-吡喃葡萄糖苷存在下从细胞纯化。正辛基b-D-吡喃葡萄糖苷为用于溶解整合膜蛋白的温和的清洁剂。接着通过混合正辛基b-D-吡喃葡萄糖苷悬浮的蛋白质与用正辛基b-D-吡喃葡萄糖苷预饱和的大(400nm直径)单层囊泡(LUV),接着去除正辛基b-D-吡喃葡萄糖苷而将融合剂蛋白复原成LUV,如Top et al.,EMBO 24:2980-2988,2005中所述。为了形成预混液,将含有24 μ g总融合剂蛋白的大量脂质体与50 μ L Opti-MEM培养基混合。接着将脂质体和源细胞或囊泡的溶液合并,且通过轻轻地旋转板且在允许含融合剂的

脂质体和源细胞或囊泡融合的条件下在37°C下温育6小时来混合整个溶液,使得融合剂蛋白将被并入源细胞或囊泡膜中。接着将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中且保持于冰上。另外参见Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208:44-53, 2015。

[1239] 实施例15:分离从细胞自由释放的促融合微囊泡

[1240] 此实施例描述通过离心分离融合体。这是可分离融合体的方法之一。

[1241] 通过差速离心从表达融合剂的细胞分离融合体。首先通过在 $>100,000 \times g$ 下超速离心1小时来使培养基(DMEM+10%胎牛血清)澄清不含小粒子。澄清的培养基接着用于生长表达融合剂的小鼠胚胎成纤维细胞。通过以 $200 \times g$ 离心10分钟而使细胞与培养基分离。收集上清液且依序以 $500 \times g$ 离心10分钟两次、以 $2,000 \times g$ 离心15分钟一次、以 $10,000 \times g$ 离心30分钟一次以及以 $70,000 \times g$ 离心60分钟一次。在最终离心步骤期间将自由释放的融合体粒化、再悬浮于PBS中且以 $70,000 \times g$ 再粒化。将最终集结粒再悬浮于PBS中。

[1242] 另外参见Wubbolts R et al. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: Potential Implications for their Function and Multivesicular Body Formation. *J. Biol. Chem.* 278:10963-10972 2003。

[1243] 实施例16:融合体的物理去核

[1244] 此实施例描述通过细胞骨架灭活和离心来对融合体进行去核。这是可修饰融合体的方法之一。

[1245] 从表达融合剂的哺乳动物初级或永生化细胞系分离融合体。通过用肌动蛋白骨架抑制剂处理和超速离心来使细胞去核。简单来说,收集C2C12细胞、粒化且再悬浮于含有12.5%Ficoll 400 (F2637, Sigma, St. Louis MO) 和500nM拉春库林B (ab144291, Abcam, Cambridge, MA) 的DMEM中且在37°C+5%CO₂下温育30分钟。将悬浮液小心地层铺到含有增加浓度的DMEM于Ficoll 400中的溶液(15%、16%、17%、18%、19%、20%, 每层3mL)的超速离心管中,所述溶液已在5%CO₂存在下在37°C下平衡过夜。将Ficoll梯度液在37°C下在Ti-70转子(Beckman-Coulter, Brea, CA)中以32,300RPM旋转60分钟。在超速离心之后,将发现于16-18%的聚蔗糖的融合体去除,用DMEM洗涤且再悬浮于DMEM中。

[1246] 如实施例35中所述地关于核含量用Hoechst 33342染色,接着使用流式细胞测量术和/或将进行成像以确认细胞核的射出。

[1247] 实施例17:通过照射修饰融合体

[1248] 以下实施例描述用 γ 照射修饰融合体。不受理论束缚, γ 照射可引起DNA中的双链断裂且驱动细胞经历凋亡。

[1249] 首先,在汇合密度以下在组织培养瓶或板上的单层中培养表达融合剂的细胞(例如通过培养或涂铺细胞)。接着从汇合瓶中去掉培养基,用不含Ca²⁺和Mg²⁺的HBSS冲洗细胞,且使其进行胰蛋白酶处理以从培养基质去除细胞。接着将细胞集结粒再悬浮于10ml不含青霉素/链霉素的组织培养基中且转移至100mm皮氏培养皿(Petri dish)中。集结粒中的细胞数应等于将获自150cm²烧瓶上的10-15次汇合MEF培养物的细胞数。细胞接着暴露于来自 γ 辐射源的4000rads以产生融合体。接着洗涤融合体且再悬浮于待使用的最终缓冲液或培养基中。

[1250] 实施例18:通过化学处理来修饰融合体

[1251] 以下实施例描述用丝裂霉素C处理来修饰融合体。不受任何具体理论束缚,丝裂霉素C处理通过灭活细胞周期来修饰融合体。

[1252] 首先,在汇合密度下从组织培养瓶或板中的单层培养表达融合剂的细胞(例如通过培养或涂铺细胞)。将1mg/mL丝裂霉素C储备溶液添加至培养基以达到10 μ g/mL的最终浓度。接着将板放回到温育箱中2至3小时。接着从汇合瓶中去掉培养基,用不含Ca²⁺和Mg²⁺的HBSS冲洗细胞,且使其进行胰蛋白酶处理以从培养基质去除细胞。接着洗涤细胞且再悬浮于待使用的最终缓冲液或培养基中。

[1253] 参见例如Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation, Current Protocols in Molecular Biology. David A. Conner 2001。

[1254] 实施例19:融合体中缺乏转录活性

[1255] 此实施例定量相比于用于融合体产生的亲本细胞(例如源细胞),融合体中的转录活性。在一些实施方案中,相比于亲本细胞(例如源细胞),融合体中的转录活性将为较低或不存在的。

[1256] 融合体为递送治疗剂的基础。可以高效率递送至细胞或局部组织环境的治疗剂(如miRNA、mRNA、蛋白质和/或细胞器)可用于调节在受体组织中通常不活跃或在病理性低或高水平下不活跃的途径。在一些实施方案中,融合体不能转录,或融合体的转录活性小于其亲本细胞的观察结果将证实已充分发生了核物质的去除。

[1257] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。接着在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下持续1小时将足够数量的融合体和用于产生融合体的亲本细胞在6孔低附着多孔板中涂铺至含有20%胎牛血清、1 \times 青霉素/链霉素和可荧光标记的炔烃-核苷EU的DMEM中。对于阴性对照,也将足够数量的融合体和亲本细胞在多孔板中涂铺于含有20%胎牛血清、1 \times 青霉素/链霉素但不具有炔烃-核苷EU的DMEM中。

[1258] 在1小时温育之后,遵循制造商的成像试剂盒(ThermoFisher Scientific)说明书对样品进行处理。将包括阴性对照的细胞和融合体样品用1 \times PBS缓冲液洗涤三次且再悬浮于1 \times PBS缓冲液中且通过流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA),使用488nm氩气激光激发,和530 \pm 30nm发射进行分析。BD FACSDiva软件用于采集和分析。将光散射设定为线性增益,且将荧光通道设定为对数标度,在每种条件下分析最少10,000个细胞。

[1259] 在一些实施方案中,由于省略了炔烃-核苷EU,阴性对照中如根据530 \pm 30nm发射所测量的转录活性将为零。在一些实施方案中,相比于亲本细胞,融合体的转录活性将为小于约70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更小。

[1260] 另外参见Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Oct 14; 105(41):15779-84. doi: 10.1073/pnas.0808480105. Epub 2008 Oct 7。

[1261] 实施例20:缺乏DNA复制或复制活性

[1262] 此实施例定量融合体中的DNA复制。在一些实施方案中,相比于细胞,融合体将以低速率复制DNA。

[1263] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。通过并入可荧光标记的核苷酸(ThermoFisher Scientific#C10632)来评估融合体和亲本细胞DNA复制活性。在用二甲亚砜制备EdU储备溶液之后,将融合体和相等数目的细胞与EdU以10 μ M的最终浓度一起温育2小时。样品接着使用3.7%PFA固定15分钟,用1 \times PBS缓冲液,pH 7.4洗涤且在0.5%清洁剂

于1×PBS缓冲液,pH 7.4中的溶液中渗透15分钟。

[1264] 在渗透之后,将悬浮于含有0.5%清洁剂(PBS缓冲液)中的融合体和细胞用1×PBS缓冲液,pH 7.4洗涤且在21℃下在反应混合液、1×PBS缓冲液、CuSO₄(组分F)、叠氮化物-荧光剂488、1×反应缓冲液添加剂中温育30分钟。

[1265] 用与上文相同地处理但在1×反应混合液中没有叠氮化物-荧光剂488的样品制成了融合体和细胞DNA复制活性的阴性对照。

[1266] 接着将细胞和融合体样品洗涤且再悬浮于1×PBS缓冲液中且通过流式细胞测量术分析。用FACS细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)以488nm氩气激光激发进行流式细胞测量术,且收集530+/-30nm发射光谱。FACS分析软件用于采集和分析。将光散射设定为线性增益,且将荧光通道设定为对数标度,在每种条件下分析最少10,000个细胞。基于每个样品中叠氮化物-荧光剂488的中值强度来计算相对DNA复制活性。在正向和侧向散射通道中捕获所有事件(或者,可应用门来仅选择融合体群体)。通过从融合体的中值荧光强度值减去对应阴性对照样品的中值荧光强度值来确定融合体的标准化荧光强度值。接着将融合体样品的标准化的相对DNA复制活性相对于对应有核细胞样品进行标准化,以产生DNA复制活性的定量测量值。

[1267] 在一些实施方案中,融合体的DNA复制活性低于亲本细胞。

[1268] 还参见Salic, 2415-2420, doi:10.1073/pnas.0712168105。

[1269] 实施例21:用核酸货物电穿孔以修饰融合体

[1270] 此实施例描述用核酸货物对融合体进行电穿孔。

[1271] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。将大致10⁹个融合体和1μg核酸(例如RNA)在电穿孔缓冲液(1.15mM磷酸钾pH 7.2、25mM氯化钾、60%碘克沙醇w/v于水中)中混合。使用单一4mm比色管,使用电穿孔系统(BioRad, 165-2081)对融合体进行电穿孔。将融合体和核酸在400V、125μF和∞欧姆下电穿孔,且将比色管立即转移至冰上。在电穿孔之后,将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中,且保持于冰上。

[1272] 参见例如Kamerkar et al., Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, Nature, 2017

[1273] 实施例22:用蛋白质货物电穿孔以修饰融合体

[1274] 此实施例描述用蛋白质货物对融合体进行电穿孔。

[1275] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。使用电穿孔转染系统(Thermo Fisher Scientific)将大致5×10⁶个融合体用于电穿孔。为了形成预混液,将24μg纯化的蛋白质货物添加至再悬浮缓冲液(提供于试剂盒中)。将混合物在室温下温育10分钟。同时,将融合体转移至无菌试管中且在500×g下离心5分钟。吸出上清液且将集结粒再悬浮于1mL不含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS中。接着将具有蛋白质货物的缓冲液用于再悬浮融合体的集结粒。融合体悬浮液接着用于优化条件,其在脉冲电压、脉冲宽度和脉冲数方面不同。在电穿孔之后,将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中,且保持于冰上。

[1276] 参见例如Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015。

[1277] 实施例23:化学处理融合体以用核酸货物修饰

[1278] 此实施例描述通过化学处理将核酸货物装载至融合体中。

[1279] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。通过在4℃下以10,000g离心5分钟使大致 10^6 个融合体粒化。接着将粒化的融合体再悬浮于具有20 μ g DNA的TE缓冲液(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA)中。将融合体:DNA溶液用温和的清洁剂处理以提高DNA在整个融合体膜中的渗透率(试剂B, Cosmo Bio Co., LTD, 目录号ISK-GN-001-EX)。将溶液再次离心且将集结粒再悬浮于具有带正电的肽,如硫酸鱼精蛋白的缓冲液中,以增加载有DNA的融合体与靶受体细胞之间的亲和力(试剂C, Cosmo Bio Co., LTD, 目录号ISK-GN-001-EX)。在DNA装载之后,将装载的融合体在使用之前保持于冰上。

[1280] 另外参见Kaneda, Y., et al., New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets*, 2003

[1281] 实施例24: 化学处理融合体以用蛋白质货物修饰

[1282] 此实施例描述通过化学处理将蛋白质货物装载至融合体中。

[1283] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。通过在4℃下以10,000g离心5分钟使大致 10^6 个融合体粒化。接着将粒化的融合体再悬浮于具有带正电的肽,如硫酸鱼精蛋白的缓冲液中,以增加融合体与货物蛋白质之间的亲和力(试剂A, Cosmo Bio Co., LTD, 目录号ISK-GN-001-EX)。随后,将10 μ g货物蛋白质添加至融合体溶液,接着添加温和的清洁剂以增加蛋白质在整个融合体膜中的渗透率(试剂B, Cosmo Bio Co., LTD, 目录号ISK-GN-001-EX)。将溶液再次离心且将集结粒再悬浮于具有带正电的肽,如硫酸鱼精蛋白的缓冲液中,以增加装载有蛋白质的融合体与靶受体细胞之间的亲和力(试剂C, Cosmo Bio Co., LTD, 目录号ISK-GN-001-EX)。在蛋白质装载之后,将装载的融合体在使用之前保持于冰上。

[1284] 另外参见Yasouka, E., et al., Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. *J. Mol. Med.*, 2007

[1285] 实施例25: 转染融合体以用核酸货物修饰

[1286] 此实施例描述将核酸货物转染至融合体中。通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。

[1287] 5×10^6 个融合体维持于Opti-Mem中。将0.5 μ g核酸与25 μ L Opti-MEM培养基混合,接着添加25 μ L含有2 μ L脂质转染试剂2000的Opti-MEM。将核酸、Opti-MEM和脂质转染试剂的混合物维持在室温下15分钟,接着添加至融合体。整个溶液通过轻轻地旋转板且在37℃下温育6小时而混合。接着将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中且保持于冰上。

[1288] 另外参见Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208:44-53, 2015。

[1289] 实施例26: 转染融合体以用蛋白质货物修饰

[1290] 此实施例描述将蛋白质货物转染至融合体中。

[1291] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。 5×10^6 个融合体维持于Opti-Mem中。将0.5 μ g纯化蛋白与25 μ L Opti-MEM培养基混合,接着添加25 μ L含有2 μ L脂质转染试剂3000的Opti-MEM。将蛋白质、Opti-MEM和脂质转染试剂的混合物维持在室温下15分

钟,接着添加至融合体。整个溶液通过轻轻地旋转板且在37C下温育6小时而混合。接着将融合体用PBS洗涤,再悬浮于PBS中且保持于冰上。

[1292] 另外参见Liang et al.,Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection,Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015。

[1293] 实施例27:具有脂质双层结构的融合体

[1294] 此实施例描述融合体的组合物。在一些实施方案中,融合体组合物将包含在中心具有内腔的脂质双层结构。

[1295] 不希望受理论束缚,融合体的脂质双层结构促进与靶细胞的融合,且允许融合体装载不同的治疗剂。

[1296] 使用先前实施例中所述的方法新制融合体。阳性对照为天然细胞系(HEK293),且阴性对照为冷DPBS和膜破裂的HEK293细胞制剂,其已穿过36号针50次。

[1297] 将样品在埃彭道夫管(Eppendorf tube)中短暂离心,且小心地去除上清液。接着将预温热的固定液(2.5%戊二醛于0.05M二甲胍酸盐与0.1M NaCl的缓冲液,pH 7.5中;使用前保持于37°C下30分钟)添加至样品集结粒且保持在室温下20分钟。在固定之后,将样品用PBS洗涤两次。将四氧化锇溶液添加至样品集结粒且温育30分钟。在用PBS冲洗一次之后,添加30%、50%、70%和90%己二醇且涡旋洗涤,每次15分钟。接着在涡旋下添加100%己二醇3次,每次10分钟。

[1298] 将树脂与己二醇以1:2的比率组合,且接着添加至样品且在室温下温育2小时。在温育之后,将溶液用100%树脂替换且温育4-6小时。用新鲜的100%树脂再重复此步骤一次。接着将其用100%新鲜树脂替换,将水平调节为约1-2mm深度,且烘烤8-12小时。切开埃彭道夫管且将与样品一起浇铸的环氧树脂片再烘烤16-24小时。接着将环氧树脂铸件切割成小块,记下具有细胞的一侧。使用市售的5分钟环氧胶将小片粘合到块上以进行切片。透射电子显微镜(JOEL,USA)用于在80kV的电压下对样品成像。

[1299] 在一些实施方案中,融合体将显示与阳性对照(HEK293细胞)类似的脂质双层结构,且在DPBS对照中未观察到明显的结构。在一些实施方案中,在破坏的细胞制剂中将不会观察到管腔结构。

[1300] 实施例28:检测融合剂表达

[1301] 此实施例定量融合体中的融合剂表达。

[1302] 将包括嘌呤霉素抗性基因的开放阅读框架连同克隆片段的开放阅读框架的转座酶载体(System Biosciences,Inc.) (例如来自水泡性口炎病毒的糖蛋白[VSV-G],Oxford Genetics#0G592)使用电穿孔器(Amaxa)和293T细胞系特异性核转染试剂盒(Lonza)电穿孔至293Ts中。

[1303] 在含有20%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中用1μg/μL嘌呤霉素选择3-5天后,通过先前实施例中所述的任一种方法由稳定表达的细胞系或对照细胞制备融合体。

[1304] 接着将融合体用1×PBS,冰冷的溶解缓冲液(150mM NaCl、0.1%Triton X-100、0.5%脱氧胆酸钠、0.1%SDS、50mM Tris-HCl,pH 8.0和蛋白酶抑制剂混合液III(Abcam, ab201117))洗涤,超声处理3次,每次10-15秒,且以16,000×g离心20分钟。用特异性针对VSV-G的探针对回收的上清液级分进行蛋白质印迹,以确定来自稳定转染的细胞或对照

细胞制备的融合体的VSV-G的非膜特异性浓度且相比于VSV-G蛋白的标准。

[1305] 在一些实施方案中,来自稳定转染的细胞的融合体将比从未被稳定转染的细胞产生的融合体具有更多VSV-G。

[1306] 实施例29:融合剂的定量

[1307] 此实施例描述每个融合体中融合剂的绝对数的定量。

[1308] 通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体组合物,除了如前述实施例中所述地对融合体进行工程化以表达用GFP标记的融合剂(VSV-G)。另外,在不存在融合剂(VSV-G)或GFP的情况下对阴性对照融合体进行工程化。

[1309] 接着如下地分析具有GFP标记的融合剂的融合体和阴性对照的融合剂的绝对数。连续稀释商业上获得的重组GFP以产生蛋白质浓度的校准曲线。接着使用GFP光立方体(469/35激发滤光片和525/39发射滤光片)在荧光计中测量校准曲线和已知数量的融合体的样品的GFP荧光,以计算融合体制剂中GFP分子的平均摩尔浓度。接着将摩尔浓度转换为GFP分子的数目且除以每个样品的融合体数目,以获得每个融合体的GFP标记的融合剂分子的平均数目,且因此提供每个融合体的融合剂数目的相对估计。

[1310] 在一些实施方案中,相比于其中不存在融合剂或GFP的阴性对照,具有GFP标签的融合体中的GFP荧光将更高。在一些实施方案中,GFP荧光是相对于存在的融合剂分子的数目。

[1311] 或者,根据制造商的说明书使用单一细胞制备系统(Fluidigm)分离单个的融合体,且使用市售的探针组(Taqman)和被设计成基于 C_t 值定量融合剂或GFP cDNA水平的预混液进行qRT-PCR。通过合成(Ambio)产生与融合剂基因或GFP基因的克隆片段具有相同序列的RNA标准品,且接着以连续稀释添加至单一细胞制备系统qRT-PCR实验反应,以建立 C_t 相对于融合剂或GFP RNA浓度的标准曲线。

[1312] 将来自融合体的 C_t 值相比于标准曲线以确定每个融合体的融合剂或GFP RNA的量。

[1313] 在一些实施方案中,相比于其中不存在融合剂或GFP的阴性对照,被工程化以表达融合剂的融合体中的融合剂和GFP RNA将更高。

[1314] 通过如先前所述地分析脂质双层结构和如本文其他实施例中所述地通过LC-MS定量脂质双层中的融合剂,可进一步定量脂质双层中的融合剂。

[1315] 实施例30:测量融合体的平均直径

[1316] 此实施例描述融合体平均直径的测量。

[1317] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。使用市售的系统(iZON Science)测量融合体以确定平均直径。将系统与软件(根据制造商的说明)和纳米孔一起使用,被设计成分析40nm至10 μ m直径范围内的粒子。将融合体和亲本细胞再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中以达到0.01-0.1 μ g蛋白质/mL的最终浓度范围。如下表中所指示地调节其他仪器设置:

[1318] 表16:融合体测量参数和设置

测量参数	设置
压力	6
纳米孔类型	NP300

校准样品	CPC400_6P
黄金标准分析	否
捕获助手	无

[1320] 在分离后的2小时内分析所有融合体。在一些实施方案中,相比于亲本源细胞,融合体的直径将在约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内。

[1321] 实施例31:测量融合体的平均直径分布

[1322] 此实施例描述测量融合体的直径分布。

[1323] 通过先前实施例中所描述的任一种方法产生融合体,且使用如先前实施例中描述的市售系统进行测试以确定粒子的平均直径。在一些实施方案中,将以大约中值为中心的10%、50%和90%的融合体的直径阈值相比于亲本细胞以评估融合体直径分布。

[1324] 在一些实施方案中,融合体将在10%、50%或90%的样品内具有亲本细胞的直径分布变化性的小于约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更小。

[1325] 实施例32:融合体的平均体积

[1326] 此实施例描述测量融合体的平均体积。不希望受理论束缚,改变融合体的尺寸(例如直径、体积)、表面积可使其对于不同的货物装载、治疗设计或应用为通用的。

[1327] 如先前实施例中所述地制备融合体。阳性对照为HEK293细胞或具有已知尺寸的聚苯乙烯珠粒。阴性对照为穿过36号针大致50次的HEK293细胞。

[1328] 如先前实施例中所述的用透射电子显微镜分析用于确定融合体的尺寸。测量融合体的直径且接着计算体积。

[1329] 在一些实施方案中,融合体将具有大致50nm或更大直径的平均尺寸。

[1330] 实施例33:融合体的平均密度

[1331] 通过如Théry et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006Apr; Chapter 3: Unit 3.22中所述的连续蔗糖梯度离心分析来测量融合体密度。如先前实施例中所述地获得融合体。

[1332] 首先,制备蔗糖梯度。分别通过混合4mL HEPES/蔗糖储备溶液和1mL HEPES储备溶液或0.5mL HEPES/蔗糖储备溶液和4.5mL HEPES储备溶液来产生2M和0.25蔗糖溶液。将这两个部分装入关闭所有挡板的梯度仪中,2M蔗糖溶液在具有磁力搅拌棒的近端隔室中,且0.25M蔗糖溶液在远端隔室中。将梯度仪置于磁性搅拌板上,打开近端与远端隔室之间的挡板且开启磁性搅拌板。如下制成HEPES储备溶液:2.4g N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES;最终20mM), 300H₂O,用10N NaOH将pH调节至7.4且最后用H₂O将体积调节至500mL。如下制成HEPES/蔗糖储备溶液:2.4g羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES;最终20mM), 428g无蛋白酶的蔗糖(ICN;最终2.5M), 150mL H₂O,用10N NaOH将pH调节至7.4且最后用H₂O将体积调节至500mL。

[1333] 将融合体再悬浮于2mL HEPES/蔗糖储备溶液中且倒入SW 41离心管的底部。将外管置于SW 41管中,恰好在2mL融合体上方。打开外挡板,且将连续的2M(底部)至0.25M(顶部)蔗糖梯度缓慢倒入融合体的顶部上。SW 41管在倒入梯度时降低,以使得管路始终略高于液体顶部。

[1334] 所有具有梯度的管彼此平衡,或与具有相同重量的蔗糖溶液的其他管平衡。将梯度液在4°C下在制动器设置于低位的SW 41旋转铲斗转子中以210,000×g离心过夜(≥14小

时)。

[1335] 使用微量移液器从上到下收集十一份1mL级分且置于用于TLA-100.3转子的3mL管中。将样品放在一旁,且在96孔板的单独孔中将50 μ l的每一级分用于测量折射率。板用粘性箔覆盖以防止蒸发且在室温下储存不超过1小时。折射计用于测量10至20 μ l的来自96孔板中储存的材料的每一级分的折射率(因此测量蔗糖浓度和密度)。

[1336] 在可从Beckman网站下载的超速离心目录中可获得将折射率转换为g/mL的表格。

[1337] 接着准备每一级分用于蛋白质含量分析。将2毫升20mM HEPES, pH 7.4添加至每个1mL梯度级分,且通过上下移液2至3次而混合。每个管的一侧标有永久性标记,且将管置于TLA-100.3转子,标记侧朝上。

[1338] 将具有稀释的级分的3mL管在110,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C下离心1小时。TLA-100.3转子容纳六个管,因此每个梯度进行两次离心,将其他管保持于4 $^{\circ}$ C下直至其可离心。

[1339] 从每个3mL管吸出上清液,在集结粒顶部留一滴。集结粒很可能不可见,但可从管上的标记推断出其位置。将不可见的集结粒再悬浮且转移至微量离心管。将每个再悬浮的级分的一半用于通过二喹啉甲酸分析进行蛋白质含量分析,如另一实施例所述。这提供跨融合体制剂的各个梯度级分的分布。此分布用于确定融合体的平均密度。将另外一半体积的级分储存于-80 $^{\circ}$ C下且一旦蛋白质分析展现跨级分的融合体分布便用于其他目的(例如功能分析,或通过免疫分离进一步纯化)。

[1340] 在一些实施方案中,使用此测定法或等同物,包含多个融合体的制剂的平均密度将为1.25g/ml \pm 0.05标准差。在一些实施方案中,制剂的平均密度将在1-1.1、1.05-1.15、1.1-1.2、1.15-1.25、1.2-1.3或1.25-1.35g/mL范围内。在一些实施方案中,制剂的平均密度将小于1或大于1.35。

[1341] 实施例34:测量融合体中的细胞器含量

[1342] 此实施例描述检测融合体中的细胞器。

[1343] 如本文所述地制备融合体。为了检测内质网(ER)和线粒体,将融合体或C2C12细胞用1 μ M ER染色剂(E34251, Thermo Fisher, Waltham, MA)和1 μ M线粒体染色剂(M22426, Thermo Fisher Waltham, MA)染色。为了检测溶酶体,将融合体或细胞用50nM溶酶体染色剂(L7526, Thermo Fisher, Waltham, MA)染色。

[1344] 将染色的融合体在流式细胞仪(Thermo Fisher, Waltham, MA)上运行且根据下表测量每种染料的荧光强度。通过比较染色的融合体与未染色的融合体(阴性对照)和染色的细胞(阳性对照)的荧光强度来验证细胞器的存在。

[1345] 在去核后5小时,内质网(图1)、线粒体(图2)和溶酶体(图3)的融合体染色呈阳性。

[1346] 表17:融合体染色

染色剂	Attune 激光/滤光片	激光波长	发射滤光片(nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
ER-Tracker Green	BL1	488	530/30
MitoTracker Deep Red FM	RL1	638	670/14
LysoTracker Green	BL1	488	530/30

[1347]

[1348] 实施例35:测量融合体中的核含量

[1349] 此实施例描述测量融合体中的核含量。为了验证融合体不含核,将融合体用 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342和 $1\mu\text{M}$ CalceinAM (C3100MP, Thermo Fisher, Waltham, MA) 染色且将染色的融合体在Attune NXT流式细胞仪 (Thermo Fisher, Waltham, MA) 上运行以根据下表确定每种染料的荧光强度。在一些实施方案中,将通过比较染色的融合体与未染色的融合体和染色的细胞的平均荧光强度来验证存在细胞溶质 (CalceinAM) 和不存在细胞核 (Hoechst 33342)。

[1350] 表18:流式细胞仪设置

染色剂	Attune激光/滤光片	激光波长	发射滤光片 (nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
Calcein AM	BL1	488	530/30

[1352] 实施例36:测量核被膜含量

[1353] 此实施例描述测量去核的融合体中的核被膜含量。核被膜从细胞的细胞质分离DNA。

[1354] 在一些实施方案中,纯化的融合体组合物包含已如本文所述去核的哺乳动物细胞,如HEK-293Ts (293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™)。此实施例描述不同核膜蛋白的定量,作为测量在融合体产生之后剩余的完整核膜的量的代替。

[1355] 在此实施例中,将 10×10^6 个HEK-293Ts和等量的由 10×10^6 个HEK-293Ts制备的融合体用3.7% PFA固定15分钟,用 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4洗涤且同时渗透,且接着使用含有1%牛血清白蛋白和0.5% Triton® X-100的 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4阻断15分钟。在渗透之后,将融合体和细胞与不同的一级抗体,例如 (抗RanGAP1抗体 [EPR3295] (Abcam-ab92360)、抗NUP98抗体 [EPR6678]-核孔标记 (Abcam-ab124980)、抗核孔复合物蛋白抗体 [Mab414]- (Abcam-ab24609)、抗输入蛋白7抗体 (Abcam-ab213670) 一起在4°C下温育12小时,所述一级抗体以制造商建议的浓度在含有1%牛血清白蛋白和0.5% Triton® X-100的 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4中稀释。接着将融合体和细胞用 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4洗涤,且与适当的荧光二级抗体一起在21°C下温育2小时,所述二级抗体检测先前指定的一级抗体,以制造商建议的浓度在含有1%牛血清白蛋白和0.5%清洁剂的 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4中稀释。接着将融合体和细胞用 $1 \times$ PBS缓冲液洗涤,再悬浮于300 μL 含有 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342的 $1 \times$ PBS缓冲液, pH 7.4中,通过20 μm FACS管过滤且通过流式细胞测量术分析。

[1356] 阴性对照使用相同染色程序产生,但不添加一级抗体。在FACS细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 上以488nm氩气激光激发进行流式细胞测量术,且收集530 +/-30nm发射光谱。FACS采集软件用于采集和分析。将光散射设定为线性增益,且将荧光通道设定为对数标度,在每种条件下分析最少10,000个细胞。相对完整的核膜含量是基于每个样品中荧光的中值强度计算所得的。在正向和侧向散射通道中捕获所有事件。

[1357] 通过从融合体的中值荧光强度值减去对应阴性对照样品的中值荧光强度值来确定融合体的标准化荧光强度值。接着将融合体样品的标准化荧光相对于对应有核细胞样品进行标准化,以产生完整核膜含量的定量测量值。

[1358] 在一些实施方案中,相比于有核的亲本细胞,去核的融合体将包含小于1%、2%、

3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%荧光强度或核被膜含量。

[1359] 实施例37:测量染色质水平

[1360] 此实施例描述测量去核的融合体中的染色质。

[1361] DNA可浓缩成染色质以使其在细胞核内适合。在一些实施方案中,通过本文所描述的任一种方法产生的纯化的融合体组合物将包含低水平的染色质。

[1362] 使用ELISA以特异性针对组蛋白H3或组蛋白H4的抗体分析通过先前描述的任一种方法制备的去核的融合体和阳性对照细胞(例如亲本细胞)的染色质含量。组蛋白为染色质的主要蛋白质组分,且H3和H4为主要的组蛋白。

[1363] 使用商业试剂盒(例如Abcam组蛋白提取试剂盒(ab113476))或本领域已知的其他方法从融合体制剂和细胞制剂提取组蛋白。将这些等分试样储存在-80C下直至使用。通过在分析缓冲液的溶液中将纯化的组蛋白(H3或H4)稀释为1至50ng/ μ L来制备标准连续稀释液。分析缓冲液可源自制造商供应的试剂盒(例如Abcam组蛋白H4总定量试剂盒(ab156909)或Abcam组蛋白H3总定量试剂盒(ab115091))。将分析缓冲液添加至用抗组蛋白H3或抗H4抗体涂布的48或96孔板的每个孔,且将样品或标准对照添加至孔以使每个孔的总体积达到50 μ L。接着将板覆盖且在37°C下温育90至120分钟。

[1364] 在温育之后,准备结合至与板连接的抗组蛋白抗体的任何组蛋白用于检测。吸出上清液且将板用150 μ L洗涤缓冲液洗涤。接着将包括抗组蛋白H3或抗H4捕获抗体的捕获缓冲液以50 μ L的体积和1 μ g/mL的浓度添加至板。接着将板在室温下在定轨振荡器上温育60分钟。

[1365] 随后,将板吸出且使用洗涤缓冲液洗涤6次。接着将可被捕获抗体活化的信号报告分子添加至每个孔。将板覆盖且在室温下温育30分钟。接着将板吸出且使用洗涤缓冲液洗涤4次。通过添加终止溶液来终止反应。读取板中的每个孔在450nm处的吸光度,且根据450nm处的吸光度相对于标准样品中组蛋白的浓度的标准曲线计算每个样品中组蛋白的浓度。

[1366] 在一些实施方案中,融合体样品将包含有核的亲本细胞的组蛋白浓度的小于1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[1367] 实施例38:测量融合体中的DNA含量

[1368] 此实施例描述相对于有核对应物的融合体中的DNA量的定量。在一些实施方案中,融合体将具有比有核对应物少的DNA。通过测量总DNA或特定管家基因的水平来确定核酸水平。在一些实施方案中,具有减少的DNA含量或基本上缺少DNA的融合体将不能复制、分化或转录基因,确保当向个体施用其剂量和功能不改变。

[1369] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。如根据融合体和源细胞的蛋白质所测量的相同质量的制剂用于分离总DNA(例如使用试剂盒,如Qiagen DNeasy目录号69504),接着使用标准光谱法测定DNA浓度,以评估DNA的吸光度(例如使用Thermo Scientific NanoDrop)。

[1370] 在一些实施方案中,去核的融合体中的DNA的浓度将为亲本细胞中的小于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更小。

[1371] 或者,可使用半定量实时PCR(RT-PCR)在有核细胞与融合体之间比较特定管家基

因(如GAPDH)的浓度。从亲本细胞和融合体分离总DNA且如本文所述地测量DNA浓度。使用以下反应模板用PCR试剂盒(Applied Biosystems,目录号4309155)进行RT-PCR:

SYBR Green Master Mix: 10 μ L
 0.45 μ M 正向引物: 1 μ L
 [1372] 0.45 μ M 反向引物: 1 μ L
 DNA 模板: 10 ng
 PCR 级 水: 可变

[1373] 正向和反向引物获自Integrated DNA Technologies。下表详述引物对和其相关序列:

[1374] 表19: 引物序列

靶标	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
[1375] 人 类 nDNA (GAPDH)	GGAGTCCACTGGCGTCTTC AC(SEQ ID NO: 39)	GAGGCATTGCTGATGATCTT GAGG(SEQ ID NO: 40)

[1376] 实时PCR系统(Applied Biosystems)用于通过以下方案进行扩增和检测:

[1377] 变性,94°C2分钟

[1378] 以下顺序的40个循环:

[1379] 变性,94°C15秒

[1380] 结合,延伸,60°C1分钟

[1381] 用GAPDH DNA的连续稀释液制备C_t相对于DNA浓度的标准曲线且用于将来自融合体PCR结果的C_t核值标准化为DNA的特定量(ng)。

[1382] 在一些实施方案中,去核的融合体中的GAPDH DNA的浓度将为亲本细胞中的小于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更小。

[1383] 实施例39:测量融合体中的miRNA含量

[1384] 此实施例描述融合体中的微RNA(miRNA)的定量。在一些实施方案中,融合体包含miRNA。

[1385] miRNA为控制信使RNA(mRNA)翻译成蛋白质的速率(以及其他活动)的调节元件。在一些实施方案中,携带miRNA的融合体可用于将miRNA递送至靶位点。

[1386] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。如先前所述地制备来自融合体或亲本细胞的RNA。至少一个miRNA基因选自www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml处的Sanger Center miRNA Registry。如Chen et al,Nucleic Acids Research,33(20),2005中所述地制备miRNA。通过Thermo Fisher(A25576,Waltham,MA)可获得所有TaqMan miRNA分析。

[1387] 根据制造商的说明书对miRNA cDNA进行qPCR,且使用实时PCR系统如本文所述地产生和分析C_t值。

[1388] 在一些实施方案中,融合体的miRNA含量将为其亲本细胞的至少1%、2%、3%、

4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。

[1389] 实施例40:定量融合体中的内源RNA或合成RNA的表达

[1390] 此实施例描述定量具有改变的表达的内源RNA或在融合体中表达的合成RNA的水平。

[1391] 融合体或亲本细胞被工程化以改变介导对融合体的细胞功能的内源或合成RNA的表达。

[1392] 转座酶载体(System Biosciences, Inc.)包括嘌呤霉素抗性基因的开放阅读框架连同蛋白质药剂的克隆片段的开放阅读框架。使用电穿孔器(Amaxa)和293T细胞系特异性核转染试剂盒(Lonza)将载体电穿孔至293Ts中。

[1393] 在含有20%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中用嘌呤霉素选择3-5天后,通过先前实施例中所描述的任一种方法由稳定表达的细胞系制备融合体。

[1394] 如先前实施例中所述地分离个别的融合体且定量每个融合体的蛋白质药剂或RNA。

[1395] 在一些实施方案中,融合体将具有每个融合体至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 或更多个RNA。

[1396] 实施例41:测量融合体中的脂质组成

[1397] 此实施例描述定量融合体的脂质组成。在一些实施方案中,融合体的脂质组成与衍生其的细胞类似。脂质组成影响融合体和细胞的重要生物物理参数,如尺寸、静电相互作用和胶体特性。

[1398] 脂质测量是基于质谱法。通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。

[1399] 如(Sampaio, et al., Proc Natl Acad Sci, 2011, Feb 1; 108(5):1903-7)所述,在脂质分析服务机构(Dresden, Germany)进行基于质谱法的脂质分析。使用两步氯仿/甲醇程序提取脂质(Ejsing, et al., Proc Natl Acad Sci, 2009, Mar 17; 106(7):2136-41)。用以下的内部脂质标准混合物加标样品:心磷脂16:1/15:0/15:0/15:0(CL)、神经酰胺18:1;2/17:0(Cer)、二酰甘油17:0/17:0(DAG)、己糖基神经酰胺18:1;2/12:0(HexCer)、溶血磷脂酸酯17:0(LPA)、溶血磷脂酰胆碱12:0(LPC)、溶血磷脂酰乙醇胺17:1(LPE)、溶血磷脂酰甘油17:1(LPG)、溶血磷脂酰肌醇17:1(LPI)、溶血磷脂酰丝氨酸17:1(LPS)、磷脂酸酯17:0/17:0(PA)、磷脂酰胆碱17:0/17:0(PC)、磷脂酰乙醇胺17:0/17:0(PE)、磷脂酰甘油17:0/17:0(PG)、磷脂酰肌醇16:0/16:0(PI)、磷脂酰丝氨酸17:0/17:0(PS)、胆固醇酯20:0(CE)、鞘磷脂18:1;2/12:0;0(SM)和三酰甘油17:0/17:0/17:0(TAG)。

[1400] 在提取之后,将有机相转移至输液板且在速度真空浓缩器中干燥。将第一步干提取物再悬浮于含7.5mM乙酸铵的氯仿/甲醇/丙醇(1:2:4, V:V:V)中且将第二步干提取物再悬浮于甲胺于氯仿/甲醇中的33%乙醇溶液(0.003:5:1; V:V:V)中。所有液体处理步骤均使用用于有机溶剂的机器人平台进行,所述平台具有用于移液的防液滴控制特征(Hamilton Robotics)。

[1401] 在配备有离子源(Advion Biosciences)的质谱仪(Thermo Scientific)上通过直接输注来分析样品。在单次采集中,以正离子和负离子模式分析样品,其中MS的分辨率为 $Rm/z=200=280000$ 且串联MS/MS实验的分辨率为 $Rm/z=200=17500$ 。MS/MS由包含列表触发,所述列表涵盖以1Da增量扫描的对应MS质量范围(Surma, et al., Eur J lipid Sci

Technol, 2015, Oct; 117 (10) : 1540-9)。将MS和MS/MS数据组合,以监测作为铵加合物的CE、DAG和TAG离子;作为乙酸盐加合物的PC、PC⁰⁻;和作为去质子化阴离子的CL、PA、PE、PE⁰⁻、PG、PI和PS。仅MS用于监测作为去质子化阴离子的LPA、LPE、LPE⁰⁻、LPI和LPS;作为乙酸盐的Cer、HexCer、SM、LPC和LPC⁰⁻。

[1402] 用内部开发的脂质鉴别软件分析数据,如以下参考文献中所述(Herzog等人,《基因组生物学(Genome Biol)》,2011年1月19日;12(1):R8;Herzog等人,《公共科学图书馆·综合(PLoS One)》,2012年1月;7(1):e29851)。仅将信噪比>5,且信号强度比对应空白样品中高5倍的脂质鉴别考虑用于进一步的数据分析。

[1403] 将融合体脂质组成与亲本细胞的脂质组成相比。在一些实施方案中,如果亲本细胞中>50%的鉴别的脂质存在于融合体中,则融合体和亲本细胞将具有类似的脂质组成,且在那些鉴别的脂质中,融合体中的水平将为亲本细胞中的对应脂质水平的>25%。

[1404] 实施例42:测量融合体中的蛋白质组学组成

[1405] 此实施例描述定量融合体的蛋白质组成。在一些实施方案中,融合体的蛋白质组成将与衍生其的细胞类似。

[1406] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。将融合体再悬浮于溶解缓冲液(7M脲、2M硫脲、4%(w/v)Chaps于50mM Tris中,pH 8.0)中且在室温下在偶尔涡旋的情况下温育15分钟。接着通过在冰浴中超声处理5分钟将混合物溶解且以13,000RPM短暂离心5分钟。通过比色分析(Pierce)确定蛋白质含量且将每个样品的蛋白质转移至新试管中且用50mM Tris pH 8平衡体积。

[1407] 将蛋白质在65℃下用10mM DTT还原15分钟且在室温下在黑暗中用15mM碘乙酰胺烷基化30分钟。通过逐渐添加6体积的冷(-20℃)丙酮使蛋白质沉淀,且在-80℃下温育过夜。用冷(-20℃)甲醇洗涤蛋白质集颗粒3次。将蛋白质再悬浮于50mM Tris pH 8.3中。

[1408] 随后,在消化的前4小时内在37℃下在搅拌下将胰蛋白酶/lysC添加至蛋白质。将样品用50mM Tris pH 8稀释,且将0.1%脱氧胆酸钠与更多胰蛋白酶/lysC一起添加以在37℃下在搅拌下消化过夜。停止消化且通过添加2%v/v甲酸来去除脱氧胆酸钠。将样品涡旋且通过以13,000RPM离心1分钟来清除。通过逆相固相萃取(SPE)来纯化肽且干燥。将样品在20μl的3%DMSO、0.2%甲酸的水溶液中复原且通过LC-MS分析。

[1409] 为了进行定量测量,还在仪器上运行蛋白质标准品。将标准肽(Pierce,等摩尔,LC-MS级,#88342)稀释至4、8、20、40和100fmol/μL且通过LC-MS/MS进行分析。对于每种浓度,计算每种蛋白质的5个最佳肽(每个肽3个MS/MS过渡)的平均AUC(曲线下面积)以产生标准曲线。

[1410] 用高分辨率质谱仪(ABSciex,Foster City,CA,USA)进行采集,所述质谱仪配备有具有25μm i.d.毛细管的电喷雾接口且与微超高效液相色谱仪(μUHPLC)(Eksigent,Redwood City,CA,USA)耦接。分析软件用于控制仪器以及进行数据处理和采集。将源电压设置为5.2kV且维持于225℃下,将气帘气设置为27psi,将气体一设置为12psi且将气体二设置为10psi。对于蛋白质数据库,以信息相关采集(IDA)模式进行采集,且对于样品,以SWATH采集模式进行采集。在维持于60℃下的0.3μm i.d.,2.7μm粒子,150mm长的逆相色谱柱(Advance Materials Technology,Wilmington,DE)上进行分离。样品通过环路过满注入5μL环路中。对于120分钟(样品)LC梯度,移动相包括以下:流动速率为3μL/min的溶剂A(0.2%v/v甲酸

和3%DMSO v/v于水中)和溶剂B(0.2%v/v甲酸和3%DMSO于EtOH中)。

[1411] 对于蛋白质的绝对定量,使用每种蛋白质的5个最佳肽(每个肽3MS/MS离子)的AUC的总和产生标准曲线(5点, $R^2 > 0.99$)。为了产生用于样品分析的数据库,对12个样品中的每一个运行DIAUmpire算法且与输出MGF文件合并到一个数据库中。此数据库与软件(ABSciex)一起使用,以使用5个过渡/肽和5个肽/蛋白质最大值定量每个样品中的蛋白质。如果计算的评分高于1.5或FDR<1%,则将肽视为被充分测量。将每个充分测量的肽的AUC的总和绘制于标准曲线上,且报告为fmol。

[1412] 接着如下地分析所得蛋白质定量数据,以确定已知类别的蛋白质的蛋白质水平和比例:酶被鉴别为用酶委员会(EC)编号注释的蛋白质;ER相关蛋白被鉴别为具有ER而非线粒体的Gene Ontology(GO;<http://www.geneontology.org>)细胞区室分类的蛋白质;外泌体相关蛋白被鉴别为具有外泌体而非线粒体的Gene Ontology细胞区室分类的蛋白质;且线粒体蛋白被鉴别为在MitoCarta数据库中被鉴别为线粒体的蛋白质(Calvo等人,NAR 20151 doi:10.1093/nar/gkv1003)。将这些类别中的每一个的摩尔比确定为每类中的所有蛋白质的摩尔量的总和除以每个样品中所有鉴别的蛋白质的摩尔量的总和。

[1413] 将融合体蛋白质组学组成相比于亲本细胞蛋白质组学组成。在一些实施方案中,当>50%的鉴别的蛋白质存在于融合体中时,将观察到融合体与亲本细胞之间类似的蛋白质组学组成,且在那些鉴别的蛋白质中,水平为亲本细胞中的对应蛋白质水平的>25%。

[1414] 实施例43:定量每个融合体的内源或合成蛋白水平

[1415] 此实施例描述定量融合体中的内源或合成蛋白货物。在一些实施方案中,融合体包含内源或合成蛋白货物。

[1416] 融合体或亲本细胞被工程化,以改变内源蛋白的表达或表达介导治疗性或新颖细胞功能的合成货物。

[1417] 转座酶载体(System Biosciences, Inc.)包括嘌呤霉素抗性基因的开放阅读框架连同蛋白质药剂的克隆片段的开放阅读框架,任选地翻译融合至绿色荧光蛋白(GFP)的开放阅读框架。使用电穿孔器(Amaxa)和293T细胞系特异性核转染试剂盒(Lonza)将载体电穿孔至293Ts中。

[1418] 在含有20%胎牛血清和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的DMEM中用嘌呤霉素选择3-5天后,通过先前实施例中所描述的任一种方法由稳定表达的细胞系制备融合体。

[1419] 如上文所述地根据质谱定量内源蛋白的变化的表达水平或未融合至GFP的合成蛋白的表达水平。在一些实施方案中,融合体将具有每个融合体至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 个或更多个蛋白质药剂分子。

[1420] 或者,将纯化的GFP在含有20%胎牛血清和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的DMEM中连续稀释以产生蛋白质浓度的标准曲线。使用GFP光立方(469/35激发滤光片和525/39发射滤光片)在荧光计(BioTek)中测量标准曲线和融合体样品的GFP荧光,以计算融合体中的GFP分子的平均摩尔浓度。接着将摩尔浓度转换成GFP分子的数目除以每个样品的融合体的数目以获得每个融合体的蛋白质药剂分子的平均数目。

[1421] 在一些实施方案中,融合体将具有每个融合体至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 个或更多个蛋白质药剂分子。

[1422] 实施例44:测量融合体中的外泌体蛋白的标记

[1423] 此测定法描述样品制剂的蛋白质组学组成的定量,且定量了已知是外泌体的特异性标记的蛋白质的比例。

[1424] 根据标准生物样品处理程序,将融合体粒化且冷冻运送至蛋白质组学分析中心。

[1425] 将融合体解冻以用于蛋白质提取和分析。首先,将其再悬浮于溶解缓冲液(7M脲、2M硫脲、4% (w/v) chaps于50mM Tris中,pH 8.0)中且在室温下在偶尔涡旋的情况下温育15分钟。接着通过在冰浴中超声处理5分钟将混合物溶解且以13,000RPM短暂离心5分钟。通过比色分析(Pierce)测定总蛋白含量且将来自每个样品的100 μ g蛋白质转移至新试管中且用50mM Tris pH 8调节体积。

[1426] 将蛋白质在65 $^{\circ}$ C下用10mM DTT还原15分钟且在室温下在黑暗中用15mM碘乙酰胺烷基化30分钟。接着通过逐渐添加6体积的冷(-20 $^{\circ}$ C)丙酮使蛋白质沉淀,且在-80 $^{\circ}$ C下温育隔夜。

[1427] 将蛋白质粒化,用冷(-20 $^{\circ}$ C)甲醇洗涤3次,且再悬浮于50mM Tris pH 8中。在消化的前4小时内在37 $^{\circ}$ C下在搅拌下将3.33 μ g胰蛋白酶/lysC添加至蛋白质。将样品用50mM Tris pH 8稀释,且将0.1%脱氧胆酸钠与另外3.3 μ g胰蛋白酶/lysC一起添加以在37 $^{\circ}$ C下在搅拌下消化过夜。停止消化且通过添加2%v/v甲酸来去除脱氧胆酸钠。将样品涡旋且通过以13,000RPM离心1分钟来清除。

[1428] 通过逆相固相萃取(SPE)来纯化蛋白质且干燥。如先前所述,将样品在3%DMSO、0.2%甲酸的水溶液中复原且通过LC-MS进行分析。

[1429] 分析所得的蛋白质定量数据,以确定已知外泌体标记蛋白质的蛋白质水平和比例。确切地说:四跨膜蛋白家族蛋白(例如CD63、CD9或CD81)、ESCRT相关蛋白(例如TSG101、CHMP4A-B或VPS4B)、Alix、TSG101、MHCI、MHCII、GP96、辅肌动蛋白-4、线粒体内膜蛋白、同线蛋白-1、TSG101、ADAM10、EHD4、同线蛋白-1、TSG101、EHD1、脂筏结构蛋白-1、热休克70kDa蛋白(HSC70/HSP73、HSP70/HSP72)。将这些外泌体标记蛋白质相对于所有测量的蛋白质的摩尔比确定为以上列出的每种特定外泌体标记蛋白质的摩尔量除以每个样品中所有鉴别的蛋白质的摩尔量的总和且表示为%。

[1430] 类似地,将所有外泌体标记蛋白质相对于所有测量的蛋白质的摩尔比确定为以上列出的所有特定外泌体标记蛋白质的摩尔量的总和除以每个样品中所有鉴别的蛋白质的摩尔量的总和且表示为总数的%。

[1431] 在一些实施方案中,样品将包含小于5%的任何单独的外泌体标记蛋白质和小于15%的总外泌体标记蛋白质。

[1432] 在一些实施方案中,单独的外泌体标记蛋白质将以小于0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%或10%存在。

[1433] 在一些实施方案中,所有外泌体标记蛋白质的总和将为小于0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%。

[1434] 实施例45:测量融合体中的GAPDH

[1435] 此分析描述定量融合体中的甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的水平,和与亲本细胞相比,融合体中的GAPDH的相对水平。

[1436] 根据制造商的说明,使用用于GAPDH的标准市售ELISA(ab176642,Abcam)在亲本细

胞和融合体中测量GAPDH。

[1437] 以用于测量GAPDH的样品的相同体积,如先前所述地通过二喹啉甲酸分析来类似地测量总蛋白质水平。在实施方案中,使用此分析,融合体中的GAPDH/总蛋白质的水平将为<100ng GAPDH/ μ g总蛋白质。类似地,在实施方案中,从亲本细胞到融合体的GAPDH水平相对于总蛋白质的降低将为大于10%降低。

[1438] 在一些实施方案中,以ng GAPDH/ μ g总蛋白质计的制剂中的GAPDH含量将为小于500、小于250、小于100、小于50、小于20、小于10、小于5或小于1。

[1439] 在一些实施方案中,从亲本细胞到制剂的以ng/ μ g计的GAPDH/总蛋白质的降低将为大于1%、大于2.5%、大于5%、大于10%、大于15%、大于20%、大于30%、大于40%、大于50%、大于60%、大于70%、大于80%或大于90%。

[1440] 实施例46:测量融合体中的钙联蛋白

[1441] 此分析描述定量融合体中的钙联蛋白(CNX)水平,和与亲本细胞相比,融合体中的CNX的相对水平。

[1442] 根据制造商的说明,使用用于钙联蛋白的标准市售ELISA(MBS721668, MyBioSource)在起始细胞和制剂中测量钙联蛋白。

[1443] 以用于测量钙联蛋白的样品的相同体积,如先前所述地通过二喹啉甲酸分析来类似地测量总蛋白质水平。在实施方案中,使用此分析,融合体中的钙联蛋白/总蛋白质的水平将为<100ng钙联蛋白/ μ g总蛋白质。类似地,在实施方案中,从亲本细胞到融合体的钙联蛋白水平相对于总蛋白质的增加将为大于10%增加。

[1444] 在一些实施方案中,以ng钙联蛋白/ μ g总蛋白质计的制剂中的钙联蛋白含量将为小于500、250、100、50、20、10、5或1。

[1445] 在一些实施方案中,从亲本细胞到制剂的以ng/ μ g计的钙联蛋白/总蛋白质的减少将为大于1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[1446] 实施例47:比较可溶性与不溶性蛋白质质量

[1447] 此实施例描述定量融合体中的可溶性:不溶性蛋白质质量比。在一些实施方案中,融合体中的可溶性:不溶性蛋白质质量比将与有核细胞类似。

[1448] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。使用标准二喹啉甲酸分析(BCA)(例如使用市售的Pierce™BCA蛋白质分析试剂盒,Thermo Fischer产品编号23225)测试融合体制剂以确定可溶性:不溶性蛋白质的比。通过将制备的融合体或亲本细胞以 1×10^7 个细胞或融合体/mL的浓度悬浮于PBS中,且以1600g离心以将融合体或细胞制成集结粒来制备可溶性蛋白质样品。以可溶蛋白质级分形式收集上清液。

[1449] 通过剧烈移液且在具有2% Triton-X-100的PBS中涡旋来溶解集结粒中的融合体或细胞。溶解的级分表示不溶性蛋白质级分。

[1450] 使用供应的BSA,每孔0至20 μ g(一式三份)来产生标准曲线。融合体或细胞制剂被稀释,使得测量的量在标准范围内。一式三份地分析融合体制剂且使用平均值。将可溶性蛋白质浓度除以不溶性蛋白质浓度以得到可溶性:不溶性蛋白质比。

[1451] 在一些实施方案中,相比于亲本细胞,融合体可溶性:不溶性蛋白质比将在1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大内。

[1452] 实施例48:测量融合体中的LPS

[1453] 此实施例描述定量与亲本细胞相比,融合体中的脂多糖(LPS)的水平。在一些实施方案中,融合体将具有相比于亲本细胞较低水平的LPS。

[1454] LPS是细菌膜的组分和先天免疫反应的强力诱导剂。

[1455] 如先前实施例中所述,LPS测量是基于质谱法。

[1456] 在一些实施方案中,融合体的脂质含量的小于5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%或更小将为LPS。

[1457] 实施例49:融合体中的脂质与蛋白质的比

[1458] 此实施例描述定量融合体中的脂质质量与蛋白质质量的比。在一些实施方案中,融合体将具有与有核细胞类似的脂质质量与蛋白质质量的比。

[1459] 总脂质含量计算为在先前实施例中概述的脂质组学数据集中鉴别的所有脂质的摩尔含量的总和。通过如本文所述的二喹啉甲酸分析来测量融合体的总蛋白含量。

[1460] 或者,脂质与蛋白质的比可被描述为特定脂质种类与特定蛋白质的比。特定脂质物质选自先前实施例中产生的脂质组学数据。特定蛋白质选自先前实施例中产生的蛋白质组学数据。所选脂质物质和蛋白质的不同组合用于定义特定的脂质:蛋白质比。

[1461] 实施例50:融合体中的蛋白质与DNA的比

[1462] 此实施例描述定量融合体中的脂质质量与DNA质量的比。在一些实施方案中,融合体将具有比细胞大得多的蛋白质质量与DNA质量的比。

[1463] 如先前实施例中所述地测量融合体和细胞的总蛋白质含量。如先前实施例中所述地测量融合体和细胞的DNA质量。接着通过将总蛋白质含量除以总DNA含量来确定蛋白质与总核酸的比,以得到典型融合体制剂的在给定范围内的比。

[1464] 或者,通过使用半定量实时PCR(RT-PCR)将核酸水平定义为特定管家基因,如GAPDH的水平来确定蛋白质与核酸的比。

[1465] 接着通过将总蛋白含量除以总GAPDH DNA含量来确定蛋白质与GAPDH核酸的比,以定义典型融合体制剂的蛋白质:核酸比的特定范围。

[1466] 实施例51:融合体中的脂质与DNA的比

[1467] 此实施例描述定量与亲本细胞相比,融合体中的脂质与DNA的比。在一些实施方案中,与亲本细胞相比,融合体将具有更大的脂质与DNA的比。

[1468] 此比率被定义为总脂质含量(在以上实施例中概述)或特定脂质物质。在特定脂质物质的情况下,范围取决于所选的特定脂质物质。特定脂质物质选自前述实施例中产生的脂质组学数据。如前述实施例中所述地测定核酸含量。

[1469] 使用标准化为核酸含量的所选脂质物质的不同组合来定义特定融合体制剂的特征性的特定脂质:核酸比。

[1470] 实施例52:分析融合体上的表面标记

[1471] 此分析描述鉴别融合体上的表面标记。

[1472] 根据标准生物样品处理程序,将融合体粒化且冷冻运送至蛋白质组学分析中心。

[1473] 为了鉴别融合体上存在或不存在表面标记,将其用针对磷脂酰丝氨酸和CD40配体的标记染色且使用FACS系统(Becton Dickinson)通过流式细胞测量术分析。为了检测表面磷脂酰丝氨酸,用膜联蛋白V分析(556547, BD Biosciences)如制造商所述地分析产物。

[1474] 简单来说,将融合体用冷PBS洗涤两次且接着以 1×10^6 个融合体/mL的浓度再悬浮

于1×结合缓冲液中。将10%的再悬浮液转移至5mL培养管中且添加5μl FITC膜联蛋白V。将细胞轻轻地涡旋且在室温(25℃)下在黑暗中温育15分钟。

[1475] 并行地,将单独的10%的再悬浮液转移至不同管中作为未染色的对照。将1×结合缓冲液添加至每个试管中。在1小时内通过流式细胞测量术分析样品。

[1476] 在一些实施方案中,使用此分析,染色的融合体群体的平均值将被确定为高于未染色的细胞的平均值,表明融合体包含磷脂酰丝氨酸。

[1477] 类似地,对于CD40配体,根据制造商的说明将以下单克隆抗体添加至另外10%的洗涤的融合体:PE-CF594小鼠抗人类CD154克隆TRAP1(563589,BD Pharmigen)。简单来说,使用饱和量的抗体。并行地,将单独的10%的融合体转移至不同管中作为未染色的对照。将管在室温下以400×g离心5分钟。倒出上清液且将集结粒用流式细胞测量术洗涤溶液洗涤两次。将0.5mL的1%多聚甲醛固定剂添加至每个管。将每个管短暂涡旋且储存在4℃下,直至在流式细胞仪上进行分析。

[1478] 在一些实施方案中,使用此分析,染色的融合体群体的平均值将高于未染色的细胞的平均值,表明融合体包含CD40配体。

[1479] 实施例53:分析融合体中的病毒衣壳蛋白

[1480] 此分析描述样品制剂的组成分析,且评估衍生自病毒衣壳来源的蛋白质的比例。

[1481] 根据标准生物样品处理程序,将融合体粒化且冷冻运送至蛋白质组学分析中心。

[1482] 将融合体解冻以用于蛋白质提取和分析。首先,将其再悬浮于溶解缓冲液(7M脲、2M硫脲、4%(w/v)chaps于50mM Tris中,pH 8.0)中且在室温下在偶尔涡旋的情况下温育15分钟。接着通过在冰浴中超声处理5分钟将混合物溶解且以13,000RPM短暂离心5分钟。通过比色分析(Pierce)测定总蛋白含量且将来自每个样品的100μg蛋白质转移至新试管中且用50mM Tris pH 8调节体积。

[1483] 将蛋白质在65℃下用10mM DTT还原15分钟且在室温下在黑暗中用15mM碘乙酰胺烷基化30分钟。接着通过逐渐添加6体积的冷(-20℃)丙酮使蛋白质沉淀,且在-80℃下温育隔夜。

[1484] 将蛋白质粒化,用冷(-20℃)甲醇洗涤3次,且再悬浮于50mM Tris pH 8中。在消化的前4小时内在37℃下在搅拌下将3.33μg胰蛋白酶/lysC添加至蛋白质。将样品用50mM Tris pH 8稀释,且将0.1%脱氧胆酸钠与另外3.3μg胰蛋白酶/lysC一起添加以在37℃下在搅拌下消化过夜。停止消化且通过添加2%v/v甲酸来去除脱氧胆酸钠。将样品涡旋且通过以13,000RPM离心1分钟来清除。

[1485] 通过逆相固相萃取(SPE)来纯化蛋白质且干燥。如先前所述,将样品在3%DMSO、0.2%甲酸的水溶液中复原且通过LC-MS进行分析。

[1486] 将病毒衣壳蛋白相对于所有测量的蛋白质的摩尔比确定为所有病毒衣壳蛋白的摩尔量除以每个样品中所有鉴别的蛋白质的摩尔量的总和且表示为%。

[1487] 在一些实施方案中,使用此方法或等同物,样品将包含少于10%病毒衣壳蛋白。在一些实施方案中,样品将包含少于0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%病毒衣壳蛋白。

[1488] 实施例54:测量与靶细胞的融合

[1489] 此实施例描述定量相比于非靶细胞,融合体与靶细胞的融合。

[1490] 在一些实施方案中,融合体与靶细胞的融合允许将融合体的内腔中携带的货物细胞特异性地递送至受体细胞的细胞溶质。如下分析通过本文描述的方法产生的融合体与靶细胞的融合率。

[1491] 在此实施例中,融合体包含在其质膜上表达成肌蛋白的HEK293T细胞。另外,融合体表达mTagBFP2荧光蛋白和Cre重组酶。靶细胞为成肌细胞,其表达Myomaker和Myomixer二者,且非靶细胞为成纤维细胞,其既不表达Myomaker也不表达Myomixer。预测表达Myomaker的融合体与表达Myomaker和Myomixer二者的靶细胞融合但不与非靶细胞融合(Quinn et al.,2017,Nature Communications,8,15665.doi.org/10.1038/ncomms15665)(Millay et al.,2013,Nature,499(7458),301-305.doi.org/10.1038/nature12343)。靶细胞和非靶细胞类型均从小鼠分离且在CMV启动子下稳定表达“LoxP-stop-Loxp-tdTomato”盒,所述启动子在通过Cre重组后开启tdTomato表达,表明融合。

[1492] 将靶受体细胞或非靶受体细胞涂铺于黑色的透明底部96孔板中。靶细胞和非靶细胞均对于不同融合基因进行涂铺。随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达Cre重组酶蛋白和Myomaker的融合体施用至DMEM培养基中的靶受体细胞或非靶受体细胞。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。

[1493] 从融合体使用后四小时开始,对细胞孔成像以阳性地鉴别区域或孔中的RFP阳性细胞相对于GFP阳性细胞。

[1494] 在此实施例中,使用自动显微镜(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)对细胞板进行成像。通过首先在DMEM培养基中用Hoechst 33342染色细胞10分钟来确定给定孔中的总细胞群体。Hoechst 33342通过插入至DNA中染色细胞核且因此用于鉴别单个的细胞。在染色之后,将Hoechst培养基用常规DMEM培养基替换。

[1495] 使用405nm LED和DAPI滤光立方体对Hoechst成像。GFP使用465nm LED和GFP滤光立方体成像,而RFP使用523nm LED和RFP滤光立方体成像。通过首先在阳性对照孔;即,用编码Cre重组酶的腺病毒而非融合体处理的受体细胞上确立LED强度和积分时间来采集靶细胞孔和非靶细胞孔的图像。

[1496] 设定采集设置,以使得RFP和GFP强度处于最大像素强度值但不饱和。接着使用确立的设置对所关注的孔成像。每4小时对孔成像以采集融合活性速率的时程数据。

[1497] 用与荧光显微镜一起提供的软件或其他软件(Rasband, W.S., ImageJ, U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007)进行GFP和RFP阳性孔的分析。

[1498] 使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。在Hoechst阳性细胞上设置总细胞掩码。Hoechst强度显著高于背景强度的细胞为阈值且排除太小或太大而无法成为Hoechst阳性细胞的区域。

[1499] 在总细胞掩码内,通过对显著高于背景的细胞再次取阈值且将Hoechst(细胞核)掩码扩展到整个细胞区域以包括整个GFP和RFP细胞荧光来鉴别GFP和RFP阳性细胞。在含有靶受体细胞或非靶受体细胞的对照孔中鉴别的RFP阳性细胞的数目用于从含有融合体的孔中减去RFP阳性细胞的数目(以减去非特异性Loxp重组)。接着在每个时间点将RFP阳性细胞

(融合的受体细胞)的数目除以GFP阳性细胞(未融合的受体细胞)与RFP阳性细胞的总和,以定量受体细胞群体内的融合体融合率。将速率标准化为施用至受体细胞的融合体的给定剂量。对于靶向融合(融合体与靶向细胞融合)的速率,从与靶细胞的融合速率减去与非靶细胞的融合速率,以定量靶向融合速率。

[1500] 在一些实施方案中,融合体与靶细胞的平均融合速率将在0.01-4.0RFP/GFP细胞/小时范围内(对于靶细胞融合),或为非靶受体细胞与融合体的平均融合速率的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,未施用融合体的组将显示<0.01RFP/GFP细胞/小时的背景速率。

[1501] 实施例55:递送膜蛋白的体外融合

[1502] 此实施例描述融合体与细胞的体外融合。在一些实施方案中,融合体与细胞的体外融合使得将活性膜蛋白递送至受体细胞。

[1503] 在此实施例中,融合体从表达仙台病毒HVJ-E蛋白的HEK293T细胞产生(Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22 (October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12)。在一些实施方案中,产生融合体以表达膜蛋白GLUT4,其主要发现于肌肉和脂肪组织中且负责胰岛素调节的葡萄糖向细胞内的运输。如先前实施例中所述的任何方法所述,由HEK293T细胞制备具有或不具有GLUT4的融合体。

[1504] 接着用表达GLUT4的融合体、不表达GLUT4的融合体、PBS(阴性对照)或胰岛素(阳性对照)处理肌肉细胞,例如C2C12细胞。通过荧光2-脱氧葡萄糖类似物,2-[N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基]-2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)的吸收来测量GLUT4对C2C12细胞的活性。使用先前实施例中所述的方法,通过显微镜评估C2C12细胞的荧光。

[1505] 在一些实施方案中,预期相比于用PBS或不表达GLUT4的融合体处理的C2C12细胞,用表达GLUT4和胰岛素的融合体处理的C2C12细胞展示增加的荧光。另外参见Yang et al., Advanced Materials 29,1605604,2017。

[1506] 实施例56:膜蛋白的体内递送

[1507] 此实施例描述融合体与细胞的体内融合。在一些实施方案中,融合体与细胞的体内融合使得将活性膜蛋白递送至受体细胞。

[1508] 在此实施例中,如同先前实施例中,从表达仙台病毒HVJ-E蛋白的HEK293T细胞产生融合体。在一些实施方案中,产生融合体以表达膜蛋白GLUT4。如先前实施例中所述的任何方法所述,由HEK293T细胞制备具有或不具有GLUT4的融合体。

[1509] 向BALB/c-nu小鼠施用表达GLUT4的融合体、不表达GLUT4的融合体或PBS(阴性对照)。向小鼠的胫骨前肌中肌肉内注射融合体或PBS。紧邻在融合体施用之前,使小鼠禁食12小时且注射[18F]2-氟-2脱氧-d-葡萄糖(18F-FDG),其为使得能够进行正电子发射断层扫描(PET成像)的葡萄糖类似物。在麻醉(2%异氟醚)下通过尾静脉向小鼠注射18F-FDG。使用纳米级成像系统(1T, Mediso, Hungary)进行PET成像。在施用融合体之后4小时进行成像。成像后,立即处死小鼠且称重胫骨前肌。使用3D成像系统在全检测器模式下,且启用所有矫正、高正则化和八次迭代来重构PET图像。使用成像软件包(Mediso, Hungary)且应用标准摄取值(SUV)分析来进行重构的图像的三维感兴趣体积(VOI)分析。为胫骨前肌部位绘制固定具有2mm直径的球体的VOI。使用下式计算每个VOI位点的SUV: $SUV = (\text{感兴趣体积中的放射性}) / (\text{注入的放射性} \times \text{体重})$ 。

[1510] 在一些实施方案中,预期相比于施用PBS或不表达GLUT4的融合体的小鼠,施用表达GLUT4的融合体的小鼠展示VOI中增加的放射性信号。另外参见Yang et al., *Advanced Materials* 29,1605604,2017。

[1511] 实施例57:测量从血管的外渗

[1512] 此实施例描述用体外微流体系统测试的跨内皮单层的融合体外渗的定量(J. S Joen et al. 2013, journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056910)。

[1513] 细胞从脉管系统外渗至周围组织中。不希望受理论束缚,外渗为融合体到达血管外组织的一种方式。

[1514] 系统包括三个可独立寻址的介质通道,所述通道由可将ECM模拟凝胶注入其中的腔室分隔。简单来说,微流体系统具有模制的PDMS(聚二甲基硅氧烷;Silgard 184;Dow Chemical,MI),通过其钻取进出口且结合至盖玻璃以形成微流体通道。通道截面尺寸为1mm(宽度)×120 μ m(高度)。为了增强基质粘附,PDMS通道用PDL(聚D-赖氨酸氢溴酸盐;1mg/mL;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)溶液涂布。

[1515] 随后,将I型胶原蛋白(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)溶液(2.0mg/ml)伴以磷酸盐缓冲盐水(PBS;Gibco)和NaOH通过四个单独的填充口注入装置的凝胶区域中,且温育30分钟以形成水凝胶。当凝胶聚合时,立即将内皮细胞培养基(获自如Lonza或Sigma的供应商)移至通道中以防止凝胶脱水。吸出培养基后,将稀水凝胶(BD science)溶液(3.0mg/mL)引入至细胞通道中且使用冷培养基将过量的水凝胶溶液洗掉。

[1516] 将内皮细胞引入至中间通道中且使其沉降以形成内皮。内皮细胞接种后两天,将融合体或巨噬细胞(阳性对照)引入至相同通道中,内皮细胞已在所述通道中形成完整单层。引入融合体以使其粘附且跨单层转移至凝胶区域中。将培养物保持于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下的含湿气温育箱中。融合体的GFP表达型式用于使得能够通过荧光显微镜进行活细胞成像。第二天,将细胞固定且在腔室中使用DAPI染色对细胞核染色,且使用共聚焦显微镜对多个所关注区域成像以确定多少融合体穿过了内皮单层。

[1517] 在一些实施方案中,DAPI染色将指示在接种后,融合体和阳性对照细胞能够穿过内皮屏障。

[1518] 实施例58:测量趋化性细胞运动性

[1519] 此实施例描述融合体趋化性的定量。细胞可通过趋化性而朝向或远离化学梯度移动。在一些实施方案中,趋化性将使融合体归巢至损伤部位或追踪病原体。如下地分析通过先前实施例中所述的任一种方法产生的纯化的融合体组合物的趋化能力。

[1520] 根据制造商提供的方案在DMEM培养基(ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8032X_Chemotaxis/IN_8032X_Chemotaxis.pdf)中,将足够数量的融合体或巨噬细胞(阳性对照)装入显微镜玻片孔中。将融合体在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下放置1小时以使其附着。在细胞附着后,将DMEM(阴性对照)或含DMEM的MCP1化学引诱剂装载至中心通道的相邻储集器中,且使用Zeiss倒置宽视野显微镜对融合体连续成像2小时。使用ImageJ软件(Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007)分析图像。用手动跟踪插件(Fabrice Cordelières, Institut Curie, Orsay, France)获取每个观察到的融合体或细胞的迁移协

调数据。趋化图和迁移速度由趋化和迁移工具 (ibidi) 确定。

[1521] 在一些实施方案中,融合体的平均累积距离和迁移速度将在阳性对照细胞对趋化因子的反应的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大内。细胞对趋化因子的反应描述于例如Howard E.Gendelman et al., *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(1):47-59, 2009中。

[1522] 实施例59:测量归巢潜力

[1523] 此实施例描述将融合体归巢至损伤部位。细胞可从远端位点迁移和/或积聚于特定位点,例如归巢至位点。通常,位点为损伤位点。在一些实施方案中,融合体将归巢至,例如迁移至或积聚于损伤位点。

[1524] 通过使用30G针以2 μ g/mL的浓度肌肉内(IM)注射至右胫骨前肌(TA)中而向8周龄C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratories)投配合黑牙蛇毒素(NTX)(Accurate Chemical & Scientific Corp),一种肌肉毒素的无菌生理盐水。通过使用化学脱毛剂对区域脱毛45秒,接着用水冲洗3次而制备胫骨前肌(TA)上的皮肤。选择此浓度以确保肌纤维的最大变性,以及对其卫星细胞、晕倒轴突和血管的最小损伤。

[1525] 在NTX注射后的第1天,小鼠接受表达萤火虫萤光素酶的融合体或细胞的静脉内注射。通过先前实施例所述的任一种方法从稳定表达萤火虫萤光素酶的细胞产生融合体。生物发光成像系统(Perkin Elmer)用于在注射后0、1、3、7、21和28处获得生物发光的整个动物图像。

[1526] 在成像前五分钟,小鼠接受以150mg/kg剂量腹膜内注射的生物发光底物(Perkin Elmer)以使萤光素酶可视化。成像系统被校准以补偿所有装置设置。使用辐射光子(Radiance Photons)测量生物发光信号,且将总通量(Total Flux)用作测量值。通过围绕ROI的信号产生感兴趣区域(ROI),以得到以光子/秒计的值。对用NTX处理的TA肌肉和对侧TA肌肉都评估了ROI,且计算NTX处理的TA肌肉与未用NTX处理的TA肌肉之间的光子/秒的比,作为归巢至NTX处理的肌肉的量度。

[1527] 在一些实施方案中,融合体和细胞中的NTX处理的TA肌肉与未用NTX处理的TA肌肉之间的光子/秒的比将大于1,表明表达萤光素酶的融合体在损伤处的位点特异性积聚。

[1528] 参见例如Plant et al., *Muscle Nerve* 34(5):577-85, 2006。

[1529] 实施例60:测量吞噬活性

[1530] 此实施例表明融合体的吞噬活性。在一些实施方案中,融合体具有吞噬活性,例如能够进行吞噬作用。细胞参与吞噬作用,吞噬粒子,使得能够隔离和破坏外来侵入物,如细菌或死细胞。

[1531] 通过先前实施例中所述的任一种方法产生的纯化的融合体组合物包含来自具有部分或完全核灭活的哺乳动物巨噬细胞的融合体,能够进行吞噬作用(通过病原体生物粒子所分析)。根据以下方案,通过使用荧光吞噬作用分析来进行此评估。

[1532] 将巨噬细胞(阳性对照)和融合体在收获后立即涂铺于单独的共聚焦玻璃底培养皿中。将巨噬细胞和融合体在DMEM+10%FBS+1%P/S中温育1小时以附着。如制造商的方案中所指示地将荧光素标记的大肠杆菌K12和非荧光素标记的大肠杆菌K-12(阴性对照)添加至巨噬细胞/融合体,且温育2小时,tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf。在2小时之后,通过添加锥虫蓝将游离的荧光颗粒淬灭。通过共聚焦显微镜在

488激发下对由吞噬粒子发出的细胞内荧光成像。使用image J软件对吞噬阳性融合体的数目进行定量。

[1533] 在引入生物粒子后2小时,吞噬融合体的平均数目为至少30%,且在阳性对照巨噬细胞中为大于30%。

[1534] 实施例61:测量穿过细胞膜或血脑屏障的能力

[1535] 此实施例描述穿过血脑屏障的融合体的定量。在一些实施方案中,融合体将穿过(例如进入和离开)血脑屏障,例如以递送至中枢神经系统。

[1536] 对八周龄C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratories)静脉内注射表达萤火虫萤光素酶的融合体或白细胞(阳性对照)。通过先前实施例中所述的任一种方法,从稳定表达萤火虫萤光素酶的细胞或不表达萤光素酶的细胞(阴性对照)产生融合体。生物发光成像系统(Perkin Elmer)用于在融合体或细胞注射后1、2、3、4、5、6、8、12和24小时获得生物发光的全动物图像。

[1537] 在成像前五分钟,小鼠接受以150mg/kg剂量腹膜内注射的生物发光底物(Perkin Elmer)以使萤光素酶可视化。成像系统被校准以补偿所有装置设置。测量生物发光信号,且将总通量用作测量值。通过围绕ROI的信号产生感兴趣区域(ROI),以得到以光子/秒计的值。所选的ROI为包括大脑的区域周围的小鼠的头。

[1538] 在一些实施方案中,相比于不表达萤光素酶的阴性对照融合体,注射表达萤光素酶的细胞或融合体的动物中的ROI中的光子/秒将更大,表明表达萤光素酶的融合体积聚于大脑内或周围。

[1539] 实施例62:测量蛋白质分泌的潜力

[1540] 此实施例描述通过融合体的分泌的定量。在一些实施方案中,融合体将能够分泌,例如分泌蛋白质。细胞可通过分泌来处置或排出物质。在一些实施方案中,融合体将通过分泌在其环境中化学相互作用和通信。

[1541] 使用来自ThermoFisher Scientific的Gaussia萤光素酶快速分析(目录号16158)确定融合体以给定速率分泌蛋白质的能力。将通过先前实施例中所述的任一种方法产生的小鼠胚胎成纤维细胞(阳性对照)或融合体在生长培养基中温育,且通过首先以1600g粒化5分钟且接着收集上清液来每15分钟收集培养基样品。将收集的样品吸移至透明底96孔板中。接着根据制造商的说明书制备分析缓冲液的工作溶液。

[1542] 简单来说,将考伦特嗪(colenterazine),一种萤光素或发光分子与快速分析缓冲液混合且将混合物吸移至含有样品的96孔板的每个孔中。缺乏细胞或融合体的阴性对照孔包括生长培养基或分析缓冲液以确定背景Gaussia萤光素酶信号。另外,制备纯化的Gaussia萤光素酶(Athena Enzyme Systems,目录号0308)的标准曲线以便每小时将发光信号转化为Gaussia萤光素酶分泌的分子。

[1543] 使用500毫秒积分来分析板的发光。从所有样品减去背景Gaussia萤光素酶信号且接着计算Gaussia萤光素酶标准曲线的线性最佳拟合曲线。如果样品读数在标准曲线内不拟合,则将其适当稀释且再分析。使用此分析,确定融合体以给定范围内的速率(分子/小时)分泌Gaussia萤光素酶的能力。

[1544] 在一些实施方案中,融合体将能够以阳性对照细胞的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大的速率分泌蛋白质。

[1545] 实施例63:测量信号转导潜力

[1546] 此实施例描述融合体中的信号转导的定量。在一些实施方案中,融合体能够进行信号转导。细胞可通过信号级联(如磷酸化)在称为信号转导的过程中从细胞外环境发送和接收分子信号。通过先前实施例中所述的任一种方法产生的纯化的融合体组合物包含来自具有部分或完全核灭活的哺乳动物细胞的融合体,能够进行胰岛素诱导的信号转导。通过测量AKT磷酸化水平,胰岛素受体信号级联中的关键途径和回应于胰岛素的葡萄糖摄取来评估胰岛素诱导的信号转导。

[1547] 为了测量AKT磷酸化,将细胞,例如小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)(阳性对照)和融合体涂铺于48孔板中且在37°C和5%CO₂下的含湿气温育箱中放置2小时。在细胞粘附后,将胰岛素(例如10nM)或不含胰岛素的阴性对照溶液添加至含有细胞或融合体的孔中后维持30分钟。在30分钟后,由融合体或细胞制得蛋白质溶解物,且通过蛋白质印迹法测量胰岛素刺激和对照未刺激的样品中的磷酸化AKT水平。

[1548] 如在葡萄糖摄取部分中所阐述,通过使用标记的葡萄糖(2-NBDG)来测量回应于胰岛素或阴性对照溶液的葡萄糖摄取。(S.Galic et al.,Molecular Cell Biology 25(2):819-829,2005)。

[1549] 在一些实施方案中,相比于阴性对照,融合体将增强AKT磷酸化和回应于胰岛素的葡萄糖摄取至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大。

[1550] 实施例64:测量跨细胞膜转运葡萄糖的能力

[1551] 此实施例描述2-NBDG(2-(N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖)的水平的定量,2-NBDG为一种可用于监测活细胞中的葡萄糖摄取,且因此测量跨脂质双层的主动转运的荧光葡萄糖类似物。在一些实施方案中,此分析或等同物可用于测量葡萄糖摄取的水平 and 跨融合体的脂质双层的主动转运。

[1552] 通过先前实施例中所述的任一种方法来产生融合体组合物。接着将足够数量的融合体在不含葡萄糖,具有20%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中在37°C和5%CO₂下温育2小时。在2小时葡萄糖饥饿时段之后,改变培养基以使其包括不含葡萄糖的DMEM、20%胎牛血清、1×青霉素/链霉素和20μM 2-NBDG(ThermoFisher)且再在37°C和5%CO₂下温育2小时。

[1553] 相同地处理阴性对照融合体,除了添加等量的DMSO来代替2-NBDG。

[1554] 接着将融合体用1×PBS洗涤三次且再悬浮于适当缓冲液中,且转移至96孔成像板。接着使用GFP光立方体(469/35激发滤光片和525/39发射滤光片)在荧光计中测量2-NBDG荧光,以定量在1小时装载时段内已跨融合体膜转运且累积于融合体中的2-NBDG的量。

[1555] 在一些实施方案中,相比于阴性(DMSO)对照,经2-NBDG处理的融合体中的2-NBDG荧光将更高。用525/39发射滤光片的荧光测量将与存在的2-NBDG分子的数目相关。

[1556] 实施例65:融合体的内腔与水溶液可混溶

[1557] 此实施例评估融合体内腔与水溶液,如水的混溶性。

[1558] 如先前实施例中所述地制备融合体。对照为具有低渗溶液、高渗溶液或正常渗透溶液的透析膜。

[1559] 将融合体、阳性对照(正常渗透溶液)和阴性对照(低渗溶液)与低渗溶液

(150mOsmol)一起温育。在将每个样品暴露于水溶液之后,在显微镜下测量细胞尺寸。在一个实施方案中,相比于阴性对照,融合体和阳性对照尺寸在低渗溶液中增加。

[1560] 将融合体、阳性对照(正常渗透溶液)和阴性对照(高渗溶液)与高渗溶液(400mOsmol)一起温育。在将每个样品暴露于水溶液之后,在显微镜下测量细胞尺寸。在一些实施方案中,相比于阴性对照,融合体和阳性对照尺寸在高渗溶液中将减小。

[1561] 将融合体、阳性对照(低渗或高渗溶液)和阴性对照(正常渗透)与正常渗透溶液(290mOsmol)一起温育。在将每个样品暴露于水溶液之后,在显微镜下测量细胞尺寸。在一些实施方案中,相比于阴性对照,正常渗透溶液中的融合体和阳性对照尺寸将保持基本上相同。

[1562] 实施例66:测量细胞溶质中的酯酶活性

[1563] 此实施例描述融合体中的酯酶活性的定量,作为代谢活性的替代。通过钙黄绿素-AM染色的定量评估来确定融合体中的胞质酯酶活性(Bratosin等人,《细胞测量术(Cytometry)》66(1):78-84,2005)。

[1564] 膜渗透性染料钙黄绿素-AM(Molecular Probes,Eugene OR USA)制备为10mM的二甲亚砷储备溶液和100mM的PBS缓冲液,pH 7.4的工作溶液。将通过先前实施例中所述的任一种方法产生的融合体或阳性对照亲本小鼠胚胎成纤维细胞悬浮于PBS缓冲液中,且与钙黄绿素-AM工作溶液(钙黄绿素-AM中的最终浓度:5mM)一起在37°C下在黑暗中温育30分钟,且接着在PBS缓冲液中稀释以立即进行钙黄绿素荧光保留的流式细胞分析。

[1565] 如(Jacob et al.,Cytometry 12(6):550-558,1991)中所述,用皂苷将融合体和对照亲本小鼠胚胎成纤维细胞实验性透化为零酯酶活性的阴性对照。将融合体和细胞在含有0.05%叠氮化钠的1%皂苷于PBS缓冲液,pH 7.4中的溶液中温育15分钟。由于质膜透化的可逆性质,在用于另外的染色和洗涤步骤的所有缓冲液中均包括皂苷。在皂苷透化后,将融合体和细胞悬浮于含有0.1%皂苷和0.05%叠氮化钠PBS缓冲液中且与钙黄绿素-AM一起温育(37°C在黑暗中持续45分钟)至5mM的最终浓度,用相同的含有0.1%皂苷和0.05%叠氮化钠的PBS缓冲液洗涤三次,且通过流式细胞测量术进行分析。在FACS细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,CA,USA)上进行流动式细胞测量术分析,在530+/-30nm处收集488nm氩气激光激发和发射。FACS软件用于采集和分析。将光散射设定为线性增益,且将荧光通道设定为对数标度,在每种条件下分析最少10,000个细胞。基于每个样品中的钙黄绿素-AM的强度计算相对酯酶活性。在正向和侧向散射通道中捕获所有事件(或者,可应用门来仅选择融合体群体)。通过减去对应的阴性对照皂苷处理的样品的荧光强度(FI)值来确定融合体的FI值。将融合体样品的标准化酯酶活性相对于对应的阳性对照细胞样品进行标准化,以产生胞质酯酶活性的定量测量值。

[1566] 在一些实施方案中,相比于阳性对照细胞,融合体制剂将具有在1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大内的酯酶活性。

[1567] 另外参见Bratosin D,Mitrofan L,Palii C,Estaquier J,Montreuil J.Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging.Cytometry A.2005Jul;66(1):78-84;and Jacob BC,Favre M,Bensa JC.Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry.Cytometry 1991;12:550-558。

[1568] 实施例67:测量融合体中的乙酰胆碱酯酶活性

[1569] 使用遵循先前描述的程序(Elman等人,《生化药理学(Biochem.Pharmacol.)》7, 88,1961)的试剂盒(MAK119,SIGMA)且根据制造商的建议测量乙酰胆碱酯酶活性。

[1570] 简单来说,将融合体悬浮于含1.25mM乙酰硫代胆碱的PBS,pH 8中,与含0.1mM 5,5-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)的PBS,pH 7混合。在室温下进行温育,但在开始光学密度读取之前,将融合体和底物溶液在37℃下预温热10分钟。

[1571] 用板读取器分光光度计(ELX808,BIO-TEK instruments,Winooski,VT,USA)在450nm处监测吸收变化10分钟。单独地,样品用于通过二喹啉甲酸分析来确定融合体的蛋白质含量以进行标准化。使用此分析,融合体被确定为具有<100AChE活性单位/ μ g蛋白质。

[1572] 在一些实施方案中,AChE活性单位/ μ g蛋白质值将小于0.001、0.01、0.1、1、10、100或1000。

[1573] 实施例68:测量代谢活性水平

[1574] 此实施例描述融合体中的柠檬酸合酶活性的测量的定量。

[1575] 柠檬酸合酶为三羧酸(TCA)循环内的一种酶,其催化草酰乙酸(OAA)与乙酰辅酶A之间的反应以产生柠檬酸盐。在乙酰辅酶A水解后,会释放具有硫醇基的辅酶A(CoA-SH)。硫醇基与化学试剂5,5-二巯基双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)反应,以形成5-巯基-2-硝基苯甲酸(TNB),其为可以分光光度法在412nm处测量的黄色产物(Green 2008)。市售的试剂盒,如Abcam人类柠檬酸合酶活性分析试剂盒(产品编号ab119692)提供了执行此测量所需的所有试剂。

[1576] 根据制造商的建议进行分析。如下制备融合体样品溶解物:收集通过先前实施例中所述的任一种方法产生的融合体且将其在提取缓冲液(Abcam)中在冰上溶解20分钟。在离心之后收集上清液,且通过二喹啉甲酸分析(BCA,ThermoFisher Scientific)评估蛋白质含量,且将制剂保持于冰上直至引发以下定量方案。

[1577] 简单来说,将融合体溶解物样品在提供的微量培养板孔中的1 \times 温育缓冲液(Abcam)中稀释,其中一组孔仅接受1 \times 温育缓冲液。将板密封且在室温下在振荡下以300rpm温育4小时。接着从孔中吸出缓冲液且添加1 \times 洗涤缓冲液。再次重复此洗涤步骤。接着将1 \times 活性溶液添加至每个孔,且通过每20秒测量412nm处的吸光度持续30分钟,且在读取之间振荡而在微孔板读取器上分析板。

[1578] 从所有孔减去背景值(仅具有1 \times 温育缓冲液的孔),且将柠檬酸合酶活性表示为每微克装载的融合体溶解物样品每分钟吸光度的变化(Δ mOD@412nm/min/ μ g蛋白质)。仅使用动力学测量的100-400秒的线性部分来计算活性。

[1579] 在一些实施方案中,相比于对照细胞,融合体制剂将具有在1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大内的合酶活性。

[1580] 参见例如Green HJ等人在运动和恢复的连续三天内,人体肌肉中的代谢、酶和转运体反应(Metabolic,enzymatic,and transporter response in human muscle during three consecutive days of exercise and recovery.)《美国生理调节、综合和比较生理学杂志(Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol)》295:R1238-R1250,2008。

[1581] 实施例69:测量呼吸水平

[1582] 此实施例描述融合体中的呼吸水平的测量的定量。细胞中的呼吸水平可为氧消耗

的量度,氧消耗促进代谢。通过Seahorse细胞外通量分析仪(Agilent)测量融合体呼吸的耗氧率(Zhang 2012)。

[1583] 将通过先前实施例中所述的任一种方法产生的融合体或细胞接种于96孔Seahorse微孔板(Agilent)中。将微孔板短暂离心以将孔底部的融合体和细胞制成集结粒。如下起始耗氧量分析:通过去除生长培养基,用含有25mM葡萄糖和2mM谷氨酰胺(Agilent)的低缓冲DMEM基本培养基代替且在37°C下温育微孔板60分钟以使温度和pH平衡。

[1584] 接着在细胞外通量分析仪(Agilent)中分析微孔板,所述分析仪测量紧贴在粘附融合体和细胞周围的培养基中的细胞外氧和pH的变化。在获得稳态耗氧量(基础呼吸速率)和细胞外酸化速率后,将抑制ATP合酶的寡霉素(5 μ M)和将线粒体解偶联的质子离子载体FCCP(羰基氰化物4-(三氟甲氧基)苯腈;2 μ M)添加至微孔板的每个孔,以获得最大耗氧率的值。

[1585] 最后,添加5 μ M抗霉素A(线粒体复合物III的抑制剂)以确认呼吸变化主要是由于线粒体呼吸。从所有耗氧量测量值中减去添加抗霉素A后的最低耗氧率,以去除非线粒体呼吸组分。分析中不包括对寡霉素(耗氧率相比于基础至少降低25%)或FCCP(耗氧率相比于基础至少增加50%)的反应不恰当的细胞样品。接着将融合体呼吸水平测量为 $\text{pmol O}_2/\text{min}/1\text{e}4$ 融合体。

[1586] 接着将此呼吸水平标准化为对应的细胞呼吸水平。在一些实施方案中,相比于对应的细胞样品,融合体将具有至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大的呼吸水平。

[1587] 参见例如Zhang J,Nuebel E,Wisidagama DRR,et al.Measuring energy metabolism in cultured cells,including human pluripotent stem cells and differentiated cells.Nature protocols.2012;7(6):10.1038/nprot.2012.048.doi:10.1038/nprot.2012.048。

[1588] 实施例70:测量融合体的磷脂酰丝氨酸水平

[1589] 此实施例描述膜联蛋白-V结合至融合体表面的水平的定量。

[1590] 染色细胞可在细胞表面上显示磷脂酰丝氨酸,其为程序性细胞死亡途径中细胞凋亡的标记。膜联蛋白-V结合至磷脂酰丝氨酸,且因此,膜联蛋白-V结合为细胞活力的代理。

[1591] 如本文所述地产生融合体。为了检测凋亡信号,用5%膜联蛋白V荧光剂594(A13203,Thermo Fisher,Waltham,MA)对融合体或阳性对照细胞染色。每组(详述于下表中)包括用凋亡诱导剂甲萘醌处理的实验组。将甲萘醌以100 μ M甲萘醌添加4小时。所有样品在流式细胞仪(Thermo Fisher,Waltham,MA)上运行,且用YL1激光在561nm的波长和585/16nm的发射滤光片测量荧光强度。通过比较所有组中的膜联蛋白V的荧光强度来定量细胞外磷脂酰丝氨酸的存在。

[1592] 阴性对照未染色的融合体对膜联蛋白V染色不呈阳性。

[1593] 在一些实施方案中,融合体能够回应于甲萘醌上调细胞表面上的磷脂酰丝氨酸显示,表明非甲萘醌刺激的融合体未经历凋亡。在一些实施方案中,用甲萘醌刺激的阳性对照细胞展示比未用甲萘醌刺激的融合体更高水平的膜联蛋白V染色。

[1594] 表20:膜联蛋白V染色参数

[1595]	实验组	膜联蛋白 V 信号的平均荧光强度(和标准差)
	未染色的融合体(阴性对照)	941(937)
[1596]	染色的融合体	11257(15826)
	染色的融合体+甲萘醌	18733(17146)
	染色的巨噬细胞+甲萘醌(阳性对照)	14301(18142)

[1597] 实施例71:测量近分泌信号传导水平

[1598] 此实施例描述融合体中的近分泌信号传导的定量。

[1599] 细胞可通过近分泌信号传导形成细胞接触依赖性信号传导。在一些实施方案中,融合体中近分泌信号传导的存在将证明融合体可刺激、抑制与其紧邻的细胞且与所述细胞通信。

[1600] 通过先前实施例中所述的任一种方法从具有部分或完全核灭活的哺乳动物骨髓基质细胞(BMSC)产生的融合体通过巨噬细胞中的近分泌信号传导触发IL-6分泌。将初级巨噬细胞与BMSC共培养。首先将骨髓源性巨噬细胞接种至6孔板中,且温育24小时,接着将初级小鼠BMS源性融合体或BMSC细胞(阳性对照亲本细胞)置于具有10%FBS的DMEM培养基中的巨噬细胞上。在不同时间点(2、4、6、24小时)收集上清液且通过ELISA分析分析IL-6分泌。(Chang J.等人,2015)。

[1601] 在一些实施方案中,通过增加培养基中的巨噬细胞分泌的IL-6水平来测量由BMSC融合体诱导的近分泌信号传导的水平。在一些实施方案中,近分泌信号传导的水平将由阳性对照骨髓基质细胞(BMSC)诱导的水平的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大。

[1602] 实施例72:测量旁分泌信号传导水平

[1603] 此实施例描述融合体中的旁分泌信号传导的定量。

[1604] 细胞可通过旁分泌信号传导与局部微环境中的其他细胞通信。在一些实施方案中,融合体将能够旁进行分泌信号传导,例如以与其局部环境中的细胞通信。在一些实施方案中,融合体通过以下方案经由旁分泌衍生的分泌在内皮细胞中触发Ca²⁺信号传导的能力将通过钙指示剂fluo-4 AM来测量Ca²⁺信号传导。

[1605] 为了制备实验板,将鼠类肺微血管内皮细胞(MPMVEC)涂铺于0.2%明胶涂布的25mm玻璃底共聚焦培养皿上(80%汇合)。将MPMVEC在室温下在含有2%BSA和0.003%普朗尼克酸(pluronic acid)的ECM中温育30分钟,最终浓度为5μM fluo-4 AM(Invitrogen),以允许装载fluo-4 AM。在装载之后,将MPMVEC用含有苯磺唑酮的成像溶液(含有0.25%BSA的ECM)洗涤,以使染料损失降至最低。在装载fluo-4之后,将500μl预温热的实验成像溶液添加至板,且通过Zeiss共聚焦成像系统对板进行成像。

[1606] 在单独的试管中,将新鲜分离的鼠类巨噬细胞在培养基(DMEM+10%FBS)中用1μg/ml LPS处理或不用LPS处理(阴性对照)。在刺激后,通过先前实施例中所述的任一种方法从巨噬细胞产生融合体。

[1607] 接着在含有2%BSA和0.003%普朗尼克酸的ECM中用cell tracker red CMTPX

(Invitrogen) 标记融合体或亲本巨噬细胞(阳性对照)。接着将融合体和巨噬细胞洗涤且再悬浮于实验成像溶液中。将标记的融合体和巨噬细胞添加至共聚焦板中装有 fluo-4 AM 的 MPMVEC 上。

[1608] 使用具有氩离子激光源的 Zeiss 共聚焦成像系统每 3 秒记录一次绿色和红色荧光信号,持续 10-20 分钟,其中分别针对 fluo-4 AM 和 cell tracker red 荧光在 488 和 561nm 激发。使用成像软件分析 Fluo-4 荧光强度变化 (Mallilankaraman, K. 等人,《可视化实验杂志 (J Vis Exp.)》(58):3511, 2011)。从 LPS 刺激的融合体和细胞组中减去阴性对照融合体和细胞组中测量的 Fluo-4 强度水平。

[1609] 在一些实施方案中,相比于阳性对照细胞组,融合体,例如活化的融合体将诱导至少 1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 或更大的 Fluo-4 荧光强度增加。

[1610] 实施例 73: 针对运动性测量使肌动蛋白聚合的能力

[1611] 此实施例描述融合体中的细胞骨架组分(如肌动蛋白)的定量。在一些实施方案中,融合体包含如肌动蛋白的细胞骨架组分,且能够进行肌动蛋白聚合。

[1612] 细胞将肌动蛋白(其为细胞骨架组分)用于运动性和其他细胞质过程。细胞骨架对于产生运动驱动力和协调运动过程至关重要

[1613] 如本文所述地使 C2C12 细胞去核。将获自 12.5% 和 15% Ficol1 层的融合体合并并且标记为‘轻’,同时将来自 16-17% 层的融合体合并并且标记为‘中等’。将融合体或细胞(亲本 C2C12 细胞,阳性对照)再悬浮于 DMEM+Glutamax+10% 胎牛血清(FBS)中,涂铺于 24 孔超低附着板(#3473, Corning Inc, Corning, NY)中且在 37°C+5%CO₂ 下温育。定期(5.25 小时、8.75 小时、26.5 小时)获取样品且用 165μM 若丹明鬼笔环肽染色(阴性对照不染色),且在流式细胞仪(#A24858, Thermo Fisher, Waltham, MA)上用 FC 激光 YL1 (561nm, 具有 585/16 滤光片)测量以测量 F-肌动蛋白细胞骨架含量。测量融合体以及未染色的融合体和染色的亲本 C2C12 细胞中若丹明鬼笔环肽的荧光强度。

[1614] 融合体荧光强度在所有时间点均大于阴性对照(图 4),且融合体能够以与亲本 C2C12 细胞类似的速率聚合肌动蛋白。

[1615] 通过市售的 ELISA 系统(Cell Signaling Technology and MyBioSource),根据制造商的说明书测量其他细胞骨架组分,如下表中所列的那些。

[1616] 表 21: 细胞骨架组分

测量的细胞骨架 蛋白	商业试剂盒类型	试剂盒 ID
肌动蛋白	路径扫描总 B-肌动蛋白夹心 ELISA 试剂盒	细胞信号传导, 7880
Arp2/3	人类肌动蛋白相关蛋白 2/3 复 合物次单位(APRC2)ELISA 试 剂盒	MyBioSource, MBS7224740
形成蛋白	形成蛋白结合蛋白 1(FNBP1), ELISA 试剂盒	MyBioSource, MBS9308864
[1617] 冠蛋白	人类冠蛋白 1A ELISA 试剂盒	MyBioSource, MBS073640
肌缩蛋白	人类肌缩蛋白 ELISA 试剂盒	MyBioSource, MBS722223
角蛋白	人类角蛋白 5 ELISA 试剂盒	MyBioSource, MBS081200
肌球蛋白	人类肌球蛋白 IG(MYO1G)ELISA 试剂盒	MyBioSource, MBS9312965
微管蛋白	人类微管蛋白 β 3 ELISA 试剂 盒	MyBioSource, MBS097321

[1618] 接着将100 μ L适当稀释的溶解物从微孔板条添加至适当的孔中。将微孔用胶带密封且在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。在温育之后,去除密封胶带且丢弃内含物。每个微孔用200 μ L的1 \times 洗涤缓冲液洗涤四次。在每次单独洗涤之后,将板在吸水布上敲打,以便从每个孔中去除残留的洗涤溶液。但是,孔在实验期间的任何时候都不是完全干燥的。

[1619] 随后,将100 μ L复原的检测抗体(绿色)添加至每个单独的孔中,阴性对照孔除外。接着将孔密封且在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。在温育完成之后重复洗涤程序。将100 μ L复原的HRP连接的二级抗体(红色)添加至每个孔中。将孔用胶带密封且在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟。接着去除密封胶带且重复洗涤程序。接着将100 μ L TMB底物添加至每个孔中。将孔用胶带密封,接着在37 $^{\circ}$ C下温育10分钟。一旦最终温育完成,将100 μ L终止溶液添加至每个孔中且将板轻轻摇动几秒。

[1620] 在添加终止溶液的30分钟内进行所述分析的分光光度法分析。用无绒组织擦拭孔的底面且接着在450nm处读取吸光度。在一些实施方案中,已用检测抗体染色的融合体样品将在450nm处吸收比阴性对照融合体样品更多的光,且比已用检测抗体染色的细胞样品吸收更少的光。

[1621] 实施例74:测量平均膜电位

[1622] 此实施例描述融合体的线粒体膜电位的定量。在一些实施方案中,包含线粒体膜的融合体将维持线粒体膜电位。

[1623] 线粒体代谢活性可通过线粒体膜电位来测量。使用市售的染料TMRE定量融合体制剂的膜电位,以评估线粒体膜电位(TMRE:四甲基若丹明,乙酯,过氯酸盐,Abcam,目录号T669)。

[1624] 通过先前实施例中所述的任一种方法来产生融合体。在生长培养基(具有10%胎牛血清的无酚红DMEM)中以6等份(未处理和FCCP处理一式三份)稀释融合体或亲本细胞。将样品的一个等分试样与FCCP一起温育,FCCP是消除线粒体膜电位且防止TMRE染色的解偶联剂。对于FCCP处理的样品,将2 μ M FCCP添加至样品且在分析之前温育5分钟。接着用30nM TMRE对融合体和亲本细胞进行染色。对于每个样品,还并行地制备未染色的(无TMRE)样品。将样品在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟。接着将样品在具有488nm氩激光的流式细胞仪上分析,且在530+/-30nm处收集激发和发射。

[1625] 基于TMRE的强度计算膜电位值(以毫伏,mV计)。在正向和侧向散射通道中捕获所有事件(或者,可应用门来排除小碎屑)。通过从未处理和FCCP处理的样品的几何平均值减去未染色的样品的荧光强度的几何平均值来将未处理和FCCP处理的样品的荧光强度(FI)值标准化。使用标准化荧光强度值用修正的能斯特方程式(Nernst equation)(参见下文)来计算每种制剂的膜电位状态,所述方程式可用于基于TMRE荧光来确定融合体或细胞的线粒体膜电位(因为TMRE以能斯特方式在线粒体中积聚)。

[1626] 用下式计算融合体或细胞膜电位:(mV) = -61.5 * log (FI未处理-标准化/FIFCCP处理-标准化)。在一些实施方案中,对来自C2C12小鼠成肌细胞的融合体制剂使用此分析或等同物,融合体制剂的膜电位状态将在亲本细胞的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大内。在一些实施方案中,膜电位的范围为约-20至-150mV。

[1627] 实施例75:测量个体中的持久性半衰期

[1628] 此实施例描述融合体半衰期的测量。

[1629] 融合体衍生自表达gaussia萤光素酶的细胞,通过先前实施例中所述的任一种方法产生,且在缓冲溶液中制备纯、1:2、1:5和1:10稀释液。将缺少融合体的缓冲溶液用作阴性对照。

[1630] 将每个剂量静脉内施用至三只八周龄雄性C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratories)。在静脉内施用融合体后1、2、3、4、5、6、12、24、48和72小时从眶后静脉收集血液。在实验结束时通过CO₂吸入将动物处死。

[1631] 将血液在室温下离心20分钟。立即将血清样品冷冻于-80 $^{\circ}$ C下直至生物分析。接着,在将样品与Gaussia萤光素酶底物(Nanolight,Pinetop,AZ)混合后,将每个血液样品用于进行Gaussia萤光素酶活性分析。简单来说,将考伦特嗪,一种荧光素或发光分子与快速分析缓冲液混合且将混合物吸移至含有血液样品的96孔板的孔中。缺少血液的阴性对照孔含有分析缓冲液以确定背景Gaussia萤光素酶信号。

[1632] 另外,制备阳性对照纯化的Gaussia萤光素酶(Athena Enzyme Systems,目录号0308)的标准曲线以便每小时将发光信号转化为Gaussia萤光素酶分泌的分子。使用500毫秒积分来分析板的发光。从所有样品减去背景Gaussia萤光素酶信号且接着计算Gaussia萤光素酶标准曲线的线性最佳拟合曲线。如果样品读数在标准曲线内不拟合,则将其适当稀释且再分析。将来自1、2、3、4、5、6、12、24、48和72小时处获取的样品的萤光素酶信号内插至

标准曲线。使用一室模型的以下方程式计算消除速率常数 k_e (h^{-1}): $C(t) = C_0 \times e^{-k_e t}$, 其中 $C(t)$ (ng/mL) 为时间 t (h) 处的融合体浓度且 C_0 为在时间=0时的融合体浓度 (ng/mL)。将消除半衰期 $t_{1/2,e}$ (h) 计算为 $\ln(2) / k_e$ 。

[1633] 在一些实施方案中,融合体的半衰期将为阴性对照细胞的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大。

[1634] 实施例76:测量融合体在循环中的保留

[1635] 此实施例描述将融合体递送至循环中和在器官中的保留的定量。在一些实施方案中,将融合体递送至循环中,且不被捕获和保留在器官部位中。

[1636] 在一些实施方案中,递送至外周循环中的融合体逃避了网状内皮系统 (RES) 的捕获和保留,以便高效地到达靶位点。RES包含细胞系统,主要是巨噬细胞,其驻留在例如脾脏、淋巴结和肝脏的实体器官中。这些细胞通常负责去除“老”细胞,如红细胞。

[1637] 融合体衍生自表达CRE重组酶的细胞(药剂),或不表达CRE的细胞(阴性对照)。如同实施例62中,制备这些融合体用于体内注射。

[1638] 受体小鼠带有一个被CRE蛋白修饰的 $loxP$ -萤光素酶基因组DNA基因座,所述蛋白由通过融合体递送的mRNA制成,以开启萤光素酶的表达(JAX#005125)。可通过生物发光成像在活体动物中检测到萤光素酶。用于此实施例的阳性对照是与小鼠品系配对的受体小鼠的后代,所述品系仅在巨噬细胞和单核细胞中表达来自其自身基因组的相同蛋白质(Cx3cr1-CRE JAX#025524)。来自此配对的后代带有每个等位基因之一($loxP$ -萤光素酶, Cx3cr1-CRE)。

[1639] 通过尾静脉注射(IV, 实施例#48)将融合体注射至小鼠的外周循环中,所述小鼠带有基因座,其在受到CRE蛋白作用时引起萤光素酶的表达。RES的非特异性捕获机制在本质上为吞噬的,将一定比例的CRE蛋白从融合体释放至巨噬细胞中,从而引起基因组重组。IVIS测量(如实施例62中所述)鉴别非融合剂对照在何处积聚和融合。脾脏、淋巴结和肝脏中的积聚将指示非特异性RES介导的融合体捕获。在融合体注射后24、48和96小时处进行IVIS。

[1640] 将小鼠安乐死且收集脾脏、肝脏和肠道中的主要淋巴链。

[1641] 将基因组DNA从这些器官分离且进行针对重组的基因组DNA残余物的定量聚合酶链反应。还对替代基因组位点(不被CRE靶向)进行定量,以提供样品中的细胞数目的量度。

[1642] 在实施方案中,将在整个动物中且特别是在肝脏和脾脏部位,对于药剂和阴性对照二者观察到低生物发光信号。在实施方案中,阳性对照将显示肝脏中增加的信号(相比于阴性对照和药剂)和脾脏中的高信号以及与淋巴结一致的分布。

[1643] 在一些实施方案中,这些组织的基因组PCR定量将指示在所有检查的组织中,阳性对照中的替代基因座上的高重组信号比例,而对于药剂和阴性对照,重组水平在所有组织中都将可忽略不计。

[1644] 在一些实施方案中,此实施例的结果将指示非融合剂对照不被RES保留,且将能够实现广泛分布且展现高生物可用性。

[1645] 实施例77:在免疫抑制下的融合体寿命

[1646] 此实施例描述当融合体组合物与免疫抑制药物共同施用,融合体组合物的免疫原性的定量。

[1647] 刺激免疫反应的疗法有时会降低治疗功效或对受体产生毒性。在一些实施方案中,融合体将为基本上非免疫原性的。

[1648] 将通过先前实施例中所描述的任一种方法产生的融合体的纯化组合物与免疫抑制药物共同施用,且通过融合体的体内寿命来分析免疫原性特性。将足够数量的萤光素酶标记的融合体连同他克莫司(TAC,4毫克/千克/天;Sigma Aldrich),或媒剂(阴性对照)或无任何其他药剂(阳性对照)局部注射至正常小鼠的腓肠肌中。接着在注射后1、2、3、4、5、6、12、24、48和72小时处对小鼠进行体内成像。

[1649] 简单来说,将小鼠用异氟醚麻醉且以每千克体重375mg的剂量腹膜内施用D-荧光素。在成像时,将动物置于不透光的室内,且取决于生物发光的发射强度,以5秒至5分钟的积分时间收集从移植到动物体内的表达萤光素酶的融合体发射的光子。在上述的各个时间点重复扫描相同小鼠。BLI信号以光子/秒(总通量)为单位定量且呈现为 $\log[\text{光子/秒}]$ 。通过比较使用或不使用TAC的强度和融合体注射来分析数据。

[1650] 在实施方案中,在最终时间点,分析将显示TAC共同施用组中的融合体寿命相对于单独的融合体和媒剂组增加。除了融合体寿命增加以外,在一些实施方案中,将观察到在每个时间点,来自融合体加TAC组的BLI信号相对于融合体加媒剂或单独的融合体增加。

[1651] 实施例78:测量对融合体具有反应性的预先存在的IgG和IgM抗体

[1652] 此实施例描述使用流式细胞测量术测量的预先存在的抗融合体抗体滴度的定量。

[1653] 融合体的免疫原性的一个量度是抗体反应。识别融合体的抗体可以能够限制融合体活性或寿命的方式结合。在一些实施方案中,本文所述的融合体的一些受体将具有结合且识别融合体的预先存在的抗体。

[1654] 在此实施例中,使用融合体测试抗融合体抗体滴度,所述融合体使用异种源细胞通过先前实施例中所描述的任一种方法产生。在此实施例中,对未用融合体治疗的小鼠评估抗融合体抗体的存在。值得注意的是,通过对方案进行优化,本文所述的方法可同样适用于人类、大鼠、猴。

[1655] 阴性对照为已耗尽IgM和IgG的小鼠血清,且阳性对照为衍生自小鼠的血清,所述小鼠已接受产生自异种源细胞的融合体的多次注射。

[1656] 为了评估结合至融合体的预先存在的抗体的存在,来自未用融合体治疗的小鼠的血清首先通过加热至 56°C 后维持30分钟而去补体,且随后在含有3%FCS和0.1%NaN₃的PBS中稀释33%。将等量的血清和融合体(1×10^2 - 1×10^8 个融合体/毫升)悬浮液在 4°C 下温育30分钟且经小牛血清缓冲液用PBS洗涤。

[1657] 通过将细胞与特异性针对小鼠IgM(BD Bioscience)的Fc部分的PE缀合的山羊抗体一起在 4°C 下温育45分钟而对IgM异种反应抗体染色。值得注意的是,也可使用抗小鼠IgG1或IgG2二级抗体。将来自所有组的细胞用含有2%FCS的PBS洗涤两次且接着在FACS系统(BD Biosciences)上进行分析。通过使用对数扩增来收集荧光数据且表示为平均荧光强度。在一些实施方案中,阴性对照血清将显示与无血清或单独的次级对照类似的可忽略的荧光。在一个实施方案中,阳性对照将显示比阴性对照更多的荧光,且比无血清或单独的次级对照更多。在一个实施方案中,在发生免疫原性的情况下,来自未用融合体治疗的小鼠的血清将显示比阴性对照更多的荧光。在一个实施方案中,在不发生免疫原性的情况下,来自未用融合体治疗的小鼠的血清将显示与阴性对照相比类似的荧光。

[1658] 实施例79:在多次施用融合体后测量IgG和IgM抗体反应

[1659] 此实施例描述在多次施用修饰的融合体后,修饰的融合体的体液反应的定量。在一些实施方案中,修饰的融合体(例如通过本文所述的方法修饰)将在多次(例如超过一次,例如2次或更多次)施用修饰的融合体后具有降低的(例如相比于施用未修饰的融合体降低的)体液反应。

[1660] 融合体的免疫原性的一个量度是抗体反应。在一些实施方案中,重复注射融合体可使得产生抗融合体抗体,例如识别融合体的抗体。在一些实施方案中,识别融合体的抗体可以能够限制融合体活性或寿命的方式结合。

[1661] 在此实施例中,在一次或多次施用融合体后检查抗融合体抗体滴度。通过先前实施例中的任一个产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC)、经慢病毒介导的HLA-G表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-HLA-G)和经慢病毒介导的空载体表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-空载体)。血清取自不同的群体:全身和/或局部注射1、2、3、5、10次媒介(未用融合体治疗的组)、MSC融合体、MSC-HLA-G融合体或MSC-空载体融合体注射液的小鼠。

[1662] 为了评估抗融合体抗体的存在和丰度,来自小鼠的血清首先通过加热至56°C后维持30分钟去补体且随后在具有3%FCS和0.1%NaN₃的PBS中稀释33%。将等量的血清和融合体(1×10^2 - 1×10^8 个融合体/毫升)在4°C下温育30分钟且经小牛血清缓冲用PBS洗涤。

[1663] 通过将细胞与特异性针对小鼠IgM(BD Bioscience)的Fc部分的PE缀合的山羊抗体一起在4°C下温育45分钟而对融合体反应性IgM抗体染色。值得注意的是,也可使用抗小鼠IgG1或IgG2二级抗体。将来自所有组的细胞用含有2%FCS的PBS洗涤两次且接着在FACS系统(BD Biosciences)上进行分析。通过使用对数扩增来收集荧光数据且表示为平均荧光强度。

[1664] 在一些实施方案中,相比于MSC融合体或MSC-空载体融合体,MSC-HLA-G融合体将在注射后具有降低的抗融合体IgM(或IgG1/2)抗体滴度(如根据FACS上的荧光强度所测量)。

[1665] 实施例80:修饰融合体源细胞以表达致耐受性蛋白以降低免疫原性

[1666] 此实施例描述衍生自修饰的细胞来源的融合体中的免疫原性的定量。在一些实施方案中,与衍生自未修饰的细胞来源的融合体相比,衍生自修饰的细胞来源的融合体具有降低的免疫原性。

[1667] 刺激免疫反应的疗法有时会降低治疗功效或对受体产生毒性。在一些实施方案中,向个体施用基本上非免疫原性的融合体。在一些实施方案中,可分析细胞来源的免疫原性作为融合体免疫原性的代替。

[1668] 使用慢病毒介导的HLA-G表达或空载体(阴性对照)表达修饰的iPS细胞的免疫原性特性分析如下。将足够数量的iPS细胞作为潜在的融合体细胞来源在后侧皮下注射至C57/B6小鼠中,且给予适当量的时间以允许畸胎瘤形成。

[1669] 一旦形成畸胎瘤便收集组织。将准备用于荧光染色的组织在OCT中冷冻,且将准备用于免疫组织化学和H&E染色的组织固定于10%缓冲福尔马林中且包埋于石蜡中。根据一般免疫组织化学方案,将组织切片用抗体多克隆兔抗人类CD3抗体(DAKO)、小鼠抗人类CD4 mAb(RPA-T4,BD PharMingen)、小鼠抗人类CD8 mAb(RPA-T8,BD PharMingen)染色。通过使

用适当的检测试剂,即抗小鼠次级HRP (Thermofisher) 或抗兔次级HRP (Thermofisher) 检测这些抗体。

[1670] 使用基于过氧化物酶的可视化系统 (Agilent) 实现检测。通过对使用光学显微镜以20×视野检查的25、50或100个组织切片中存在的浸润CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞CD3⁺ NK细胞取平均值来分析数据。在一些实施方案中,与表达HLA-G的iPSC相比,未修饰的iPSC或表达空载体的iPSC将在检查的视野中存在更高数目的浸润CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD3⁺ NK细胞。

[1671] 在一些实施方案中,融合体的免疫原性特性将基本上等同于源细胞。在一些实施方案中,相对于未修饰的对应物,衍生自用HLA-G修饰的iPS细胞的融合体将具有降低的免疫细胞浸润。

[1672] 实施例81:修饰融合体源细胞以敲落免疫原性蛋白质以降低免疫原性

[1673] 此实施例描述衍生自细胞来源的融合体组合物的产生的定量,所述融合体组合物已被修饰以降低具有免疫原性的分子的表达。在一些实施方案中,融合体可衍生自细胞来源,所述融合体已被修饰以降低具有免疫原性的分子的表达。

[1674] 刺激免疫反应的疗法会降低治疗功效或对受体产生毒性。因此,免疫原性对于安全和有效的治疗融合体是重要特性。某些免疫活化剂的表达可产生免疫反应。MHC I类代表免疫活化剂的一个实施例。

[1675] 在此实施例中,通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC,阳性对照)、经慢病毒介导的靶向shRNA的MHC I类的表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-shMHC I类)和经慢病毒介导的非靶向加扰shRNA的表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC加扰,阴性对照)。

[1676] 使用流式细胞测量术对融合体分析MHC I类的表达。将适当数目的融合体洗涤且再悬浮于PBS中,与针对MHC I类的荧光结合的单克隆抗体(Harlan Sera-Lab,Belton,UK)的1:10-1:4000稀释液一起保持于冰上30分钟。将融合体在PBS中洗涤三次且再悬浮于PBS中。使用与等稀释的同型对照抗体一起温育且适当荧光结合的融合体制剂的相等的等分试样来确定非特异性荧光。在流式细胞仪(FACSort,Becton-Dickinson)中分析融合体且用流程分析软件(Becton-Dickinson)来分析数据。

[1677] 比较衍生自MSC、MSC-shMHC I类、MSC-加扰的融合体的平均荧光数据。在一些实施方案中,相比于MSC和MSC-加扰,衍生自MSC-shMHC I类的融合体将具有较低的MHC I类表达。

[1678] 实施例82:修饰融合体源细胞以逃避巨噬细胞吞噬作用

[1679] 此实施例描述通过修饰的融合体逃避吞噬作用的定量。在一些实施方案中,修饰的融合体将通过巨噬细胞逃避吞噬作用。

[1680] 细胞参与吞噬作用,吞噬粒子,使得能够隔离和破坏外来侵入物,如细菌或死细胞。在一些实施方案中,融合体被巨噬细胞吞噬将降低融合体的活性。

[1681] 通过前述实施例中所述的任一种方法来产生融合体。融合体由以下产生:缺少CD47的CSFE标记的哺乳动物细胞(下文称为NMC,阳性对照)、使用慢病毒介导的CD47 cDNA的表达工程化以表达CD47的CSFE标记的细胞(下文称为NMC-CD47)和使用慢病毒介导的空载体对照的表达工程化的CSFE标记的细胞(下文称为NMC-空载体,阴性对照)。

[1682] 根据以下方案通过吞噬作用分析来确定巨噬细胞介导的免疫清除的降低。将巨噬细胞在收获后立即涂铺于共聚焦玻璃底培养皿中。将巨噬细胞在DMEM+10%FBS+1%P/S中温育1小时以附着。如方案中所指示地将适当数目的衍生自NMC、NMC-CD47、NMC-空载体的融合体添加至巨噬细胞,且温育2小时,tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf。

[1683] 2小时后,将培养皿温和地洗涤且检查细胞内荧光。通过共聚焦显微镜在488激发下对由吞噬粒子发出的细胞内荧光成像。使用成像软件对吞噬阳性巨噬细胞的数目进行定量。数据被表示为吞噬指数=(吞噬细胞的总数/计数的巨噬细胞的总数)×(含有吞噬细胞的巨噬细胞的数目/计数的巨噬细胞的总数)×100。

[1684] 在一些实施方案中,相对于衍生自NMC或NMC-空载体的融合体,当巨噬细胞与衍生自NMC-CD47的融合体一起温育时,吞噬指数将减小。

[1685] 实施例83:修饰融合体源细胞以降低由PBMC细胞溶解介导的细胞毒性

[1686] 此实施例描述衍生自细胞的融合体的产生,所述细胞被修饰以具有降低的归因于PBMC细胞溶解的细胞毒性。

[1687] 在一些实施方案中,细胞毒性介导的PBMC对源细胞或融合体的细胞溶解是融合体的免疫原性的量度,因为溶解将降低(例如抑制或终止)融合体的活性。

[1688] 在此实施例中,通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC,阳性对照)、经慢病毒介导的HLA-G表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-HLA-G)和经慢病毒介导的空载体表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-空载体,阴性对照)。

[1689] PBMC介导的融合体溶解是通过如Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) :85-92;1992 & van Besouw et al. Transplantation 70 (1) :136-143;2000中所述的铯释放分析确定的。将PBMC(下文称为效应细胞)从适当供体分离,且在37°C下在圆底96孔板中用同种异体 γ 照射的PBMC和200 IU/mL IL-2 (proleukin, Chiron BV Amsterdam, The Netherlands) 刺激7天。将融合体用铯-二亚乙基三胺五乙酸盐(DTPA) (sigma, St. Louis, MO, USA) 标记。

[1690] 在第7天,通过在涂铺之后,以1000:1-1:1与1:1.25-1:1000范围内的效应细胞/靶细胞比将 ^{63}Eu 标记的融合体与效应细胞一起在96孔板中温育1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48小时来进行细胞毒性介导的溶解分析。在温育后,将板离心且将上清液样品转移至具有低背景荧光的96孔板(荧光免疫板, Nunc, Roskilde, Denmark)。

[1691] 随后,将增强溶液(PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)添加至每个孔。用时间分辨荧光计(Victor 1420多标记计数器, LKB-Wallac, Finland)测量释放的铯。荧光以每秒计数(CPS)表示。通过将适当数目(1×10^2 - 1×10^8)的融合体与1% triton (sigma-aldrich)一起温育适当量的时间来确定由靶融合体释放的铯的最大百分比。通过在没有效应细胞的情况下温育标记的靶融合体来测量由靶融合体自发释放的铯。接着将泄漏百分比计算为:(自发释放/最大释放)×100%。最后,将细胞毒性介导的溶解的百分比计算为%溶解=[(测量的溶解-自发溶解-自发释放)/(最大释放-自发释放)]×100%。通过观察随不同效靶比而变的溶解百分比来分析数据。

[1692] 在一些实施方案中,相比于MSC或MSC-加扰产生的融合体,由MSC-HLA-G细胞产生的融合体将在特定时间点具有减小的靶细胞溶解百分比。

[1693] 实施例84:修饰融合体源细胞以降低NK溶解活性

[1694] 此实施例描述衍生自细胞来源的融合体组合物的产生,所述融合体组合物已被修饰以降低细胞毒性介导的通过NK细胞的细胞溶解。在一些实施方案中,细胞毒性介导的源细胞或融合体通过NK细胞的细胞溶解是融合体的免疫原性的量度。

[1695] 在此实施例中,通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC,阳性对照)、经慢病毒介导的HLA-G表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-HLA-G)和经慢病毒介导的空载体表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-空载体,阴性对照)。

[1696] NK细胞介导的融合体溶解是通过如Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) :85-92; 1992 & van Besouw et al. Transplantation 70 (1) :136-143; 2000中所述的铈释放分析确定的。将NK细胞(下文称为效应细胞)根据Crop等人《细胞移植(Cell transplantation)》(20) :1547-1559; 2011中的方法从适当供体分离,且在37°C下在圆底96孔板中用同种异体 γ 照射的PMBC和200IU/mL IL-2 (proleukin, Chiron BV Amsterdam, The Netherlands) 刺激7天。将融合体用铈-二亚乙基三胺五乙酸盐(DTPA) (sigma, St. Louis, MO, USA) 标记。

[1697] 在第7天,通过在涂铺之后,以1000:1-1:1与1:1.25-1:1000范围内的效应细胞/靶细胞比将⁶³Eu标记的融合体与效应细胞一起在96孔板中温育1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48小时来进行细胞毒性介导的溶解分析。在温育后,将板离心且将上清液样品转移至具有低背景荧光的96孔板(荧光免疫板, Nunc, Roskilde, Denmark)。

[1698] 随后,将增强溶液(PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)添加至每个孔。用时间分辨荧光计(Victor 1420多标记计数器, LKB-Wallac, Finland)测量释放的铈。荧光以每秒计数(CPS)表示。通过将适当数目(1×10^2 - 1×10^8)的融合体与1% triton (sigma-aldrich)一起温育适当量的时间来确定由靶融合体释放的铈的最大百分比。通过在没有效应细胞的情况下温育标记的靶融合体来测量由靶融合体自发释放的铈。接着将泄漏百分比计算为:(自发释放/最大释放) \times 100%。最后,将细胞毒性介导的溶解的百分比计算为%溶解 = [(测量的溶解-自发溶解-自发释放) / (最大释放-自发释放)] \times 100%。通过观察随不同效靶比而变的溶解百分比来分析数据。

[1699] 在一些实施方案中,相比于MSC或MSC-加扰产生的融合体,由MSC-HLA-G细胞产生的融合体将在适当时间点具有减小的溶解百分比。

[1700] 实施例85:修饰融合体源细胞以降低CD8杀手T细胞溶解

[1701] 此实施例描述衍生自细胞来源的融合体组合物的产生,所述融合体组合物已被修饰以降低细胞毒性介导的通过CD8+ T细胞的细胞溶解。在一些实施方案中,细胞毒性介导的源细胞或融合体通过CD8+ T细胞的细胞溶解是融合体的免疫原性的量度。

[1702] 在此实施例中,通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC,阳性对照)、经慢病毒介导的HLA-G表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-HLA-G)和经慢病毒介导的空载体表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-空载体,阴性对照)。

[1703] CD8+ T细胞介导的融合体溶解是通过如Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) :85-92; 1992 & van Besouw et al. Transplantation 70 (1) :136-143; 2000中所述的铈释放分析确定的。将CD8+ T细胞(下文称为效应细胞)根据Crop等人《细胞移植(Cell

transplantation)》(20):1547-1559;2011中的方法从适当供体分离,且在37°C下在圆底96孔板中用同种异体 γ 照射的PMBC和200IU/mL IL-2(proleukin,Chiron BV Amsterdam,The Netherlands)刺激7天。将融合体用铈-二亚乙基三胺五乙酸盐(DTPA)(sigma,St.Louis,MO,USA)标记。

[1704] 在第7天,通过在涂铺之后,以1000:1-1:1与1:1.25-1:1000范围内的效应细胞/靶细胞比将 ^{63}Eu 标记的融合体与效应细胞一起在96孔板中温育1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48小时来进行细胞毒性介导的溶解分析。在温育后,将板离心且将20 μL 上清液转移至具有低背景荧光的96孔板(荧光免疫板,Nunc,Roskilde,Denmark)。

[1705] 随后,将增强溶液(PerkinElmer,Groningen,The Netherlands)添加至每个孔。用时间分辨荧光计(Victor 1420多标记计数器,LKB-Wallac,Finland)测量释放的铈。荧光以每秒计数(CPS)表示。通过将适当数目(1×10^2 - 1×10^8)的融合体与1%triton(sigma-aldrich)一起温育适当量的时间来确定由靶融合体释放的铈的最大百分比。通过在没有效应细胞的情况下温育标记的靶融合体来测量由靶融合体自发释放的铈。接着将泄漏百分比计算为:(自发释放/最大释放) $\times 100\%$ 。最后,将细胞毒性介导的溶解的百分比计算为%溶解=[(测量的溶解-自发溶解-自发释放)/(最大释放-自发释放)] $\times 100\%$ 。通过观察随不同效靶比而变的溶解百分比来分析数据。

[1706] 在一些实施方案中,相比于MSC或MSC-加扰产生的融合体,由MSC-HLA-G细胞产生的融合体将在适当时间点具有减小的溶解百分比。

[1707] 实施例86:修饰融合体源细胞以降低T细胞活化

[1708] 此实施例描述修饰的融合体的产生,所述融合体将具有如通过混合淋巴细胞反应(MLR)评估的降低的T细胞活化和增殖。

[1709] T细胞增殖和活化是融合体的免疫原性的量度。通过融合体组合物在MLR反应中刺激T细胞增殖可表明体内T细胞增殖的刺激。

[1710] 在一些实施方案中,如通过混合淋巴细胞反应(MLR)所评估,从修饰的源细胞产生的融合体具有降低的T细胞活化和增殖。在一些实施方案中,从修饰的源细胞产生的融合体不在体内产生免疫反应,因此维持融合体组合物的功效。

[1711] 在此实施例中,通过先前实施例中所述的任一种方法产生融合体。融合体由以下产生:未修饰的间充质干细胞(下文称为MSC,阳性对照)、经慢病毒介导的IL-10表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-IL-10)和经慢病毒介导的空载体表达修饰的间充质干细胞(下文称为MSC-空载体,阴性对照)。

[1712] BALB/c和C57BL/6脾细胞用作刺激或应答细胞。值得注意的是,这些细胞的来源可与常用的人源性刺激/应答细胞交换。另外,任何哺乳动物纯化的同种异体CD4⁺T细胞群体、CD8⁺T细胞群体或CD4⁻/CD8⁻可用作应答群体。

[1713] 通过机械解离使用完全磨砂的载玻片分离小鼠脾细胞,接着用溶解缓冲液(Sigma-Aldrich,St-Louis,MO)溶解红细胞。在实验之前,用20Gy的 γ 射线照射刺激细胞以防止其与应答细胞反应。接着通过将等量的刺激和应答细胞(或替代浓度,同时维持1:1比率)添加至含完全DMEM-10培养基的圆底96孔板来制备共培养物。在不同的时间间隔($t=0$ 、6、12、24、36、48小时)将适量的融合体(以 1×10^1 - 1×10^8 范围内的若干浓度)添加至共培养物。

[1714] 通过添加 $1\mu\text{Ci}$ 的 $[\text{}^3\text{H}]$ -胸苷 (Amersham, Buckinghamshire, UK) 以允许掺入来评估增殖。在 $t=2, 6, 12, 24, 36, 48, 72$ 小时处将 $[\text{}^3\text{H}]$ -胸苷添加至MLR, 且在2、6、12、18、24、36和48小时的延长培养之后使用96孔细胞收集器 (Inoteck, Bertold, Japan) 将细胞收集至玻璃纤维过滤器上。所有T细胞增殖实验均一式三份地进行。使用microbeta 1 Luminescence 计数器 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) 测量 $[\text{}^3\text{H}]$ -胸苷掺入。结果可表示为每分钟计数 (cpm)。

[1715] 在一些实施方案中, 相比于MSC-空载体或MSC未修饰的融合体对照, MSC-IL10融合体将显示T细胞增殖的减少。

[1716] 实施例87: 测量个体中的靶向潜力

[1717] 此实施例评估融合体靶向特定身体部位的能力。在一些实施方案中, 融合体可靶向特定身体部位。靶向是将治疗剂的活性限制于一个或多个相关治疗部位的方式。

[1718] 向八周龄C57BL/6J小鼠 (Jackson Laboratories) 静脉内注射表达萤火虫萤光素酶的融合体或细胞。通过先前实施例中所述的任一种方法, 从稳定表达萤火虫萤光素酶的细胞或不表达萤光素酶的细胞 (阴性对照) 产生融合体。在融合体或细胞注射后1、2、3、4、5、6、8、12和24小时对小鼠组进行安乐死。

[1719] 在安乐死前五分钟, 小鼠接受以 $150\text{mg}/\text{kg}$ 剂量腹膜内注射的生物发光底物 (Perkin Elmer) 以使萤光素酶可视化。生物发光成像系统被校准以补偿所有装置设置。接着使小鼠安乐死且收集肝脏、肺脏、心脏、脾脏、胰脏、胃肠道和肾脏。成像系统 (Perkin Elmer) 用于获得这些离体器官的生物发光图像。使用辐射光子 (Radiance Photons) 测量生物发光信号, 且将总通量 (Total Flux) 用作测量值。通过围绕离体器官产生感兴趣区域 (ROI), 以得到以光子/秒计的值。计算目标器官 (例如肝脏) 与非目标器官 (例如来自肺脏、心脏、脾脏、胰脏、胃肠道和肾脏的光子/秒的总和) 之间的光子/秒的比, 作为靶向肝脏的量子度。

[1720] 在一些实施方案中, 在融合体和细胞中, 肝脏与其他器官之间的光子/秒的比均将大于1, 这将表明融合体靶向肝脏。在一些实施方案中, 阴性对照动物将在所有器官中显示低得多的光子/秒。

[1721] 实施例88: 测量个体中的外源药剂递送

[1722] 此实施例描述个体中包含外源药剂的融合体的递送的定量。通过先前实施例中所述的任一种方法, 从表达Gaussia萤光素酶的细胞或从不表达萤光素酶的细胞 (阴性对照) 制备融合体。

[1723] 将阳性对照细胞或融合体静脉内注射至小鼠中。使用26号胰岛素注射针在5-8秒内递送融合体或细胞。使用体内成像系统 (Xenogen Corporation, Alameda, CA) 在注射后1、2或3天对小鼠进行体内生物发光成像。

[1724] 在即将使用之前, 在酸化甲醇中制备考伦特嗪, 一种荧光素或发光分子 ($5\text{mg}/\text{mL}$) 且立即注射至小鼠尾静脉中。使用XGI-8气体麻醉系统在加热台上对小鼠进行连续麻醉。

[1725] 通过在紧接在静脉内尾静脉注射考伦特嗪 ($4\mu\text{g}/\text{g}$ 体重) 后的5分钟内获取光子计数来获得生物发光成像。使用软件 (Xenogen) 分析获取的数据且将其覆叠于光视图图像上。使用自动信号强度轮廓工具产生感兴趣区域 (ROI) 且通过相同动物的背景减除进行标准化。使用三个滤光片在580、600和620nm的波长与3-10分钟暴露时间下进行连续数据采集, 以定位小鼠体内的生物发光光源。

[1726] 此外,在每个时间点,通过腹部触诊收集尿液样品。

[1727] 从每只小鼠的尾静脉获得血液样品(50 μ L),放入肝素化或EDTA管中。对于血浆分离,将血液样品在4 $^{\circ}$ C下以1.3 \times g离心25分钟。

[1728] 接着,在将样品与50 μ M Gaussia萤光素酶底物(Nanolight,Pinetop,AZ)混合之后,使用5 μ l血液、血浆或尿液样品进行Gaussia萤光素酶活性分析。

[1729] 在一些实施方案中,阴性对照样品将对萤光素酶呈阴性,且阳性对照样品将来自施用细胞的动物。在一些实施方案中,来自施用表达Gaussia萤光素酶的融合体的动物的样品将在每个样品中对萤光素酶呈阳性。

[1730] 参见例如El-Amouri SS et al.,Molecular biotechnology 53(1):63-73,2013。

[1731] 实施例89:跨融合体的脂质双层的主动转运

[1732] 此实施例描述2-NBDG(2-(N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖)的水平的定量,2-NBDG为一种可用于监测活细胞中的葡萄糖摄取且因此监测跨脂质双层的主动转运的荧光葡萄糖类似物。在一些实施方案中,此分析或等同物可用于测量葡萄糖摄取的水平 and 跨融合体的脂质双层的主动转运。

[1733] 通过先前实施例中所述的任一种方法来产生融合体组合物。接着将足够数量的融合体在不含葡萄糖的DMEM、20%胎牛血清和1 \times 青霉素/链霉素中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育2小时。在2小时葡萄糖饥饿时段之后,改变培养基以使其包括不含葡萄糖的DMEM、20%胎牛血清、1 \times 青霉素/链霉素和20 μ M 2-NBDG(ThermoFisher)且在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育2小时。相同地处理阴性对照融合体,除了添加等量的DMSO(用于2-NBDG的媒剂)来代替2-NBDG。

[1734] 接着将融合体用1 \times PBS洗涤三次且再悬浮于适当缓冲液中,且转移至96孔成像板。接着使用GFP光立方体(469/35激发滤光片和525/39发射滤光片)在荧光计中测量2-NBDG荧光,以定量在1小时装载时段内已跨融合体膜转运且累积于融合体中的2-NBDG的量。

[1735] 在一些实施方案中,相比于阴性(DMSO)对照,经2-NBDG处理的融合体中的2-NBDG荧光将更高。用525/39发射滤光片的荧光测量将与存在的2-NBDG分子的数目相关。

[1736] 实施例90:通过非内吞途径递送融合体

[1737] 此实施例描述通过非内吞途径融合体递送Cre至受体细胞的定量。

[1738] 在一些实施方案中,融合体将通过融合体介导的非内吞途径递送药剂。不希望受理论束缚,在不需要任何内吞作用介导的融合体吸收的情况下将融合体的内腔中携带的药剂(例如Cre)直接递送至受体细胞的细胞溶质将通过融合体介导的非内吞途径递送发生。

[1739] 在此实施例中,融合体在其质膜上包含表达仙台病毒H和F蛋白的HEK293T细胞(Tanaka et al.,2015,Gene Therapy,22(October 2014),1-8.<https://doi.org/10.1038/gt.2014.123>)。另外,融合体表达mTagBFP2荧光蛋白和Cre重组酶。靶细胞为RPMI8226细胞,其在CMV启动子下稳定表达“LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP”盒,所述启动子在通过Cre重组后从GFP转换为RFP表达,表明融合和Cre作为递送标记。

[1740] 如下地对通过本文所述的方法产生的融合体分析通过非内吞途径的Cre递送。将受体细胞涂铺至黑色的透明底部96孔板中。随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达Cre重组酶蛋白且具有特定融合剂蛋白的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。为了确定通过非内吞途径的Cre递送水平,用内体酸化抑制剂氯奎(30 μ g/mL)处理接受融合体的受体细胞的平行组。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细

胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育16小时且通过成像评估药剂递送Cre。

[1741] 对细胞成像以在视场或孔中阳性鉴别RFP阳性细胞相对于GFP阳性细胞。在此实施例中,使用自动化荧光显微镜对细胞板成像。通过首先在DMEM培养基中用Hoechst 33342染色细胞10分钟来确定给定孔中的总细胞群体。Hoechst 33342通过插入至DNA中染色细胞核且因此用于鉴别单个的细胞。在染色之后,将Hoechst培养基用常规DMEM培养基替换。

[1742] 使用405nm LED和DAPI滤光立方体对Hoechst成像。GFP使用465nm LED和GFP滤光立方体成像,而RFP使用523nm LED和RFP滤光立方体成像。通过首先在阳性对照孔;即,用编码Cre重组酶的腺病毒而非融合体处理的受体细胞上确立LED强度和积分时间来采集不同细胞组的图像。

[1743] 设定采集设置,以使得RFP和GFP强度处于最大像素强度值但不饱和。接着使用确立的设置对所关注的孔成像。

[1744] 用与荧光显微镜一起提供的软件或其他软件(Rasband, W. S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2007)进行GFP和RFP阳性孔的分析。使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。在Hoechst阳性细胞上设置总细胞掩码。Hoechst强度显著高于背景强度的细胞用于设置阈限,且排除太小或太大而无法成为Hoechst阳性细胞的区域。

[1745] 在总细胞掩码内,通过对显著高于背景的细胞再次设置阈值且将Hoechst(细胞核)掩码扩展到整个细胞区域以包括整个GFP和RFP细胞荧光来鉴别GFP和RFP阳性细胞。

[1746] 在含有受体细胞的对照孔中鉴别的RFP阳性细胞的数目用于从含有融合体的孔中的RFP阳性细胞的数目减去(以减去非特异性Loxp重组)。接着将RFP阳性细胞(接受Cre的受体细胞)的数目除以GFP阳性细胞(未接受Cre的受体细胞)与RFP阳性细胞的总和,以定量递送至受体细胞群体的融合体Cre的比例。将水平标准化为施用至受体细胞的融合体的给定剂量。为了计算通过非内吞途径递送的融合体Cre的值,确定在存在氯奎的情况下的融合体Cre递送水平(FusL+CQ)以及在不存在氯奎的情况下的融合体Cre递送水平(FusL-CQ)。为了确定通过非内吞途径递送的融合体Cre的标准化值,使用以下方程式:
$$\frac{(\text{FusL-CQ}) - (\text{FusL+CQ})}{(\text{FusL-CQ})}$$

[1747] 在一些实施方案中,对于给定融合体,通过非内吞途径递送的融合体Cre的平均水平将在氯奎处理的受体细胞的0.1-0.95,或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内。

[1748] 实施例91:通过内吞途径递送融合体

[1749] 此实施例描述通过内吞途径融合体递送Cre至受体细胞。

[1750] 在一些实施方案中,融合体将通过融合体介导的内吞途径递送药剂。不希望受理论束缚,在吸收途径具有内吞作用依赖性的情况下将融合体的内腔中携带的药剂(例如货物)递送至受体细胞将通过融合体介导的内吞途径递送发生。

[1751] 在此实施例中,融合体包含微囊泡,所述微囊泡通过将在质膜上表达融合剂蛋白的HEK293T细胞挤出通过2 μ m过滤器而产生(Lin et al., 2016, Biomedical Microdevices, 18(3). doi.org/10.1007/s10544-016-0066-y) (Riedel, Kondor-Koch, & Garoff, 1984, The EMBO Journal, 3(7), 1477-83. 检索自www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6086326)。另外,融

合体表达mTagBFP2荧光蛋白和Cre重组酶。靶细胞为PC3细胞,其在CMV启动子下稳定表达“LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP”盒,所述启动子在通过Cre重组后从GFP转换为RFP表达,表明融合和Cre(作为标记)递送。

[1752] 如下地分析通过本文所述的方法产生的融合体通过内吞途径的Cre递送。将受体细胞涂铺于与待使用的成像系统相容的细胞培养多孔板中(在此实施例中,将细胞涂铺于黑色的透明底部96孔板中)。随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达Cre重组酶蛋白且具有特定融合剂蛋白的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。为了确定通过内吞途径的Cre递送水平,用内体酸化抑制剂氯奎(30 μ g/mL)处理接受融合体的受体细胞的平行组。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育16小时且通过成像评估药剂递送Cre。

[1753] 对细胞成像以在视场或孔中阳性鉴别RFP阳性细胞相对于GFP阳性细胞。在此实施例中,使用自动荧光显微镜对细胞板成像。通过首先在DMEM培养基中用Hoechst 33342染色细胞10分钟来确定给定孔中的总细胞群体。Hoechst 33342通过插入至DNA中染色细胞核且因此用于鉴别单个的细胞。在染色之后,将Hoechst培养基用常规DMEM培养基替换。

[1754] 使用405nm LED和DAPI滤光立方体对Hoechst成像。GFP使用465nm LED和GFP滤光立方体成像,而RFP使用523nm LED和RFP滤光立方体成像。通过首先在阳性对照孔;即,用编码Cre重组酶的腺病毒而非融合体处理的受体细胞上确立LED强度和积分时间来采集不同细胞组的图像。

[1755] 设定采集设置,以使得RFP和GFP强度处于最大像素强度值但不饱和。接着使用确立的设置对所关注的孔成像。

[1756] 用与荧光显微镜一起提供的软件或其他软件(Rasband, W. S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2007)进行GFP和RFP阳性孔的分析。使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。在Hoechst阳性细胞上设置总细胞掩码。Hoechst强度显著高于背景强度的细胞为阈值且排除太小或太大而无法成为Hoechst阳性细胞的区域。

[1757] 在总细胞掩码内,通过对显著高于背景的细胞再次取阈值且将Hoechst(细胞核)掩码扩展到整个细胞区域以包括整个GFP和RFP细胞荧光来鉴别GFP和RFP阳性细胞。

[1758] 在含有受体细胞的对照孔中鉴别的RFP阳性细胞的数目用于从含有融合体的孔中的RFP阳性细胞的数目减去(以减去非特异性Loxp重组)。接着将RFP阳性细胞(接受Cre的受体细胞)的数目除以GFP阳性细胞(未接受Cre的受体细胞)与RFP阳性细胞的总和,以定量递送至受体细胞群体的融合体Cre的比例。将水平标准化为施用至受体细胞的融合体的给定剂量。为了计算通过内吞途径递送的融合体Cre的值,确定在存在氯奎的情况下的融合体Cre递送水平(FusL+CQ)以及在不存在氯奎的情况下的融合体Cre递送水平(FusL-CQ)。为了确定通过内吞途径递送的融合体Cre的标准化值,使用以下方程式:
$$\frac{[(FusL-CQ) - (FusL+CQ)]}{(FusL-CQ)}$$

[1759] 在一些实施方案中,对于给定融合体,通过内吞途径递送的融合体Cre的平均水平将在氯奎处理的受体细胞的0.01-0.6,或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的范围内。

[1760] 实施例92:通过发动蛋白介导的途径、巨胞饮途径或肌动蛋白介导的途径递送融合体

[1761] 此实施例描述通过发动蛋白介导的途径融合体递送Cre至受体细胞。可如先前实施例中所述地产生包含微囊泡的融合体。根据先前实施例对融合体分析通过发动蛋白介导的途径递送Cre,除了一组接受融合体的受体细胞用发动蛋白抑制剂Dynasore (120 μ M)处理。为了计算通过发动蛋白介导的途径递送的融合体Cre的值,确定在存在Dynasore的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL+DS) 以及在不存在Dynasore的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL-DS)。可如先前实施例中所述地计算递送的融合体Cre的标准化值。

[1762] 此实施例还描述通过巨胞饮将Cre递送至受体细胞。可如先前实施例中所述地产生包含微囊泡的融合体。根据先前实施例对融合体分析通过巨胞饮递送Cre,除了一组接受融合体的受体细胞用巨胞饮抑制剂5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利 (EIPA) (25 μ M)处理。为了计算通过发动巨胞饮递送的融合体Cre的值,确定在存在EIPA的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL+EIPA) 以及在不存在EIPA的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL-EIPA)。可如先前实施例中所述地计算递送的融合体Cre的标准化值。

[1763] 此实施例还描述通过肌动蛋白介导的途径融合体递送Cre至受体细胞。可如先前实施例中所述地产生包含微囊泡的融合体。根据先前实施例对融合体分析通过巨胞饮递送Cre,除了一组接受融合体的受体细胞用肌动蛋白聚合抑制剂拉春库林B (6 μ M)处理。为了计算通过肌动蛋白介导的途径递送的融合体Cre的值,确定在存在拉春库林B的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL+LatB) 以及在不存在拉春库林B的情况下的融合体Cre递送水平 (FusL-LatB)。可如先前实施例中所述地计算递送的融合体Cre的标准化值。

[1764] 实施例93:细胞器的递送

[1765] 此实施例描述融合体与细胞的体外融合。在一些实施方案中,融合体与细胞的体外融合可使得将融合体线粒体货物递送至受体细胞。

[1766] 如下地分析通过本文所述的方法所述的方法产生的融合体将其线粒体递送至受体细胞的能力。

[1767] 在此特定实施例中,融合体为HEK293T细胞,所述细胞在其膜上表达融合剂蛋白,以及标记线粒体的线粒体靶向的DsRED (mito-DsRED) 蛋白。将受体细胞涂铺于与待使用的成像系统相容的细胞培养多孔板中(在此实施例中,将细胞涂铺于玻璃底成像培养皿中)。受体细胞稳定表达胞质GFP。

[1768] 随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达mito-DsRED且具有特定融合剂蛋白的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育4小时,且通过暴露于pH 6.0磷酸盐缓冲盐水一分钟(或将对照细胞暴露于pH 7.4磷酸盐缓冲盐水)诱导VSVG介导的融合。在诱导融合后,将细胞再温育16小时且通过成像评估线粒体递送。

[1769] 在此实施例中,将细胞在维持于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下时,在具有63倍油浸物镜的Zeiss LSM 710共聚焦显微镜上成像。GFP经受488nm激光激发,且通过带通495-530nm滤光片记录发射。DsRED经受543nm激光激发,且通过带通560-610nm滤光片记录发射。扫描细胞以阳性鉴别对胞质GFP荧光和mito-DsRED荧光呈阳性的细胞。

[1770] 在相同细胞中发现胞质GFP和mito-DsRED线粒体二者的存在,表明细胞经历了VSVG介导的融合,且因此线粒体已从融合体递送至受体细胞。

[1771] 实施例94:DNA的体外递送

[1772] 此实施例描述使用融合体将DNA体外递送至细胞。此实施例定量融合体使用编码外源基因GFP(一种替代治疗货物)的质粒递送DNA的能力。

[1773] 由通过先前实施例中所述的任一种方法产生的细胞源性囊泡或细胞源性细胞生物物质产生的融合体组合物(除了融合体)被工程化,以使得融合剂与Cre的开放阅读框架同框。在产生融合体后,将其另外用具有编码GFP的序列的质粒(System Biosciences, Inc.)核染。

[1774] 参见例如Chen X, et al., Genes Dis. 2015Mar; 2(1):96-105. DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001。

[1775] 作为阴性对照,将融合体用具有编码 β -肌动蛋白的序列的质粒核染。

[1776] 接着将足够数量的融合体连同具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告子的受体NIH/3T3成纤维细胞细胞系在37°C和5%CO₂下在含有20%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中温育48小时的时段。在48小时温育后,接着通过FACS,使用FACS细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)以561nm激光激发分离tdTomato阳性细胞且在590+/-20nm处收集发射。接着使用DNA提取溶液(Epicentre)分离总DNA且使用扩增600bp片段的特异性针对GFP的引物(参见表22)进行PCR。在凝胶电泳后存在于凝胶上的600bp片段将接着证实向受体细胞的DNA递送的存在。

[1777] 表22. 扩增500bp片段的GFP引物序列

引物	SEQ ID NO:	序列
GFP-F	41	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC
GFP-R	42	GTCCTTTTACCAGACAACCATTAC

[1779] 在一些实施方案中,相比于阴性对照,具有GFP质粒的融合体中通过融合体的体外核酸货物递送更高。在阴性对照中检测到可忽略的GFP荧光。

[1780] 实施例95:体内递送DNA

[1781] 此实施例描述通过融合体将DNA体内递送至细胞。将DNA体内递送至细胞使得在受体细胞内表达蛋白质。

[1782] 体内融合体DNA递送将证明在生物体(小鼠)内的受体细胞中的DNA和蛋白质表达的递送。

[1783] 如本文所述地制备表达肝定向融合剂的融合体。在产生融合体后,将其另外用具有编码Cre重组酶的序列的质粒核染。

[1784] 制备融合体用于体内递送。对融合体悬浮液进行离心。将融合体的集结粒再悬浮于注射用无菌磷酸盐缓冲盐水中。

[1785] 使用核酸检测方法,例如PCR来证实融合体含有DNA。

[1786] 受体小鼠带有一个被CRE蛋白修饰的loxP-萤光素酶基因组DNA基因座,所述蛋白由通过融合体递送的DNA制成,以开启萤光素酶的表达(JAX#005125)。用于此实施例的阳性对照是与小鼠品系配对的受体小鼠的后代,所述品系仅在肝脏中表达来自其自身基因组的相同蛋白质(白蛋白-CRE JAX#003574)。来自此配对的后代带有每个等位基因之一(loxp-

萤光素酶,白蛋白-CRE)。通过向受体小鼠注射不表达融合剂的融合体或具有融合剂但不含 Cre DNA的融合体来进行阴性对照。

[1787] 通过静脉内(IV)尾静脉施用将融合体递送至小鼠中。将小鼠置于市售的小鼠限制器(Harvard Apparatus)中。在限制之前,通过将动物的笼子置于循环水浴上而对动物加热。一旦进入限制器,使动物适应环境。准备由30G针尖、3"长度的PE-10管和28G针组成的IV导管且用肝素化生理盐水冲洗。用70%酒精棉片清洁尾巴。接着,将导管针用镊子固定且缓慢引入至尾侧静脉中,直至血液在管中变得可见。将融合体溶液(约500K-5M融合体)抽吸至1cc结核菌素注射器中且连接至输液泵。将融合体溶液以20 μ L/min的速率递送30秒至5分钟(取决于剂量)。在输注完成后,移开导管,且向注射部位施加压力直至停止任何出血。将小鼠放回其笼子中且使其恢复。

[1788] 在融合后,DNA将被转录和翻译成CRE蛋白,其将接着易位至细胞核以进行重组,从而引起萤光素酶的组成性表达。腹膜内施用D-荧光素(Perkin Elmer,150mg/kg)使得能够通过产生生物发光来检测萤光素酶表达。将动物置于体内生物发光成像室(Perkin Elmer)中,所述室装有锥形麻醉器(异氟醚)以防止动物运动。在注射后8-20分钟之间进行光子收集,以观察由D-荧光素药物动力学清除所致的生物发光最大值。在软件中创建肝脏的特定区域且设置收集暴露时间,以使得计数率高于600(在此区域中),以产生可解释的辐射率(光子/秒/平方厘米/立体弧度)测量值。将生物发光辐射率的最大值记录为生物发光分布的图像。专门监测肝组织,以进行高于背景(未治疗的动物)和阴性对照的辐射率测量。在注射后24小时进行测量以观察萤光素酶活性。接着对小鼠进行安乐死且收集肝脏。

[1789] 通过将新鲜收集的组织浸入4 $^{\circ}$ C下的4%多聚甲醛/0.1M磷酸钠缓冲液pH 7.4中1-3小时来进行固定和包埋。接着将组织浸入4 $^{\circ}$ C下的无菌15%蔗糖/1 \times PBS中(3小时至过夜)。接着将组织包埋于O.C.T.(Baxter编号M7148-4)中。将组织适当地定向在块中以进行切片(横截面)。接着使用以下方法在液氮中冷冻组织:将块的底部三分之一放入液氮中,使其冷冻直至除了O.C.T.中心以外的所有部分都被冷冻,且使得在干冰上结束冷冻。通过低温恒温器将块切成5-7微米的切片,放置在载玻片上且重新冷冻以染色。

[1790] 使用洋地黄毒苷标记的核酸探针(用于CRE DNA和萤光素酶mRNA检测)在组织切片上进行原位杂交(使用标准方法),用洋地黄毒苷荧光抗体标记且通过共聚焦显微镜观察。

[1791] 在一些实施方案中,与未治疗的动物(无CRE且无融合体)和阴性对照相比,阳性对照动物(在不注射融合体的情况下通过繁殖重组)将在肝脏中显示生物发光强度,而与阴性对照(无融合剂的融合体)和未治疗的动物相比,注射药剂的动物将在肝脏中显示生物发光。

[1792] 在实施方案中,相比于阴性对照和未治疗的动物,检测注射药剂的动物的组织切片中的核酸将展示在组织的细胞中检测到CRE重组酶和萤光素酶mRNA,而阳性对照将在整个组织中显示萤光素酶mRNA和CRE重组酶DNA的水平。

[1793] 将通过基于原位杂交的DNA检测和其在动物的受体组织中的共定位来检测由融合体递送DNA的证据。将通过生物发光成像检测由DNA表达的蛋白质的活性。在实施方案中,融合体将递送会引起蛋白质产生和活性的DNA。

[1794] 实施例96:体外递送mRNA

[1795] 此实施例描述融合体与细胞的体外融合。在一些实施方案中,融合体与细胞的体

外融合使得将指定的mRNA递送至受体细胞。

[1796] 如下分析通过本文描述的方法产生的融合体将指定的mRNA递送至受体细胞的能力。在此特定实施例中,融合体为细胞生物物质(缺少细胞核),其由表达Cre和GFP的3T3小鼠成纤维细胞产生。接着用HVJ-E融合剂蛋白处理细胞生物物质以产生融合体。

[1797] 将受体小鼠巨噬细胞涂铺至与待使用的成像系统相容的细胞培养多孔板中(在此实施例中,将细胞涂铺于玻璃底成像培养皿中)。受体细胞在CMV启动子下稳定表达“LoxP-stop-LoxP-tdTomato”盒,所述启动子在通过Cre重组后诱导tdTomato表达,表明向受体细胞递送Cre蛋白。

[1798] 随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达Cre重组酶蛋白且具有特定融合剂蛋白的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育16小时且通过成像评估mRNA递送。

[1799] 成像前,将细胞在DMEM培养基中用1 μ g/mL Hoechst 33342染色10分钟。在此实施例中,将细胞在维持于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下时,在具有63倍油浸物镜的Zeiss LSM 710共聚焦显微镜上成像。Hoechst经受405nm激光激发,且通过带通430-460nm滤光片记录发射。GFP经受488nm激光激发,且通过带通495-530nm滤光片记录发射。tdTomato经受543nm激光激发,且通过带通560-610nm滤光片记录发射。

[1800] 首先,扫描细胞以阳性地鉴别单核tdTomato阳性细胞。tdTomato阳性细胞的存在表明细胞已经历融合,且单个核表明融合是通过细胞生物学融合体供体。首先对这些鉴别的细胞成像且接着随后使用488nm激光进行光漂白,以部分淬灭GFP荧光。接着随时间推移对细胞成像以评估GFP荧光的恢复,这将展示新GFP蛋白的翻译且因此展示通过供体融合体递送的GFP mRNA的存在。

[1801] 使用ImageJ软件(Rasband,W.S.,ImageJ,U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007)进行所关注细胞中的Hoechst、GFP和tdTomato荧光的分析。首先,使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。在光漂白的细胞内,对GFP荧光取阈值以去除背景。接着在光漂白之前和之后的不同时间分析光漂白的细胞的GFP平均荧光强度。

[1802] 在此特定实施例内,将表达Cre和GFP且具有施用的融合剂HVJ-E(+融合剂)的3T3小鼠成纤维细胞细胞生物物质施用至表达“LoxP-stop-LoxP-tdTomato”盒的受体小鼠巨噬细胞。代表性图像和数据在图5中示出。对于此特定实施例,GFP荧光强度在光漂白之后10小时恢复至原始强度的25%,表明在受体细胞中递送主动翻译的mRNA。

[1803] 实施例97:体外递送siRNA

[1804] 此实施例描述通过融合体将短干扰RNA(siRNA)体外递送至细胞。将siRNA体外递送至细胞引起受体细胞内的蛋白质表达的抑制。这可以用于抑制表达对细胞有害的蛋白质的活性,从而使细胞正常运行。

[1805] 如下分析通过本文描述的方法产生的融合体将指定的siRNA递送至受体细胞的能力。如本文所述地制备融合体。在产生融合体后,将其另外用具有特异性抑制GFP的序列的siRNA电穿孔。靶向GFP的双链siRNA的序列为5'GACGUAACGGCCACAAGUUC 3'(SEQ ID NO:43)和其互补序列3'CGCUGCAUUUGCCG GUGUUCA 5'(SEQ ID NO:44)(应注意,在siRNA序列的

3'端处存在2个碱基对长的突出端)。作为阴性对照,将融合体用具有特异性抑制萤光素酶的序列的siRNA电穿孔。靶向萤光素酶的双链siRNA的序列为5'CUUACGCUGAGUACUUCGATT 3'(SEQ ID NO:45)和其互补序列3'TTGA AUGCGACUCAUGAAGCU 5'(SEQ ID NO:46)(应注意,在siRNA序列的3'端处存在2个碱基对长的突出端)。

[1806] 接着将融合体施用至组成性表达GFP的受体细胞。将受体细胞涂铺至黑色的透明底部96孔板中。随后,在涂铺受体细胞后24小时,将表达的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育16小时且通过成像评估药剂递送siRNA。

[1807] 对细胞成像以阳性鉴别视野或孔中的GFP阳性细胞。在此实施例中,使用自动荧光显微镜(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)对细胞板进行成像。通过首先在DMEM培养基中用Hoechst 33342染色细胞10分钟来确定给定孔中的总细胞群体。Hoechst 33342通过插入至DNA中染色细胞核且因此用于鉴别单个的细胞。在染色之后,将Hoechst培养基用常规DMEM培养基替换。

[1808] 使用405nm LED和DAPI滤光立方体对Hoechst成像。使用465nm LED和GFP滤光体对GFP成像。通过首先在未处理的孔;即,未用任何融合体处理的受体细胞上确立LED强度和积分时间来采集不同细胞组的图像。

[1809] 设定采集设置,以使得GFP强度处于最大像素强度值但不饱和。接着使用确立的设置对所关注的孔成像。

[1810] 用与荧光显微镜一起提供的软件或其他软件(Rasband, W.S., ImageJ, 美国国家卫生研究院, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007)进行GFP阳性孔的分析。使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。在Hoechst阳性细胞上设置总细胞掩码。Hoechst强度显著高于背景强度的细胞为阈值且排除太小或太大而无法成为Hoechst阳性细胞的区域。

[1811] 在总细胞掩码内,通过对显著高于背景的细胞再次取阈值且将Hoechst(细胞核)掩码扩展到整个细胞区域以包括整个GFP细胞荧光来鉴别GFP阳性细胞。计算总细胞中的GFP阳性细胞的百分比。

[1812] 在实施方案中,相比于用含有针对萤光素酶的siRNA的融合体处理的孔中的GFP阳性细胞的百分比,用含有针对GFP的siRNA的融合体处理的孔的GFP阳性细胞的百分比将小至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。

[1813] 实施例98:体内递送mRNA

[1814] 此实施例描述通过融合体将信使RNA(mRNA)体内递送至细胞。在一些实施方案中,将mRNA体内递送至细胞引起蛋白质在受体细胞内的表达。在一些实施方案中,此递送方法可用于补充由于基因突变而不存在的蛋白质,允许细胞正常运行,且重定向细胞的活性以执行功能,例如治疗功能。

[1815] 在一些实施方案中,体内递送融合体mRNA表明生物体(例如小鼠)内的受体细胞中的信使RNA递送和蛋白质表达。

[1816] 在一些实施方案中,制备表达肝脏定向的融合剂,且产生表达Cre的mRNA的融合体

用于体内递送。

[1817] 如本文所述地制备融合体。对融合体悬浮液进行离心。将融合体的集结粒再悬浮于注射用无菌磷酸盐缓冲盐水中。

[1818] 使用核酸检测方法,例如PCR来证实融合体表达mRNA。

[1819] 受体小鼠带有一个被CRE蛋白修饰的loxP-萤光素酶基因组DNA基因座,所述蛋白由通过融合体递送的mRNA制成,以开启萤光素酶的表达(JAX#005125)。用于此实施例的阳性对照是与小鼠品系配对的受体小鼠的后代,所述品系仅在肝脏中表达来自其自身基因组的相同蛋白质(白蛋白-CRE JAX#003574)。来自此配对的后代带有每个等位基因之一(loxp-萤光素酶,白蛋白-CRE)。通过向受体小鼠注射不表达融合剂的融合体或具有融合剂但不表达Cre mRNA的融合体来进行阴性对照。

[1820] 通过静脉内(IV)尾静脉施用将融合体递送至小鼠中。将小鼠置于市售的小鼠限制器(Harvard Apparatus)中。在限制之前,通过将动物的笼子置于循环水浴上而对动物加热。一旦进入限制器,使动物适应环境。准备由30G针尖、3"长度的PE-10管和28G针组成的IV导管且用肝素化生理盐水冲洗。用70%酒精棉片清洁尾巴。接着,将导管针用镊子固定且缓慢引入至尾侧静脉中,直至血液在管中变得可见。将融合体溶液(约500K-5M融合体)抽吸至1cc结核菌素注射器中且连接至输液泵。将融合体溶液以20 μ L/min的速率递送30秒至5分钟(取决于剂量)。在输注完成后,移开导管,且向注射部位施加压力直至停止任何出血。将小鼠放回其笼子中且使其恢复。

[1821] 在融合后,mRNA在受体细胞质中翻译为CRE蛋白,其接着易位至细胞核以进行重组,引起萤光素酶的组成性表达。腹膜内施用D-荧光素(Perkin Elmer,150mg/kg)使得能够通过产生生物发光来检测萤光素酶表达。将动物置于体内生物发光成像室(Perkin Elmer)中,所述室装有锥形麻醉器(异氟醚)以防止动物运动。在注射后8-20分钟之间进行光子收集,以观察由D-荧光素药物动力学清除所致的生物发光最大值。在软件中创建肝脏的特定区域且设置收集暴露时间,以使得计数率高于600(在此区域中),以产生可解释的辐射率(光子/秒/平方厘米/立体弧度)测量值。将生物发光辐射率的最大值记录为生物发光分布的图像。专门监测肝组织,以进行高于背景(未治疗的动物)和阴性对照的辐射率测量。在注射后24小时进行测量以观察萤光素酶活性。接着对小鼠进行安乐死且收集肝脏。

[1822] 通过将新鲜收集的组织浸入4 $^{\circ}$ C下的4%多聚甲醛/0.1M磷酸钠缓冲液pH 7.4中1-3小时来进行固定和包埋。接着将组织浸入4 $^{\circ}$ C下的无菌15%蔗糖/1 \times PBS中(3小时至过夜)。接着将组织包埋于O.C.T. (Baxter编号M7148-4)中。将组织适当地定向在块中以进行切片(横截面)。接着使用以下方法在液氮中冷冻组织:将块的底部三分之一放入液氮中,使其冷冻直至除了O.C.T.中心以外的所有部分都被冷冻,且使得在干冰上结束冷冻。通过低温恒温器将块切成5-7微米的切片,放置在载玻片上且重新冷冻以染色。

[1823] 使用洋地黄毒苷标记的RNA探针(用于CRE mRNA和萤光素酶mRNA检测)在组织切片上进行原位杂交(使用标准方法),用洋地黄毒苷荧光抗体标记且通过共聚焦显微镜观察。

[1824] 在一些实施方案中,相比于未治疗的动物(例如无CRE或融合体)和阴性对照,阳性对照动物(例如在不注射融合体的情况下通过繁殖重组)将显示肝脏中的生物发光强度。在一些实施方案中,相比于阴性对照(例如无融合剂的融合体)和未治疗的动物,注射融合体的动物将显示肝脏中的生物发光。

[1825] 在一些实施方案中,相比于阴性对照和未治疗的动物,检测施用融合体的动物的组织切片中的mRNA将展示在组织的细胞中检测到CRE重组酶和萤光素酶mRNA。在一些实施方案中,阳性对照将在整个组织中显示萤光素酶mRNA和CRE重组酶mRNA的水平。

[1826] 在一些实施方案中,将通过基于原位杂交的mRNA检测和其在动物的受体组织中的共定位来检测由融合体递送mRNA的证据。在一些实施方案中,通过生物发光成像检测由通过融合体递送的mRNA表达的蛋白质的活性。在一些实施方案中,融合体递送将引起蛋白质产生和活性的mRNA。

[1827] 实施例99:体外递送蛋白质

[1828] 此实施例表明融合体与细胞的体外融合。在此实施例中,融合体与细胞的体外融合使得将Cre蛋白递送至受体细胞。

[1829] 在此实施例中,融合体由具有仙台病毒HVJ-E蛋白的3T3小鼠成纤维细胞产生(Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22 (October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12)。另外,融合体表达Cre重组酶。靶细胞为初级HEK293T细胞,其在CMV启动子下稳定表达“LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP”盒,所述启动子在通过Cre重组后从GFP转换为RFP表达,表明融合和Cre(作为标记)递送。

[1830] 如下分析通过本文描述的方法产生的融合体将Cre蛋白递送至受体细胞的能力。将受体细胞涂铺于与待使用的成像系统相容的细胞培养多孔板中(在此实施例中,将细胞涂铺于黑色的透明底96孔板中)。随后,在涂铺受体细胞之后24小时,将表达Cre重组酶蛋白且具有特定融合剂蛋白的融合体施用至DMEM培养基中的受体细胞。融合体的剂量与涂铺于孔中的受体细胞的数目相关。在施用融合体之后,将细胞板以400g离心5分钟,以帮助引发融合体与受体细胞之间的接触。接着将细胞温育16小时且通过成像评估蛋白质递送。

[1831] 对细胞成像以在视场或孔中阳性鉴别RFP阳性细胞相对于GFP阳性细胞。在此实施例中,使用自动显微镜对细胞板成像。通过首先在DMEM培养基中用1 μ g/mL Hoechst 33342染色细胞10分钟来确定给定孔中的总细胞群体。Hoechst 33342通过插入至DNA中染色细胞核且因此用于鉴别单个的细胞。在染色之后,将Hoechst培养基用常规DMEM培养基替换。使用405nm LED和DAPI滤光立方体对Hoechst成像。GFP使用465nm LED和GFP滤光立方体成像,而RFP使用523nm LED和RFP滤光立方体成像。通过首先在阳性对照孔;即,用编码Cre重组酶的腺病毒处理的细胞上确立LED强度和积分时间来采集不同细胞组的图像。设定采集设置,以使得RFP和GFP强度处于最大像素强度值但不饱和。接着使用确立的设置对所关注的孔成像。

[1832] 在随LionHeart FX一起提供的Gen5软件中或通过ImageJ软件(Rasband, W. S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007)进行Hoechst、GFP和RFP阳性孔的分析。首先,使用60 μ m宽度的滚球背景减除算法对图像进行预处理。随后,在Hoechst阳性细胞上设置总细胞掩码。Hoechst强度显著高于背景强度的细胞为阈值且排除太小或太大而无法成为Hoechst阳性细胞的区域。在总细胞掩码内,通过对显著高于背景的细胞再次取阈值且将Hoechst(细胞核)掩码扩展到整个细胞区域以包括整个GFP和RFP细胞荧光来鉴别GFP和RFP阳性细胞。

[1833] 在仅含有受体细胞的对照孔中鉴别的RFP阳性细胞的数目用于从含有融合体的孔中的RFP阳性细胞的数目减去(以减去非特异性Loxp重组)。接着将RFP阳性细胞(接受药剂

的受体细胞)的数目除以GFP阳性细胞(未接受药剂的受体细胞)与RFP阳性细胞的总和,以定量受体细胞群体内的融合体药剂递送的分。

[1834] 在此特定实施例内,将表达Cre且具有(+融合剂)或不具有(-融合剂)施用的融合剂HVJ-E的3T3小鼠成纤维细胞施用至表达“LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP”盒的受体293T细胞。通过在受体细胞中诱导RFP表达来评估Cre蛋白的递送。图6中的图示出了对Hoechst染色呈阳性的总细胞(每对中的最左边的条)中的RFP阳性细胞(每对中的最右边的条)的定量。对于此特定实施例,对于具有HVJ-E融合剂的3T3 Cre细胞,递送至受体细胞的融合体的分数为0.44。

[1835] 实施例100:体内递送蛋白质

[1836] 此实施例描述通过融合体将治疗剂递送至眼部。

[1837] 融合体使用先前实施例中所述的任一种方法衍生自造血干细胞和祖细胞且装载有缺乏小鼠基因敲除的蛋白质。

[1838] 将融合体视网膜下注射至缺乏蛋白质的小鼠右眼中,且将媒剂对照注射至小鼠左眼中。当小鼠达到2个月大时,对其中的一部分进行安乐死。

[1839] 对收集的视网膜组织进行组织学和H&E染色,以计数小鼠的每个视网膜中获救的细胞的数目(描述于Sanges等人,《临床调查杂志(The Journal of Clinical Investigation)》,126(8):3104-3116,2016中)。

[1840] 通过用特异性针对PDE6B蛋白的抗体进行蛋白质印迹,在从2个月大时安乐死的小鼠收集的视网膜中测量注射的蛋白质的水平。

[1841] 在一些实施方案中,相比于用媒剂处理的小鼠右眼,施用融合体小鼠左眼将具有存在于视网膜的外核层中的增加数目的核。增加的蛋白质暗示突变的PBE6B蛋白质的互补。

[1842] 实施例101:递送以编辑受体DNA

[1843] 此实施例描述用于将基因组CRISPR-Cas9编辑机构体外递送至细胞的融合体。在一些实施方案中,通过融合体将基因组CRISPR-Cas9编辑机构体外递送至细胞导致受体细胞中的特定蛋白质的功能缺失。在此实施例中,提及的基因组编辑机构为与特异性针对GFP的向导RNA(gRNA)复合的化脓性链球菌(*S. pyogenes*) Cas9蛋白。

[1844] 在一些实施方案中,融合体为递送治疗剂的底物。在一些实施方案中,可以高特异性和效率递送至细胞的治疗剂,如基因组编辑机构可用于灭活基因,且因此,后续基因产物(例如蛋白质)在以高水平或在错误细胞类型中表达时变为病理的。

[1845] 通过先前实施例中所述的任一种方法产生的融合体组合物(除了融合体)被工程化,以使得融合体还包括与特异性针对A. Victoria EGFP的序列的向导RNA(gRNA)序列复合的化脓性链球菌Cas9蛋白。这通过共核染具有新霉素抗性基因的开放阅读框架的PiggyBac载体来实现,新霉素抗性基因与化脓性链球菌Cas9的开放阅读框架框内融合,由P2A裂解序列分离。另外的共核染的PiggyBac载体还包括由U6启动子驱动的gRNA序列(GAAGTTCGAGGGCGACACCC (SEQ ID NO:47))。作为阴性对照,融合体被工程化,使得融合体包括与不特异性针对小鼠基因组中的任何靶标的加扰gRNA(GCACTACCAGAGCTAACTCA (SEQ ID NO:48))序列复合的化脓性链球菌Cas9蛋白。

[1846] 将足够数量的融合体连同NIH/3T3 GFP+细胞在37°C和5%CO₂下在含有20%胎牛

血清和1×青霉素/链霉素的DMEM中温育48小时的时段。在48小时温育后,制备基因组DNA且用作模板,所述模板具有特异性针对GFP基因中预测的gRNA裂解位点的500bp内的区域的引物(参见表23)。

[1847] 表23.用于TIDE分析的扩增500bp片段的GFP引物序列

引物	SEQ ID NO:	序列
GFP-F	41	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC
GFP-R	42	GTCCTTTTACCAGACAACCATTAC

[1849] 接着纯化PCR扩增子,通过毛细管测序进行测序且接着上传至Tide Calculator,一种快速评估由向导RNA确定的通过靶基因座的CRISPR-Cas9的基因组编辑的网络工具。基于来自两个标准毛细管测序反应的定量序列跟踪数据,软件定量编辑效果。在具有GFP基因座的预测的gRNA裂解位点处的插入缺失(插入或缺失)导致细胞中的GFP表达的损失,且通过FACS,使用FACS分析(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)以488nm氩激光激发定量,且发射收集于530+/-30nm。FACS软件用于采集和分析。将光散射设定为线性增益,且将荧光通道设定为对数标度,在每种条件下分析最少10,000个细胞。基于每个样品中的GFP信号强度计算插入缺失和GFP功能的后续缺失。

[1850] 在一些实施方案中,相比于阴性对照,在具有GFP基因座的预测的gRNA裂解位点处的插入缺失(插入或缺失)和细胞中的GFP荧光损失将表明融合体编辑DNA且在体外导致蛋白质功能缺失的能力。在一些实施方案中,具有加扰gRNA序列的融合体将不展示插入缺失或后续蛋白质功能缺失。

[1851] 实施例102:评估施用融合体后的畸胎瘤形成

[1852] 此实施例描述不存在通过融合体形成畸胎瘤。在一些实施方案中,融合体在向个体施用时将不会导致畸胎瘤形成。

[1853] 通过先前实施例中所描述的任一种方法来产生融合体。将融合体、肿瘤细胞(阳性对照)或媒介(阴性对照)在PBS中皮下注射至小鼠(12-20周龄)的左侧腹中。在融合体、肿瘤细胞或媒介注射后的八周,通过用卡尺测量测定肿瘤体积而每周分析畸胎瘤(例如肿瘤)生长2-3次。

[1854] 在一些实施方案中,通过卡尺测量,施用融合体或媒介的小鼠将不具有可测量的肿瘤形成,例如畸胎瘤。在一些实施方案中,用肿瘤细胞处理的阳性对照动物将展示可观的肿瘤(例如畸胎瘤)尺寸,如通过卡尺在八周观察中所测量。

[1855] 实施例103:融合体将活性蛋白体内递送至个体的受体细胞

[1856] 此实施例表明融合体可向个体体内递送蛋白质。这通过核编辑蛋白Cre的递送例示。一旦在细胞内部,Cre易位至细胞核,在其中重新组合且切除两个LoxP位点之间的DNA。当两个LoxP位点之间的DNA为终止密码子且在远端荧光蛋白(如红色荧光蛋白tdTomato)的上游时,可用显微镜测量Cre介导的重组。

[1857] 将购自Takara(Cre Recombinase Gesicles, Takara产品631449)的含有CRE和融合剂VSV-G的融合体注入B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}/J小鼠(Jackson Laboratories品系007909)中。以表24中所述的解剖部位、注射体积和注射部位向动物注射。不具有tdTomato且注射融合体的小鼠(FVB.129S6(B6)-GT(ROSA)26Sor^{tm1(Luc)Kael}/J, Jackson Laboratories品系005125)和未注射融合体的B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG}

-tdTomato)^{Hze}/J小鼠用作阴性对照。

[1858] 表24:注射参数

解剖部位	注射体积	注射部位
脑	10 μ L	前后轴:-2 横轴/中轴:1.8 腹侧:1.5 侧:右侧
眼睛	1 μ L	玻璃体内
肝脏	25 μ L	额叶中心
脾脏	10 μ L	在纵向和横向均大约在中心
肾脏	20 μ L	左肾中心
小肠衬里	10 μ L	在腹膜外分离最接近腹膜壁的小肠袢, 且将其注入衬里中。
心脏	5 μ L	顶点附近
白色脂肪(附睾脂肪垫)	25 μ L	左侧、顶部和中心
褐色脂肪(肩胛内)	25 μ L	左叶, 如尽可能中心
肺脏	10 μ L	右肺下叶
睾丸	10 μ L	左睾丸, 尽可能中心
卵巢	1 μ L	左卵巢, 如尽可能中心

[1860] 注射后两天处死动物且收集样品。将样品固定于2%PFA中8小时,在30%蔗糖中固定过夜,且运送以立即包埋于OCT中且切成切片。将切片用DAPI染色(针对细胞核)。用显微镜对DAPI和tdTomato荧光成像。

[1861] 表24中所列的所有解剖部位均展示tdTomato荧光(图9)。另外,使用荧光显微镜检查tdTomato确认了向肌肉组织的递送(图11)。阴性对照小鼠没有任何具有tdTomato荧光的组织。此结果表明融合体能够在各种解剖部位打开小鼠细胞中的tdTomato荧光,且如果未用融合体治疗小鼠或如果小鼠的基因组中不具有tdTomato,则不会发生这种情况。因此,融合体将活性Cre重组酶体内递送至小鼠细胞的细胞核。

[1862] 还显示不同施用途径可体内递送融合体至组织。将购自Takara的含有CRE和融合剂VSV-G的融合体(Cre Recombinase Vesicles, Takara产品631449)肌肉内(50 μ L至右胫骨肌前肌)、腹膜内(50 μ L至腹膜腔)和皮下(50 μ L在背部皮肤下)注射至FVB.129S6(B6)-GT(ROSA)26Sor^{tm1(Luc)^{Kael}}/J(Jackson Laboratories品系005125)。

[1863] 通过使用化学脱毛剂将区域脱毛45秒,接着用水冲洗3次而分别准备用于肌肉内、腹膜内和皮下注射的腿部、腹侧和背部皮肤。

[1864] 在注射后第3天,体内成像系统(Perkin Elmer)用于获得生物发光的全动物图像。在成像前五分钟,小鼠接受以150mg/kg剂量腹膜内注射的生物发光底物(Perkin Elmer)以使萤光素酶可视化。成像系统被校准以补偿所有装置设置。

[1865] 通过所有三种途径施用均引起发光(图10),表明将活性Cre重组酶成功地体内递送至小鼠细胞。

[1866] 总之,融合体能够将活性蛋白体内递送至个体的细胞。

[1867] 实施例104:融合体中超声处理介导的核酸装载

[1868] 此实施例描述通过超声处理将核酸有效负载装载至融合体中。超声处理方法公开于例如Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016) 中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[1869] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。将大约 10^6 个融合体与5-20 μ g核酸混合且在室温下温育30分钟。接着使用以40kHz操作的水浴超声发生器(Brason型号#1510R-DTH)将融合体/核酸混合物在室温下超声处理30秒。接着将混合物置于冰上一分钟,接着以40kHz进行第二轮超声处理30秒。接着将混合物在4 $^{\circ}$ C下以16,000g离心5分钟以将含核酸的融合体制成集结粒。去除含有未合并的核酸的上清液且将集结粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。在DNA装载之后,将融合体在使用之前保持于冰上。

[1870] 实施例105:融合体中超声处理介导的蛋白质装载

[1871] 此实施例描述通过超声处理将蛋白质有效负载装载至融合体中。超声处理方法公开于例如Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016) 中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[1872] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。将大约 10^6 个融合体与5-20 μ g蛋白质混合且在室温下温育30分钟。接着使用以40kHz操作的水浴超声发生器(Brason型号#1510R-DTH)将融合体/蛋白质混合物在室温下超声处理30秒。接着将混合物置于冰上一分钟,接着以40kHz进行第二轮超声处理30秒。接着将混合物在4 $^{\circ}$ C下以16,000g离心5分钟以将含蛋白质的融合体制成集结粒。去除含有未合并的蛋白质的上清液且将集结粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。在蛋白质装载之后,将融合体在使用之前保持于冰上。

[1873] 实施例106:融合体中疏水载体介导的核酸装载

[1874] 此实施例描述通过疏水载体将核酸有效负载装载至融合体中。疏水性装载的示例性方法公开于例如Didiot et al., Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing, Molecular Therapy 24(10):1836-1847, (2016) 中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[1875] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。RNA分子的3'端结合至生物活性疏水结合物(三乙二醇-胆固醇)。通过在以500rpm振荡的情况下在37 $^{\circ}$ C下温育90分钟,将大致 10^6 个融合体(1mL)与10 μ mol/l的siRNA结合物在PBS中混合。疏水载体介导RNA与融合体膜的结合。在一些实施方案中,一些RNA分子被并入融合体的内腔中,且一些存在于融合体的表面上。通过在4 $^{\circ}$ C下在台式超速离心机中使用TLA-110转子以100,000g超速离心1小时,将未装载的融合体与装载有RNA的融合体分离。未装载的融合体保留在上清液中,且装载有RNA的融合体形成集结粒。将装载有RNA的融合体再悬浮于1mL PBS中,且在使用之前保持于冰上。

[1876] 实施例107:加工融合体

[1877] 此实施例描述融合体的加工。通过先前实施例中所述的任一种方法产生的融合体可以被进一步加工。

[1878] 在一些实施方案中,融合体首先被均质化,例如通过超声处理。例如,超声处理方案包括使用将微探针振幅设置于8的MSE超声发生器(Instrumentation Associates,N.Y.)进行5秒超声处理。在一些实施方案中,此短时间超声处理足以使得融合体的质膜破裂成均匀尺寸的融合体。在这些条件下,细胞器膜不会被破坏且将其通过离心(3,000rpm,15min 4℃)去除。接着如实施例16中所述地通过差速离心纯化融合体。

[1879] 将融合体挤压通过可商购的聚碳酸酯膜(例如购自Sterlitech,Washington)或可商购自Pall Execia,France的不对称陶瓷膜(例如Membralox)是将融合体尺寸减小为相对明确定义的尺寸分布的有效方法。通常,悬浮液循环通过膜一次或多次,直至实现所需融合体尺寸分布。融合体可挤压通过依次更小的孔隙膜(例如400nm、100nm和/或50nm孔隙大小)以实现尺寸的逐渐减小和均匀分布。

[1880] 在一些实施方案中,在融合体生产的任何步骤,但通常在均质化、超声处理和/或挤压步骤之前,可将医药剂(如治疗剂)添加至反应混合物,使得所得融合体囊封医药剂。

[1881] 实施例108:测量融合体和源细胞中的总RNA

[1882] 此实施例描述定量融合体相对于源细胞中的RNA的量的方法。在一些实施方案中,融合体将具有与源细胞类似的RNA水平。在此分析中,通过测量总RNA来确定RNA水平。

[1883] 通过先前实施例中所述的任一种方法来制备融合体。如根据融合体和源细胞的蛋白质所测量的相同质量的制剂用于分离总RNA(例如使用试剂盒,如Qiagen RNeasy目录号74104),接着使用标准光谱法测定RNA浓度,以评估RNA的吸光度(例如使用Thermo Scientific NanoDrop)。

[1884] 在一些实施方案中,以蛋白质的质量计,融合体中的RNA的浓度将为源细胞的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%。

[1885] 实施例109:与T细胞体外融合的融合体

[1886] a.DNA有效载荷

[1887] 该实施例描述了使用融合体将DNA体外递送至CD3⁺ T细胞。该实施例使用编码外源基因的质粒,针对CD19的嵌合抗原受体(其是治疗性货物)来定量融合体递送DNA的能力。

[1888] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法产生的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框架内,但由P2A自裂解肽序列分隔。产生了融合体后,另外用具有编码CAR的序列的质粒对其进行核转染。

[1889] 参见,例如,Chen X,et al.,Genes Dis.2015Mar;2(1):96-105.DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001。

[1890] 作为阴性对照,将融合体用编码GFP的质粒进行核转染。

[1891] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体CD3⁺ T细胞一起在37℃和5%CO₂下于包含补充有5%胎牛血清(FBS)(Gibco,LAX,CA,USA)、100mL⁻¹青霉素、100μg mL⁻¹链霉素、1.25μg mL⁻¹两性霉素B、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和100U mL⁻¹ hIL-2(PerproTech,Rocky Hill,CT,USA)的X-VIVO 15培养基(Lonza,Basel,CH,Switzerland)的T细胞培养基中温育48小时。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的CD3⁺ T细胞融合导致tdTomato表达,这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。温育48小时后,然后使用FACS细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,

CA, USA) 经由FACS分离tdTomato阳性细胞, 其中用561nm激光激发, 并在590+/-20nm处收集发射光。然后使用DNA提取溶液 (Epicentre) 分离总DNA。使用QuantStudio3实时PCR系统 (ThermoFisher Scientific) 和TaqMan® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific)、100ng DNA模板、特异于抗CD19 CAR的可变区的引物和探针组 (使用Taqman在线引物和探针设计程序) 进行实时定量PCR。通过对编码CAR的质粒进行系列稀释, 制备了用于绝对定量抗CD19 CAR转基因DNA拷贝的标准曲线。使用beta-内酰胺酶 (AMPr基因) 特异的引物和探针组对DNA量进行标准化。C_t值用于比较用具有CAR质粒的融合体或阴性对照处理的CD3+ T细胞中CAR DNA的量。

[1892] 在一些实施方案中, 与阴性对照相比, 在具有CAR质粒的融合体中, 用融合体体外递送DNA货物更高。

[1893] b.mRNA有效载荷

[1894] 该实施例描述了使用融合体将mRNA在体外递送至CD3+ T细胞。该实施例定量了融合体递送编码外源基因的mRNA的能力, 所述外源基因是针对CD19的嵌合抗原受体 (其是治疗性货物)。

[1895] 融合体组合物, 其由通过前述实施例中任一种方法生产的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生, 除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框内, 但由P2A自裂解肽序列分隔。产生了融合体后, 另外用具有编码CAR的序列的mRNA对其进行了核转染。参见, 例如, Chen X, et al., Genes Dis. 2015Mar; 2 (1): 96-105. DOI: 10.1016/j.gendis.2014.12.001。

[1896] 作为阴性对照, 将融合体用编码GFP的mRNA进行核转染。

[1897] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体CD3+ T细胞一起在37°C和5%CO₂下于包含补充有5%胎牛血清 (FBS) (Gibco, LAX, CA, USA)、100U mL⁻¹青霉素、100μg mL⁻¹链霉素、1.25μg mL⁻¹两性霉素B、2mM L-谷氨酰胺 (Gibco) 和100U mL⁻¹IL-2 (PerproTech, Rocky Hill, CT, USA) 的X-VIVO 15培养基 (Lonza, Basel, CH, Switzerland) 的T细胞培养基中温育48小时。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的CD3+ T细胞融合导致tdTomato表达, 这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。温育48小时后, 然后使用FACS细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 经由FACS分离tdTomato阳性细胞, 其中激发561nm激光, 并在590+/-20nm处收集发射光。

[1898] 分离总RNA (例如, 使用试剂盒如Qiagen RNeasy catalog#74104), 然后使用标准光谱法确定RNA浓度, 以评估RNA的吸光度 (例如, 使用Thermo Scientific NanoDrop)。使用用于RT-PCR的Superscript III第一链合成超混合物 (Thermo Fisher Scientific) 进行逆转录, 并将RNA (100ng) 逆转录为cDNA。使用QuantStudio3实时PCR系统 (ThermoFisher Scientific) 和TaqMan® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific)、100ng DNA模板、特异于抗CD19 CAR的可变区的引物和探针组 (使用Taqman在线引物和探针设计程序) 进行实时定量PCR, 设计以于扩增β-肌动蛋白的探针组作为内源性上样对照。C_t值用于比较qRT-PCR反应中用含有CAR mRNA的融合体处理的CD3+ T细胞和用含有阴性对照的融合体处理的CD3+ T细胞之间的CAR cDNA的量。相对表达式是使用ΔΔC_t方法计算的。CAR的相对表达水平较高是由于从分选的CD3+ T细胞中纯化出的CAR mRNA水平较高。

[1899] 在一些实施方案中,与阴性对照融合体相比,在含有CAR mRNA的融合体中用融合体体外递送mRNA货物更高。

[1900] c.蛋白质/mRNA有效载荷,其中有效载荷由供体细胞表达

[1901] 该实施例描述了融合体与细胞在体外的融合。在一些实施方案中,融合体与CD3+ T细胞的体外融合导致嵌合抗原受体蛋白递送至CD3+ T细胞的膜。

[1902] 融合体组合物,其由通过前述实施例中任一种方法生产的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框和具有靶向CD19的CAR的开放阅读框在框内,分别由P2A和T2A自切割肽序列分隔。阴性对照融合体经工程化改造,使融合剂与Cre的开放阅读框和蓝色荧光蛋白mTagBFP2的开放阅读框在框内,并分别被P2A自裂解肽序列隔开。参见,例如,Chen X, et al., Genes Dis. 2015Mar; 2(1):96-105. DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001。

[1903] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体CD3+ T细胞一起在37°C和5%CO₂下于包含补充有5%胎牛血清(FBS)(Gibco,LAX,CA,USA)、100mL⁻¹青霉素、100μg mL⁻¹链霉素、1.25μg mL⁻¹两性霉素B、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和100U mL⁻¹hIL-2(PerproTech,Rocky Hill,CT,USA)的X-VIVO 15培养基(Lonza,Basel,CH,Switzerland)的T细胞培养基中温育48小时。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的CD3+ T细胞融合导致tdTomato表达,这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。温育48小时后,然后使用FACS细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,CA,USA)经由FACS分离tdTomato阳性细胞,其中激发561nm激光,并在590+/-20nm处收集发射光。

[1904] 测定了向分选的T细胞的mRNA递送。分离总RNA(例如,使用试剂盒如Qiagen RNeasy catalog#74104),然后使用标准光谱法确定RNA浓度,以评估RNA的吸光度(例如,使用Thermo Scientific NanoDrop)。使用用于RT-PCR的Superscript III第一链合成超混合物(Thermo Fisher Scientific)进行逆转录,并将RNA(100ng)逆转录为cDNA。使用QuantStudio3实时PCR系统(ThermoFisher Scientific)和TaqMan®Fast Advanced Master Mix(ThermoFisher Scientific)、100ng DNA模板、特异于抗CD19 CAR的可变区的引物和探针组(使用Taqman在线引物和探针设计程序)进行实时定量PCR,设计以扩增β-肌动蛋白的探针组作为内源性上样对照。C_t值用于比较qRT-PCR反应中用含有CAR mRNA的融合体处理的CD3+ T细胞和用含有阴性对照的融合体处理的CD3+ T细胞之间的CAR cDNA的量。相对表达式是使用ΔΔC_t方法计算的。CAR的相对表达水平较高是由于从分选的CD3+ T细胞中纯化出的CAR mRNA水平较高。

[1905] 在一些实施方案中,与衍生自表达CFP的细胞的阴性对照融合体相比,在衍生自表达CAR的细胞的融合体中用融合体体外递送CAR mRNA货物更高。

[1906] 测定在分选的细胞表面上的CAR表达。如De Oliveira et al., J Transl Med 11: 23, 2013中所述,将分选的tdTomato+CD3+细胞与缀合质Alexa Fluor 488的CD19sIg1-4(CD19sIg1-4:AF488)进行温育。CD19sIg1-4:AF488标记表达CD19 CAR的细胞。在通过来自AB血浆的人血清(Sigma-Aldrich)封闭10分钟后,将2×10⁵个细胞与450ng CD19sIg1-4:AF488在4°C下于黑暗中温育30分钟。用PBS洗涤两次后,在运行FACSDiva™软件(BD Biosciences,San Jose,CA.)的LSR II(BD Biosciences,San Jose,CA.)机器上分析细胞。

将与阴性对照融合剂一起温育的tdTomato+CD3+细胞用于建立CD19sIg1-4:AF488信号的阴性门控。选择门,使得CD19sIg1-4:AF488阳性事件的百分比等于0.0%。在用衍生自表达CAR的细胞的融合体处理的分选细胞中测量CD19sIg1-4:AF488阳性事件的百分比。

[1907] 在一些实施方案中,与衍生自表达mTagBFP2的细胞的阴性对照融合体相比,在用衍生自表达CAR的细胞的融合体处理的细胞中,具有表面CAR表达的分选细胞的百分比更高。

[1908] 实施例110:与T细胞体外融合的T细胞特异性融合体

[1909] 该实施例描述了对于体外CD3+ T细胞优先的融合体融合。在一些实施方案中,融合体以比替代细胞类型更高的效率将其有效载荷递送至CD3+ T细胞。

[1910] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法产生的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框架内,但由P2A自裂解肽序列分隔。

[1911] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体CD3+ T细胞一起在37°C和5%CO₂下于包含补充有5%胎牛血清(FBS)(Gibco,LAX,CA,USA)、100U mL⁻¹青霉素、100μg mL⁻¹链霉素、1.25μg mL⁻¹两性霉素B、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和100U mL⁻¹IL-2(PerproTech,Rocky Hill,CT,USA)的X-VIVO 15培养基(Lonza,Basel,CH,Switzerland)的T细胞培养基中温育48小时。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的CD3+ T细胞融合导致tdTomato表达,这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。

[1912] 在单独的实验中,将相同数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体NIH/3T3成纤维细胞系一起在37°C和5%CO₂下于含有20%胎牛血清和1x青霉素/链霉素的DMEM中温育48小时的时段。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的NIH/3T3成纤维细胞融合导致tdTomato表达,这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。

[1913] 在48小时的温育之后,将细胞在FACS细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,CA,USA)上运行,其中激发561nm激光,并在590+/-20nm处收集发射光。设置门来测量阳性tdTomato表达。选择门使得未与融合体接触的CD3+ T细胞和NIH/3T3成纤维细胞均为阴性。在已经被融合体接触的CD3+ T细胞和NIH/3T3成纤维细胞中,测量了tdTomato表达阳性的细胞百分比。

[1914] 在一些实施方案中,与融合体接触的CD3+细胞中tdTomato表达阳性的细胞百分比高于与融合体接触的NIH/3T3成纤维细胞中,这表明融合体优先与靶CD3+细胞融合。

[1915] 实施例111:与T细胞体内融合的T细胞特异性融合体

[1916] 该实施例描述了对于体内CD3+ T细胞优先的融合体融合。在一些实施方案中,融合体以比任何其他细胞类型更高的效率将其有效载荷递送至CD3+ T细胞。

[1917] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法产生的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框架内,但由P2A自裂解肽序列分隔。

[1918] 然后每天使用可编程的BS-300输液泵(均为Braintree Scientific Inc.)通过啮齿动物的尾静脉导管在20分钟内缓慢向B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm9 (CAG-tdTomato) Hze}/J小鼠

(Jackson Laboratories strain 007909)施用 3×10^{11} 个融合体或PBS,持续5天。最终处理后三天,从融合体处理过的小鼠和接受PBS处理的小鼠中收集外周血。将血液收集到含有 $5 \mu\text{M}$ EDTA的1ml PBS中,并立即混合以防止凝血。将试管放在冰上,并使用缓冲氯化铵(ACK)溶液去除红细胞。在用牛血清白蛋白封闭10分钟后,在黑暗中于 4°C 用鼠CD3-FITC抗体(Thermo Fisher Catalog#:11-0032-82)对细胞染色30分钟。用PBS洗涤两次后,在FSRDivTM软件(BD Biosciences, San Jose, CA.)上运行,在LSR II(BD Biosciences, San Jose, CA.)上分析细胞,其中激发488nm激光,并在 $530 \pm 30\text{nm}$ 处收集发射光。来自接受PBS处理的小鼠的未染色细胞用于绘制阴性FITC和阴性tdTomato荧光的门。

[1919] 在一些实施方案中,用融合体处理的小鼠中tdTomato荧光阳性的细胞百分比高于用PBS处理的小鼠。在一些实施方案中,在用融合体处理的小鼠中,对FITC染色为阳性的tdTomato阳性细胞的百分比大于对FITC染色为阴性的tdTomato阳性细胞的百分比。这证明靶向CD3+细胞的融合体在体内与CD3+细胞特异性融合。

[1920] 实施例112:体外工程化改造的T细胞在体外裂解与靶抗原缔合的细胞

[1921] 该实施例表明,如先前实施例中任一种方法所述,在与融合体接触后表达CAR的CD3+ T细胞能够在体外裂解与靶抗原例如CD19缔合的细胞。

[1922] 将表达靶向CD19的CAR的CD3+ T细胞与CD19+E μ -ALL01白血病细胞(靶标)或CD19-B16F10黑素瘤肿瘤细胞(对照)一起温育。温育之前,使用CD3和CD28特异性磁珠以三个磁珠/细胞激活CD3+ T细胞(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, E μ -ALL01白血病细胞和B16F10黑素瘤细胞用膜染料PKH-26(Sigma-Aldrich)标记,用含10%胎牛血清的RPMI洗涤,并以每mL 1×10^5 个肿瘤细胞的浓度重悬于相同的培养基中。然后以不同的T细胞与肿瘤细胞的比例(范围从0T细胞:1肿瘤细胞至100T细胞:1个肿瘤细胞)将T细胞添加到96孔板中的悬浮液中(最终体积200 μl),并在 37°C 下温育3h。然后转移细胞到V底96孔板,并用膜联蛋白V-亮紫色421(BioLegend)染色。在PBS中洗涤后,在运行FACSDivaTM软件(BD Biosciences, San Jose, CA.)的LSR II(BD Biosciences, San Jose, CA.)机器上通过流式细胞术分析细胞。首先在流式细胞仪上运行来自0T细胞:1肿瘤细胞的温育的细胞和另一批T细胞。首先基于PKH-26荧光绘制门以区分T细胞和肿瘤细胞。绘制门,使T细胞为阴性,与PKH-26温育的肿瘤细胞为阳性。接下来,绘制门以测量膜联蛋白V-亮紫色421的染色。绘制门,使来自0T细胞:1肿瘤细胞的温育的细胞对膜联蛋白V-亮紫色421均为阴性。使用这两个门,在流式细胞仪上运行来自每个不同比率的T细胞与肿瘤细胞的温育的细胞。

[1923] 在一些实施方案中,对于E μ -ALL01白血病细胞,PKH-26和膜联蛋白V-亮紫色421阳性的细胞的百分比随着T细胞与肿瘤细胞的比率的增加而增加,并且对于B16F10黑素瘤肿瘤细胞,PKH-26和膜联蛋白V-亮紫色421阳性不随T细胞与肿瘤细胞比率的增加而增加。这证明了在与融合体接触后表达靶向CD19的CAR的T细胞能够特异性裂解CD19阳性的细胞。

[1924] 参见,例如,Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI:10.1038/NNANO.2017.57

[1925] 实施例113:体内工程化改造的T细胞在体外裂解与靶抗原缔合的细胞

[1926] 该实施例证明,经工程化改造以在体内与融合体接触后表达CAR的CD3+ T细胞能够在体外裂解与靶抗原缔合的细胞。

[1927] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法产生的细胞衍生的囊

泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框架内,但由P2A自裂解肽序列分隔。另外,如先前实施例中所述,将融合体工程化以将靶向CD-19的CAR递送至靶细胞。

[1928] 然后每天使用可编程的BS-300输液泵(均为Braintree Scientific Inc.)通过啮齿动物的尾静脉导管在20分钟内缓慢向B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}小鼠(Jackson Laboratories strain 007909)施用 3×10^{11} 个融合体或PBS,持续5天。最终处理后三天,从融合体处理过的小鼠和接受PBS处理的小鼠中收集外周血。将血液收集到含有5 μ M EDTA的1ml PBS中,并立即混合以防止凝血。将试管放在冰上,并使用缓冲氯化铵(ACK)溶液去除红细胞。在用牛血清白蛋白封闭10分钟后,在黑暗中于4 $^{\circ}$ C用鼠CD3-FITC抗体(Thermo Fisher Catalog#:11-0032-82)对细胞染色30分钟。用PBS洗涤两次后,在FSRDivTM软件(BD Biosciences, San Jose, CA.)上运行,在LSR II(BD Biosciences, San Jose, CA.)上分析细胞,其中激发488nm激光,并在530 \pm 30nm处收集发射光。然后将来自融合体或PBS处理的小鼠的分选细胞与CD19+E μ -ALL01白血病细胞一起温育。温育之前,用膜染料PKH-26(Sigma-Aldrich)标记E μ -ALL01白血病细胞,用含10%胎牛血清的RPMI洗涤,并以每mL 1×10^5 个肿瘤细胞的浓度重悬于相同的培养基中。然后以不同的T细胞与肿瘤细胞的比例(范围从0T细胞:1肿瘤细胞至100T细胞:1个肿瘤细胞)将T细胞添加到96孔板中的悬浮液中(最终体积200 μ l),并在37 $^{\circ}$ C下温育3h。然后转移细胞到V底96孔板,并用膜联蛋白V-亮紫色421(BioLegend)染色。在PBS中洗涤后,在运行FACSDivTM软件(BD Biosciences, San Jose, CA.)的LSR II(BD Biosciences, San Jose, CA.)机器上通过流式细胞术分析细胞。首先在流式细胞仪上运行来自0T细胞:1肿瘤细胞的温育的细胞和另一批T细胞。首先基于PKH-26荧光绘制门以区分T细胞和肿瘤细胞。绘制门,使T细胞为阴性,与PKH-26温育的肿瘤细胞为阳性。接下来,绘制门以测量膜联蛋白V-亮紫色421的染色。绘制门,使来自0T细胞:1肿瘤细胞的温育的细胞对膜联蛋白V-亮紫色421均为阴性。使用这两个门,在流式细胞仪上运行来自每个不同比率的T细胞与肿瘤细胞的温育的细胞。

[1929] 在一些实施方案中,PKH-26和膜联蛋白V-亮紫色421阳性的细胞百分数随着来自融合体处理的小鼠的T细胞与E μ -ALL01白血病细胞的比率增加而增加,并且PKH-26阳性和膜联蛋白V-亮紫色421阳性的细胞百分数不随着用PBS处理的小鼠的T细胞与E μ -ALL01白血病细胞的比率增加而增加。这表明用融合体处理后经工程化改造以表达靶向CD19的CAR的T细胞能够裂解与CD19缔合的细胞。参见例如Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI:10.1038/NNANO.2017.57

[1930] 实施例114:体内工程化改造的T细胞在体内裂解与靶抗原缔合的肿瘤细胞

[1931] 该实施例证明,经工程化改造以在体内与融合体接触后表达CAR的CD3⁺ T细胞能够在体内治疗肿瘤。

[1932] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法产生的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框在框架内,但由P2A自裂解肽序列分隔。另外,如先前实施例中所述,将融合体工程化以递送靶向CD-19的CAR。

[1933] 通过将表达萤光素酶的E μ -ALL01白血病细胞系统性注射到4-6周龄的雌性白化病B6 (C57BL/6J-Tyr^{c-c-2J})小鼠(Jackson Laboratories)中并允许其发展1周来建立白血病

的模型。然后将小鼠随机分配至实验组。然后每天使用可编程的BS-300输液泵(均为Braintree Scientific Inc.)通过啮齿动物的尾静脉导管在20分钟内缓慢施用 3×10^{11} 个融合体或PBS,持续5天。

[1934] 然后每天测量发光作为活白血病细胞数的替代物。PBS (15mg mL⁻¹) 中的D-萤光素(Xenogen) 用作白血病细胞表达的F-luc的底物。用Xenogen IVIS光谱成像系统(Xenogen) 收集生物发光图像。使用Living Image软件4.3.1版(Xenogen) 来获取(并随后定量) 在将D-萤光素腹膜内注射到150mg kg⁻¹的2%异氟烷(Forane, Baxter Healthcare) 麻醉下的动物中, 在10-35分钟的范围内获得的数据。获取时间为10秒至5分钟。为了校正背景生物发光, 从感兴趣的测量区域(ROI) 减去从无肿瘤小鼠(注射D-萤光素) 获得的信号。

[1935] 在实施方案中, 在用PBS处理的小鼠中, 萤光素酶信号在21天的过程中增加, 而在用融合体处理的小鼠中, 萤光素酶信号在21天的过程中减少。

[1936] 还追踪了接受PBS或融合体的小鼠的存活。在实施方案中, 接受PBS的小鼠的中位生存期小于用融合体治疗的小鼠。

[1937] 这证明了融合体能够工程化改造T细胞以在体内靶向肿瘤细胞。参见例如Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI:10.1038/NNANO.2017.57

[1938] 实施例115:融合体将跨膜蛋白递送至受体细胞

[1939] 该实施例描述了融合体与细胞在体外的融合。在一些实施方案中, 融合体融合导致跨膜蛋白递送至受体细胞。

[1940] 融合体组合物, 其由通过前述实施例中任一种方法生产的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生, 除了对融合体进行了工程化改造使得融合剂与Cre的开放阅读框和人胰岛素受体的开放阅读框在框内, 分别由P2A和T2A自切割肽序列分隔。阴性对照融合体经工程化改造, 使融合剂与Cre的开放阅读框和蓝色荧光蛋白mTagBFP2的开放阅读框在框内, 并由P2A自裂解肽序列隔开。参见, 例如, Chen X, et al., Genes Dis. 2015Mar; 2(1):96-105. DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001。

[1941] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体HEK293细胞一起在37°C和5%CO₂下于完全培养基(DMEM+10%FBS+青霉素/链霉素) 中温育48小时的时段。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的HEK293细胞融合导致tdTomato表达, 这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。温育48小时后, 然后使用FACS细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 经由FACS分离tdTomato阳性细胞, 其中激发561nm激光, 并在590+/-20nm处收集发射光。

[1942] 测定了HEK293细胞向分选的HEK293细胞的mRNA递送。分离总RNA(例如, 使用试剂盒如Qiagen RNeasy catalog#74104), 然后使用标准光谱法确定RNA浓度, 以评估RNA的吸光度(例如, 使用Thermo Scientific NanoDrop)。使用用于RT-PCR的Superscript III第一链合成超混合物(Thermo Fisher Scientific) 进行逆转录, 并将RNA(100ng) 逆转录为cDNA。使用QuantStudio3实时PCR系统(ThermoFisher Scientific) 和TaqMan®Fast Advanced Master Mix(ThermoFisher Scientific)、100ng DNA模板、特异于人胰岛素受体的可变区的引物和探针组(使用Taqman在线引物和探针设计程序) 进行实时定量PCR, 并且设计以于扩增β-肌动蛋白的探针组作为内源性上样对照。C_t值用于比较qRT-PCR反应中用含有胰岛素受体mRNA的融合体处理和用含有阴性对照的融合体处理的HEK293细胞之

间的胰岛素受体cDNA的量。相对表达式是使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算的。胰岛素受体的相对表达水平较高是由于从分选的HEK293 T细胞中纯化出的胰岛素受体mRNA水平较高。

[1943] 在一些实施方案中,与衍生自表达CFP的细胞的阴性对照融合体相比,在衍生自表达胰岛素受体的细胞的融合体中用融合体外递送胰岛素受体mRNA货物更高。

[1944] 测定在分选的细胞表面上的胰岛素受体表达。将分选的tdTomato+HEK293细胞与缀合至Alexa Fluor 488 (Bioss Antibodies, catalog number bs-0260R-A488)的胰岛素受体alpha抗体一起温育。抗体标记与胰岛素受体表达量成比例的表达胰岛素受体的细胞。用来自AB血浆的人血清 (Sigma-Aldrich) 封闭10分钟后,将 2×10^5 个细胞与450ng与Alexa Fluor 488缀合的胰岛素受体Alpha抗体在4°C下于黑暗中温育30分钟。用PBS洗涤两次后,在运行FACSDiva™软件 (BD Biosciences, San Jose, CA.)的LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA.)机器上分析细胞。将与阴性对照融合剂一起温育的tdTomato+HEK293细胞用于建立与Alexa Fluor 488缀合的胰岛素受体alpha抗体信号的阴性门控。选择门,使得与Alexa Fluor 488缀合的胰岛素受体alpha抗体阳性事件的百分比等于0.0%。在用衍生自表达胰岛素受体的细胞的融合体处理的分选细胞中测量与Alexa Fluor 488缀合的胰岛素受体alpha抗体阳性事件的百分比。

[1945] 在一些实施方案中,与衍生自表达mTagBFP2的细胞的阴性对照融合体相比,在用衍生自表达胰岛素受体的细胞的融合体处理的细胞中,具有表面胰岛素受体表达的分选细胞的百分比更高。

[1946] 实施例116:融合体将异源的、靶向信号肽的跨膜蛋白递送至受体细胞

[1947] 该实施例描述了融合体与细胞在体外的融合。在一些实施方案中,融合体与受体细胞的融合导致异源膜蛋白有效载荷递送至受体细胞的质膜。

[1948] 融合体组合物,其由通过前述实施例中所述的任何一种方法生产的细胞衍生的囊泡或细胞衍生的细胞生物物质产生,除了对融合体进行工程化改造,使得融合剂与Cre的开放阅读框和膜靶定的GFP的开放阅读框在框内,分别由P2A和T2A自切割肽序列分隔。通过将GFP的编码序列的N末端融合到LCK (一种含有两个棕榈酰化域和一个肉豆蔻酰化域的Src家族酪氨酸激酶)的前26个氨基酸中,来生成膜靶定的GFP。阴性对照融合体经工程化改造,使融合剂与Cre的开放阅读框和胞质GFP的开放阅读框 (GFP的编码序列,无任何其他靶向肽序列)在框内,并各自由P2A自切割肽序列分割。参见,例如,Chen X, et al., Genes Dis. 2015Mar; 2 (1) :96105. DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001和Benediktsson A, et al, Journal of Neuroscience Methods 2005 141,41-53。

[1949] 然后将足够数量的融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的受体HEK293细胞一起在37°C和5%CO₂下于完全培养基 (DMEM+10%FBS+青霉素/链霉素)中温育48小时的时段。融合体与具有loxP-STOP-loxP-tdTomato报告物的HEK293细胞融合导致tdTomato表达,这是因为Cre重组酶从DNA中切除了阻断tdTomato表达的终止密码子。温育48小时后,然后使用FACS细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 经由FACS分离tdTomato阳性细胞,其中激发561nm激光,并在590+/-20nm处收集发射光。

[1950] 经由共聚焦显微镜法分析分选的HEK293细胞的质膜中GFP的膜定位。在共聚焦显微镜之前,将分选的HEK293细胞用标记质膜的试剂 (例如CellMask深红色血浆膜染色剂, Invitrogen, 目录号C10046) 染色。使用Plan Apochromat 63x1.4数值孔径油镜用Zeiss

LSM 710倒置显微镜进行成像实验。488nm氩激光用于激发GFP/EGFP,而632nm氦氖激光用于激发质膜染色。编写MATLAB脚本以确定每个细胞的质膜和胞质溶胶的平均GFP强度。在脚本中,计算了质膜(由质膜染色剂定义的质膜两侧之一的6个像素定义)和胞质溶胶(质膜区域内的区域)的平均强度。然后将每个细胞的质膜和胞质溶胶强度的值用于计算%质膜定位。用以下等式计算%质膜定位:质膜强度比总(质膜+胞质溶胶)强度 $\times 100\%$ 。参见,例如Johnson A,et al.,Scientific Reports 6:19125(2015)。

[1951] 在一些实施方案中,用含有质膜定位的GFP的融合体处理的分选出的细胞具有比用含有胞质GFP的融合体处理的分选出的细胞更高的GFP的%质膜定位。

序列表

<110> 旗舰先锋创新V股份有限公司

<120> 用于膜蛋白递送的组合物和方法

<130> V2050-7013W0

<140>

<141>

<150> 62/631,747

<151> 2018-02-17

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的描述:

胱天蛋白酶2序列"

<400> 1

Val Asp Val Ala Asp

1 5

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成

多肽"

<400> 2

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Lys

1 5 10 15

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Ile Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu

20 25 30

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 3

Cys Ala Ala Leu

1

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 4

Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1

5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 6

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly

1	5	10	15
Pro Pro Val Leu Ser			
	20		
<210> 7			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"			
<400> 7			
Cys Ser Ile Met Asn Leu Met Cys Gly Ser Thr Cys			
1	5	10	
<210> 8			
<211> 45			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"			
<400> 8			
Gly His Lys Ser Glu Glu Lys Arg Glu Lys Met Lys Arg Thr Leu Leu			
1	5	10	15
Lys Asp Trp Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Leu Gln Asn Ser Ser Thr			
	20	25	30
Pro Gly Lys Pro Lys Thr Gly Lys Lys Ser Lys Gln Gln			
	35	40	45
<210> 9			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"			
<400> 9			
Arg Ser Thr Leu Lys Leu Thr Thr Leu Gln Cys Gln Tyr Ser Thr Val			

1	5	10	15
---	---	----	----

Met Asp
 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 10

Arg Gln Gly Leu His Asn Met Glu Asp Val Tyr Glu Leu Ile Glu Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser His
 <210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 <400> 11

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly

20	25	30
----	----	----

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 12

Met Pro Ala Trp Gly Ala Leu Phe Leu Leu Trp Ala Thr Ala Glu Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 13

<211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 13
 Arg Asp Tyr Arg
 1
 <210> 14
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 <400> 14
 Lys Met Ala Leu Arg Val Ala Leu Asn Asn Lys Gln Ser Gly Gln Ile
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Thr Ser Ser Ser Asp His Leu Ser Leu Ala Ile Ala Gly
 20 25 30
 Leu Val Pro Ile Ala Leu Ser Ile Tyr Gln Lys Phe Lys Pro Gly Val
 35 40 45
 Ser Pro Ser Tyr Ser Ile Tyr
 50 55
 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 15
 Met Gly Ser Lys Ile Val Gln Val Phe Leu Met Leu Ala Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Leu Ala

20

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 16

Met Asn Ser Lys Ala Met Gln Ala Leu Ile Phe Leu Gly Phe Leu Ala

1 5 10 15

Thr Ser Cys Leu Ala

20

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 17

Met Gly Ala Ala Ala Ser Ile Gln Thr Thr Val Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 18

Phe Ala Leu Leu Gly Thr His Gly Ala Ser Gly

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
<400> 19
Arg Arg Arg Thr Phe Leu Lys
1 5
<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
<400> 20
Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val
1 5 10
<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
<400> 21
Asp Asp Pro Glu Arg Glu
1 5
<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
<400> 22

Glu Glu Ala Asn Thr Gly Glu Asn Asn Ser Leu Leu His Pro Met Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 23

Ser Arg Arg Gly Leu Val

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 24

Ser Arg Arg Arg Phe Leu

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 25

Ser Arg Arg Gln Phe Ile

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 26

Gln Arg Arg Asp Phe Leu

1 5

<210> 27

<211> 52

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 27

Met Asn Lys Ile Tyr Ser Ile Lys Tyr Ser Ala Ala Thr Gly Gly Leu

1 5 10 15

Ile Ala Val Ser Glu Leu Ala Lys Lys Val Ile Cys Lys Thr Asn Arg

20 25 30

Lys Ile Ser Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ala Val Ile Ser Tyr Thr Asn

35 40 45

Ile Ile Tyr Ala

50

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 28

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val

1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile

20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr

35 40

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 29

Leu Arg Cys Leu Ala Cys Ser Cys Phe Arg Thr Pro Val Trp Pro Arg

1 5 10 15

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 30

Met Gly Cys Gly Cys Ser Ser His Pro Glu

1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 31

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn

1 5

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 32

Asp Glu Gln Asn Ala Lys Asn Ala Ala Gln Asp Arg Asn Ser Asn Lys

1 5 10 15

Ser Ser Lys Gly Phe Phe Ser Lys Leu Gly Cys Cys

20 25

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 33

Met Leu Cys Cys Met Arg Arg Thr Lys Gln

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 34

Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro Leu Ser His

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 35

Ala Glu Thr Glu Asn Phe Val

1 5
 <210> 36
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 36
 Arg Ala Arg His Arg Arg Asn Val Asp Arg Val Ser Ile Gly Ser Tyr
 1 5 10 15
 Arg Thr
 <210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 37
 Tyr Glu Asp Gln
 1
 <210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 <400> 38
 Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe
 1 5 10 15
 Leu Ile Pro
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"
<400> 39
ggagtccact ggcgtcttca c 21
<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"
<400> 40
gaggcattgc tgatgatctt gagg 24
<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"
<400> 41
atgagtaaag gagaagaact tttcac 26
<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"
<400> 42
gtccttttac cagacaacca ttac 24
<210> 43
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"
<400> 43
gacguaaacg gccacaaguu c 21
<210> 44
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"
<400> 44
acuuguggcc guuuacgucg c 21
<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"
<220>
<221> 来源
<223> /注释="组合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸"
<400> 45
cuuacgcuga guacuucgat t 21
<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成"

寡核苷酸”

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”组合的DNA/RNA分子的描述：合成

寡核苷酸”

<400> 46

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述：合成

寡核苷酸”

<400> 47

gaagttcgag ggcgacaccc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述：合成

寡核苷酸”

<400> 48

gcactaccag agctaactca 20

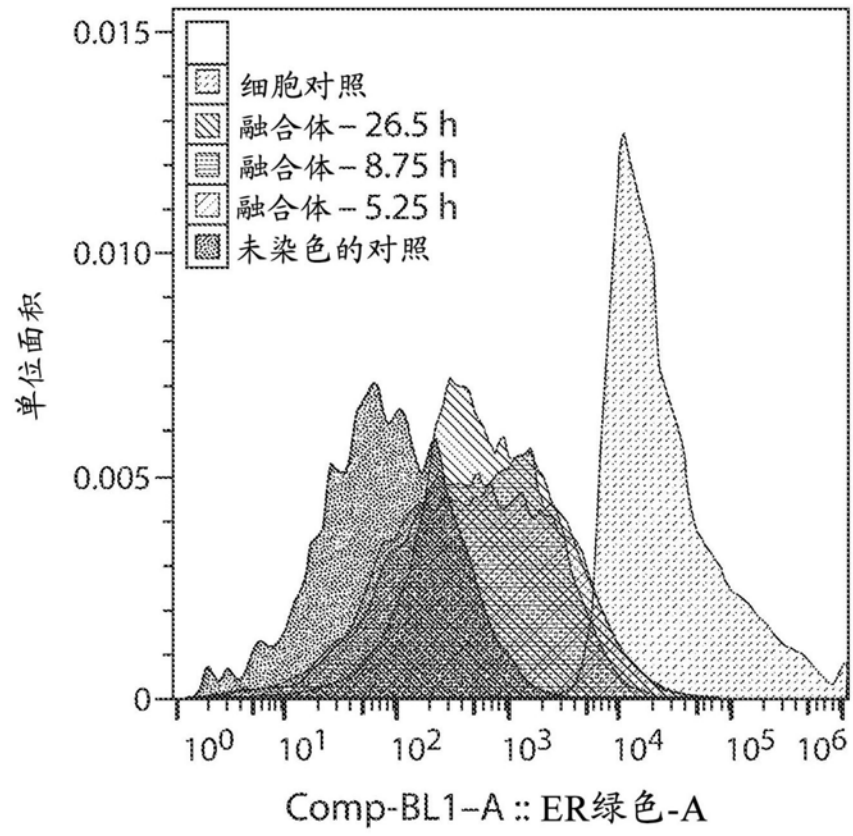


图1

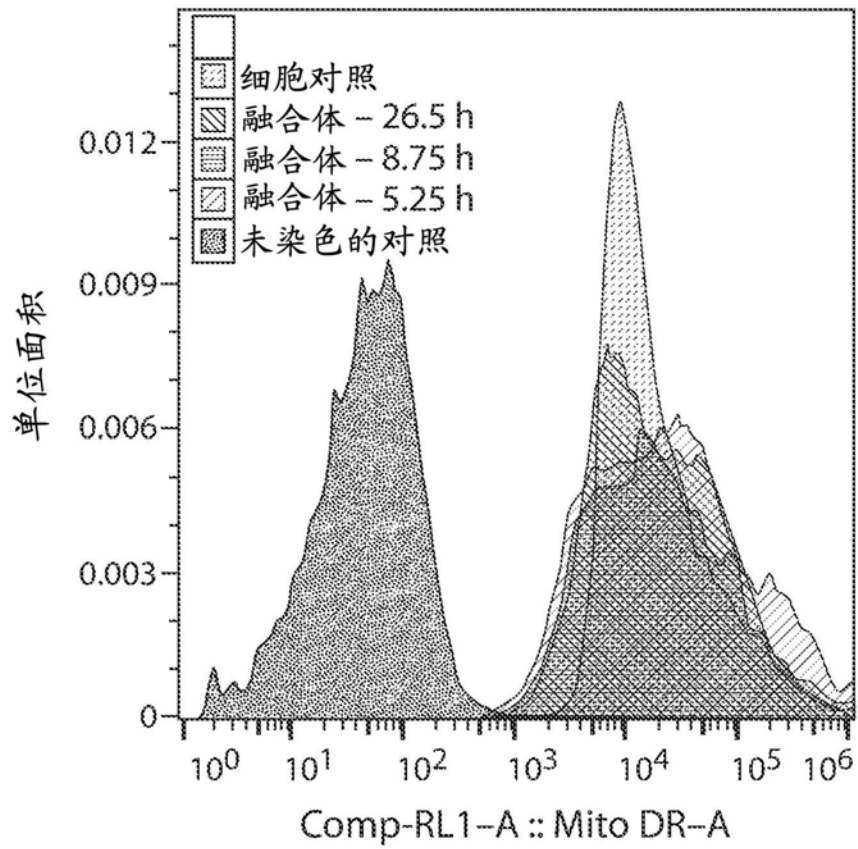


图2

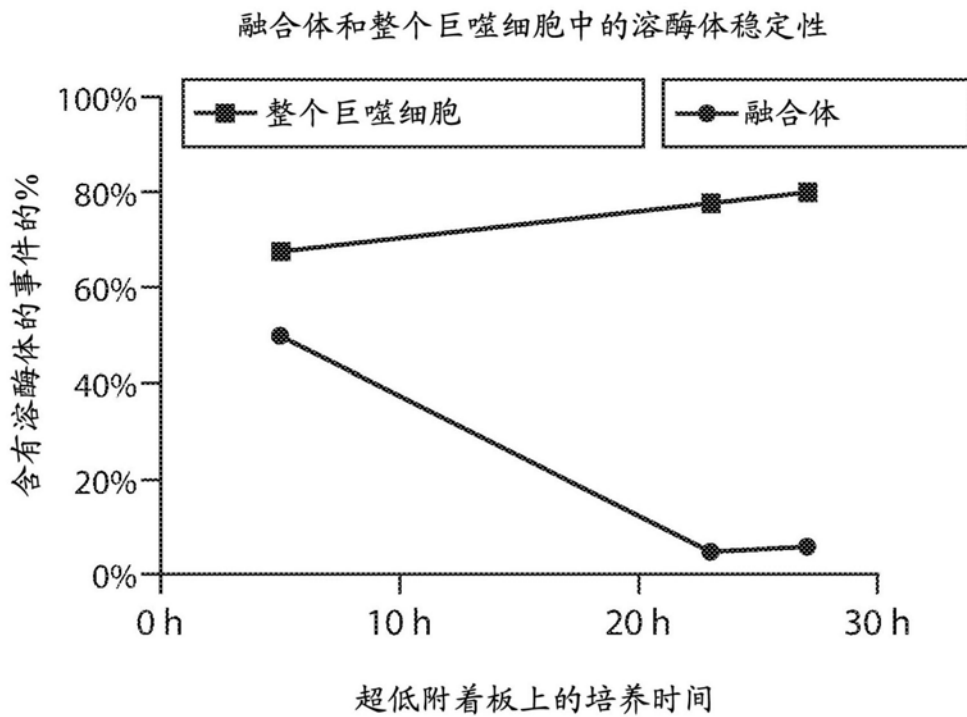


图3

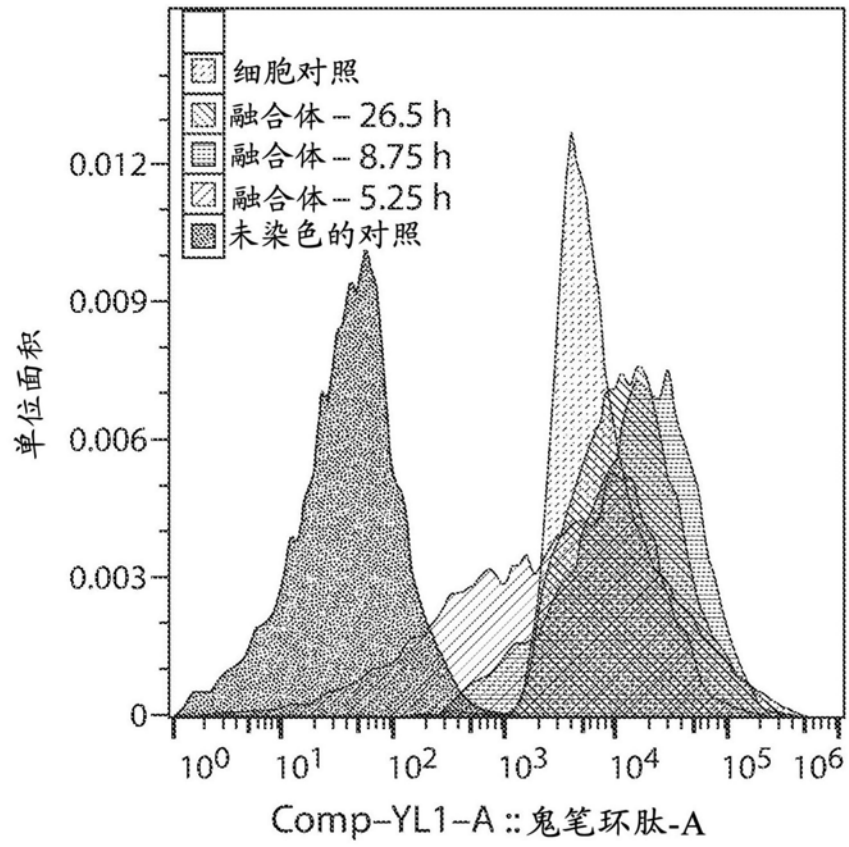


图4

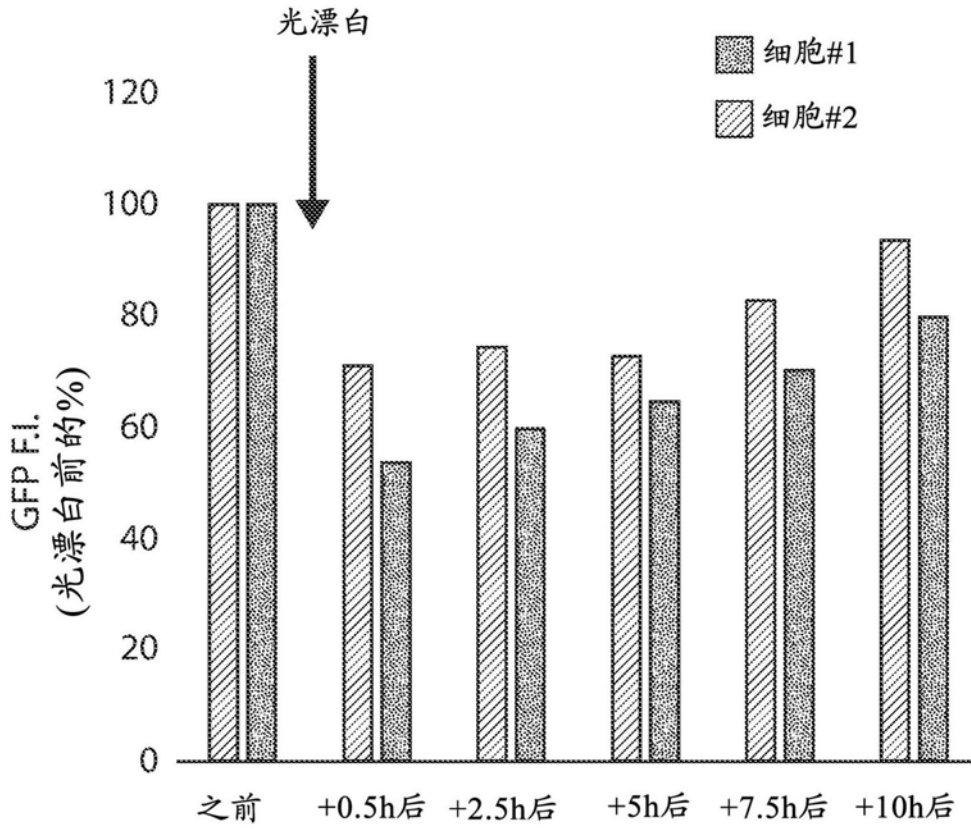


图5

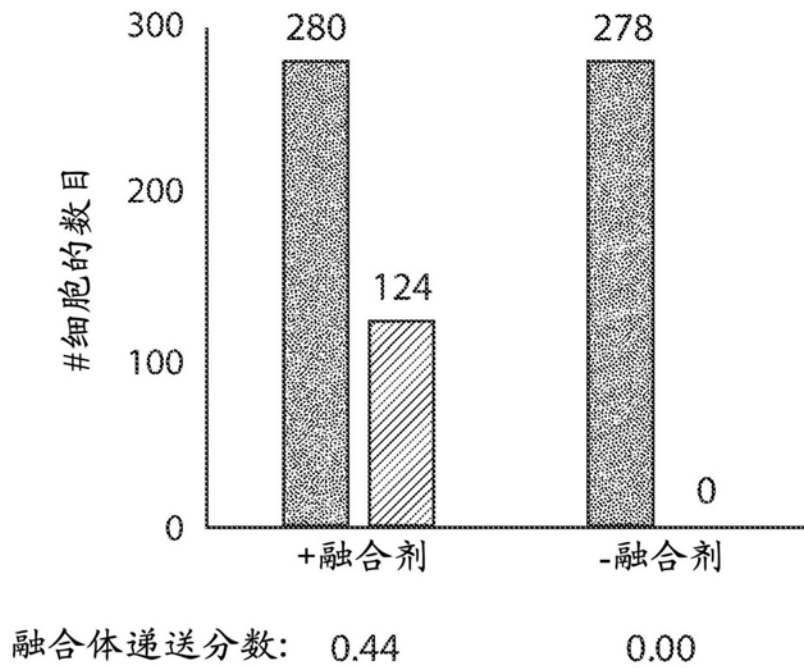


图6

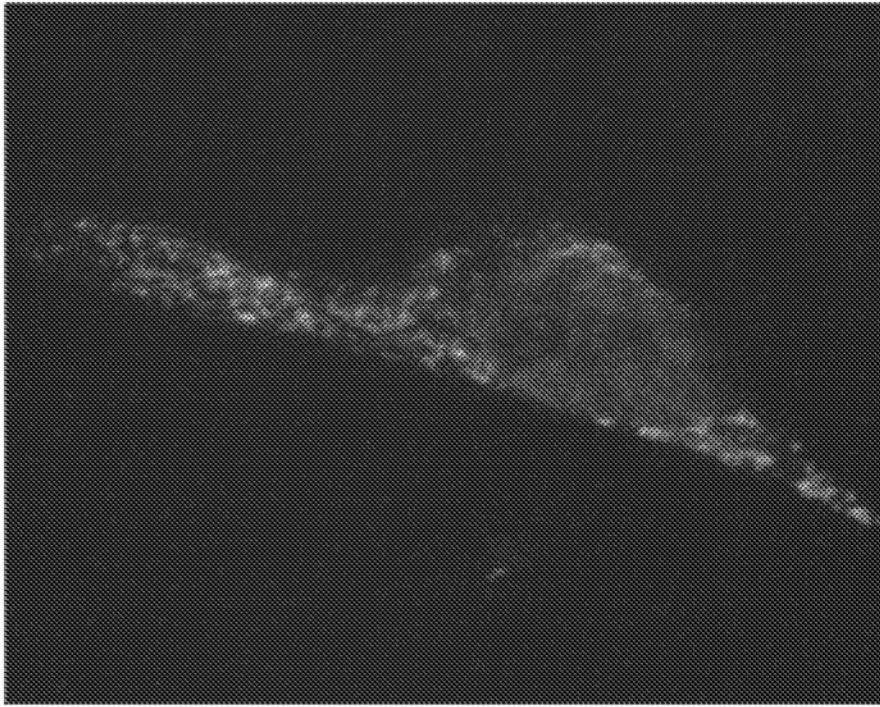


图7

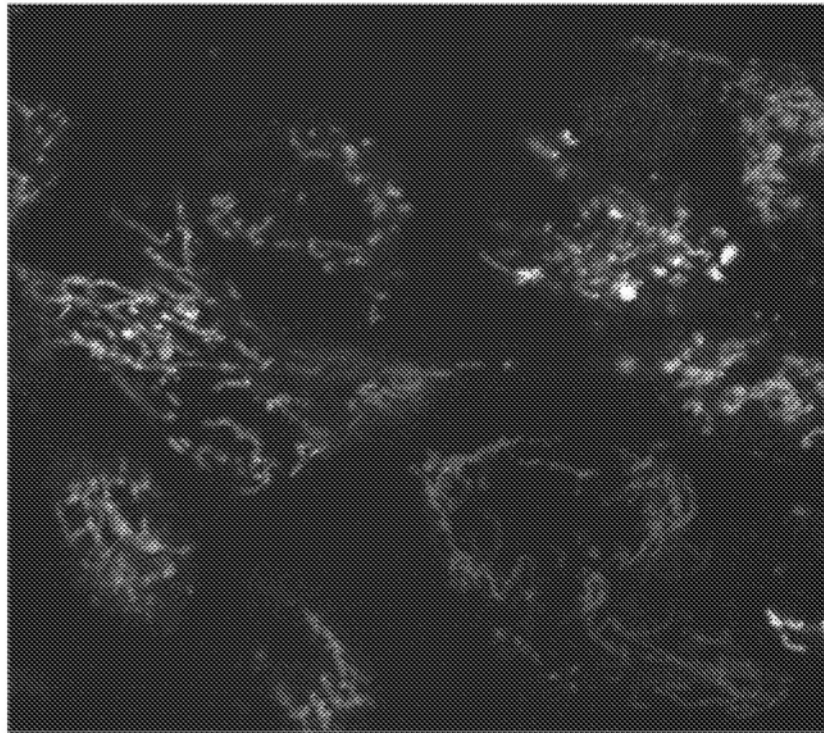


图8

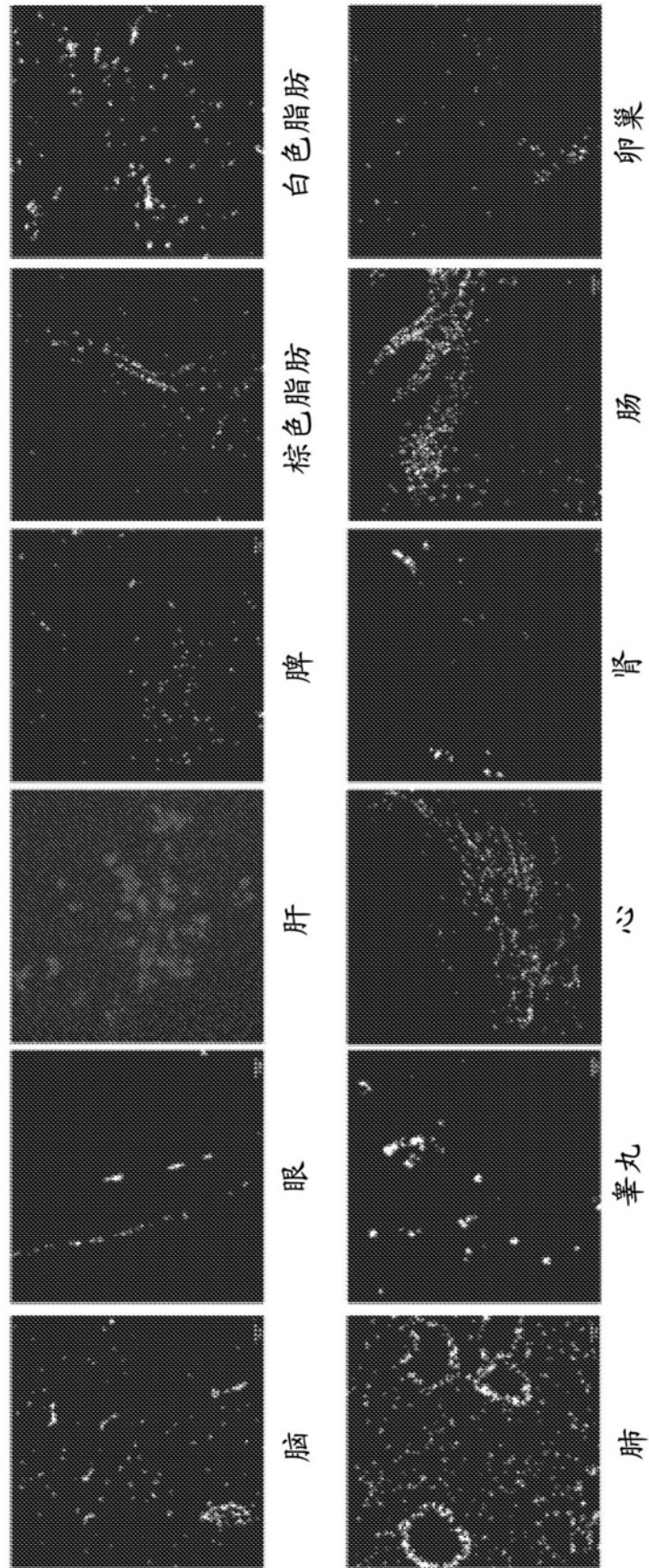


图9

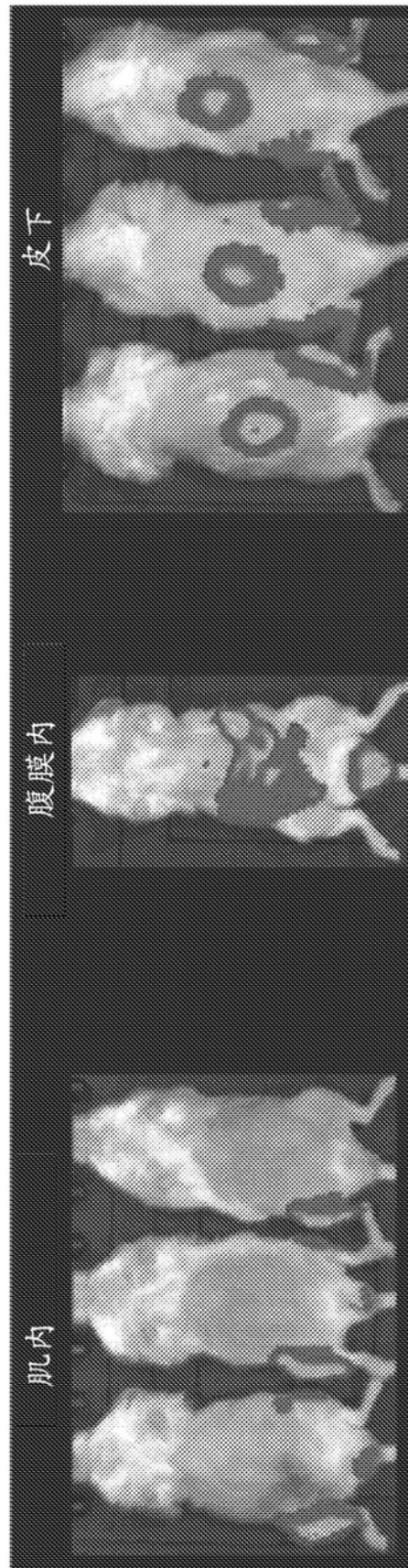


图10

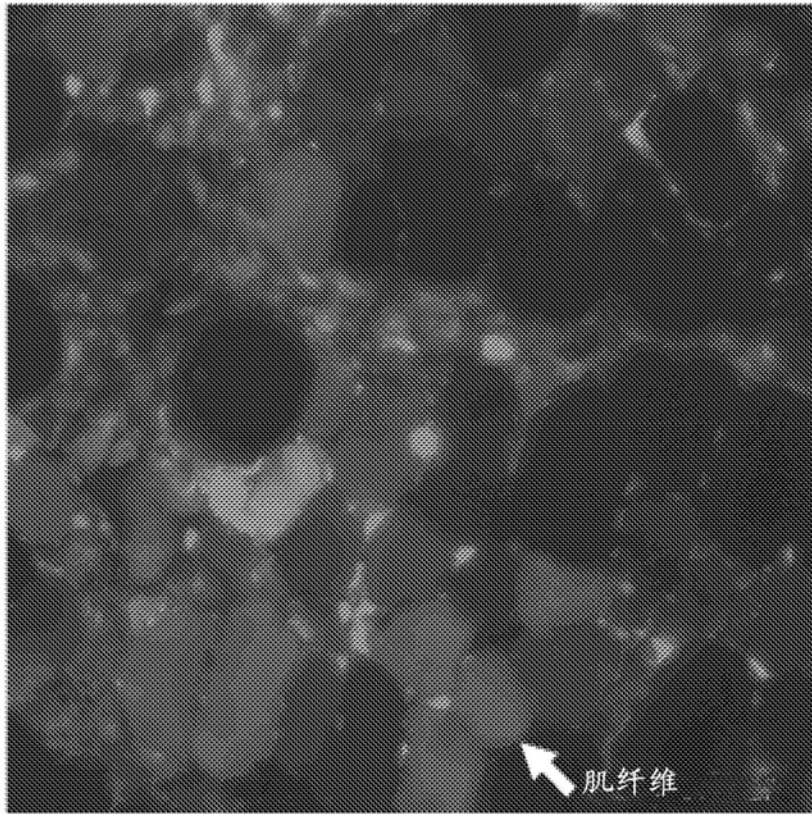


图11