

· 综 述 ·

基于细胞外囊泡疗法的非临床评价策略

李嫚琪^{1△}, 魏丽萍^{1△}, 李英奇¹, 陶巧玉², 许瀚林^{1,3}, 何伟伟¹,
汤纳平¹, 汪溪洁¹ 综述, 王庆利⁴, 常艳¹ 审校

1. 中国医药工业研究总院 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203;
2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 3. 上海工程技术大学化学化工学院,
上海 201620; 4. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)这一概念在 2011 年由国际细胞外囊泡协会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)提出,其可作为治疗药物以及药物的递送载体广泛应用于疾病治疗的各个领域。基于 EV 的疗法可能成为一种除传统药物治疗和细胞治疗之外的疾病治疗新模式——EV 无细胞疗法。作为载体,相比于病毒载体和合成非病毒载体, EV 具有独特的优势,潜力巨大。但 EV 由于其特有的生物学性质,在临床转化中具有一定困难。且该领域相对较新,尚无专门针对基于 EV 疗法的相关政策和法规出台。本文通过 ClinicalTrials.gov 平台采集信息,总结基于 EV 疗法的研究进展,对现有的监管体系提出建议,并对 EV 非临床研究的一般原则、药学研究、药效学和药代动力学研究及安全性评价等非临床评价策略进行探讨,为制定基于 EV 疗法的非临床评价研究方案提供参考。

关键词: 细胞外囊泡;外泌体;非临床评价

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1004-5503(2023)10-1248-09

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.004008

Non clinical evaluation strategy based on extracellular vesicle therapy

LI Manqi^{*}, WEI Liping, LI Yingqi, TAO Qiaoyu, XU Hanlin, HE Weiwei,
TANG Naping, WANG Xijie, WANG Qingli, CHANG Yan

^{*}China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai InnoStar Bio-Tech
Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Corresponding author: WANG Qingli, E-mail: wangql@cde.org.cn;

CHANG Yan, E-mail: ychang@innostar.cn

Abstract: The concept of extracellular vesicles (EV) was proposed in 2011 by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), and EV can be widely used in various fields of disease treatment as therapeutic drugs and drug delivery carriers. The therapy based on EV may become a new model of disease treatment in addition to traditional drug therapy and cell therapy-EV cell-free therapy. As a vector, compared with viral vector and synthetic non viral vector, EV have unique advantages and great potential. However, EV have some challenges in clinical transformation because of their unique biological properties. Moreover, this field is relatively new, and there are no relevant policies and regulations specifically for EV therapy. By collecting information from ClinicalTrials.gov platform, this paper summarized the research progress based on EV therapy, put forward suggestions for the existing regulatory system, discussed the general principles of EV non clinical research, pharmaceutical research, pharmacodynamics and pharmacokinetics research, safety evaluation and other non clinical evaluation strategies, so as to provide reference for the formulation of non clinical evaluation research scheme based on EV therapy.

Keywords: Extracellular vesicles (EV); Exosomes; Non clinical evaluation

基金项目: 上海市科委研发平台项目(21DZ2291000)。

通信作者: 王庆利, E-mail: wangql@cde.org.cn; 常艳, E-mail: ychang@innostar.cn

△: 共享第一作者

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)指由细胞主动释放到细胞外环境的,选择性包裹蛋白质、DNA 片段、RNA、脂质和代谢物等各种分子的脂质双层囊泡^[1]。EV 不含功能核,不能增殖和分化^[2]。根据其生物发生机制、大小和生物物理学特性的不同, EV 可大致分为 3 类:外泌体(exosomes)、微囊泡(micro-vesicles, MV)、凋亡小体(apoptotic bodies, AB),目前绝大多数研究为外泌体相关研究。EV 在生理和病理过程中的功能取决于其与受体细胞相互作用以传递其蛋白质、脂质和 RNA 等内容的物能力^[3]。EV 表面蛋白信号分子可识别并靶向受体细胞,一旦连接上靶细胞,可通过受体-配体相互作用诱导信号传递,或通过胞吞作用内化,也可直接与靶细胞的膜融合,将其内容物传递至靶细胞的胞浆中^[4]。当 EV 内容物进入细胞内,即可通过信使 RNA(messenger RNA, mRNA)的翻译、微小 RNA(microRNA, miRNA)的基因沉默及生物活性脂质的作用引发蛋白质组学、基因组学及表观遗传学的改变^[5],从而改变受体细胞的生理状态。EV 最初仅被视为细胞向外分泌的废弃物,但近年来,研究者发现, EV 作为细胞间重要的运载体,是细胞间通讯的重要方式^[6],可作为一种无细胞治疗手段进行临床治疗,同时还具有作为天然药物递送载体的潜在能力。本文就基于 EV 疗法的研发概况、特点、监管要求及非临床评价策略作一综述。

1 基于 EV 疗法的研发概况

近 10 年来, EV 相关的各项研究大量涌现。目前尚无获得批准的基于 EV 治疗的上市药物,但已有较多产品进入临床研究阶段。截至 2022 年 3 月, clinicaltrials.gov 平台中有 34 项 EV 作为治疗药物的临床试验,有 10 项 EV 作为载体的临床试验。截至 2022 年 5 月, clinicaltrials.gov 平台 (<https://clinicaltrials.gov>) 中 EV 作为治疗药物的临床试验见表 1, EV 作为载体的临床试验见表 2。其中适应证涉及炎症、癌症、眼部疾病和呼吸系统疾病等多个领域, EV 的来源多为间充质干细胞,也有少数来源为肿瘤细胞,给药方式多为局部用药,系统用药相对较少。

1.1 EV 作为治疗药物 内源性释放的 EV 可参与许多病理和生理学过程,在免疫调节和组织再生中具有重要作用^[7],其本身就具有治疗潜力。其中应用最广泛是来自间充质干细胞的 EV,已有大量基础实验证明, EV 在软骨、骨、皮肤、血管、味蕾、神经组织、牙、骨骼肌、心肌、肝、肾和肺等组织再生方面具有巨大的应用潜能。此外,免疫细胞分泌的 EV 可通过促

进调节反应或调节周围细胞,减少炎症来直接控制外周免疫功能^[8]。EV 还能抑制自身免疫。调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)的主要功能是通过促进免疫系统的自我耐受来预防自身免疫, Treg 利用 EV 抑制其他免疫细胞的活性。有研究表明, Treg 衍生的 EV 包含多个 miRNA 和 miRNA 前体^[9-11], 树突状细胞摄取含有 miR-142-3p 和 miR-150-5p 的 EV 会导致促炎性细胞因子白细胞介素-6 表达降低,并导致免疫抑制性细胞因子白细胞介素-10 表达升高^[9]。这些 miRNA 干扰树突状细胞中的抗原加工和呈递,从而抑制了免疫激活^[8]。自 COVID-19 疫情暴发以来, EV 也为治疗 COVID-19 提供了新的思路。

1.2 EV 作为药物载体 EV 作为介导细胞间通讯的媒介,可被用作有效递送载体,装载基因类、蛋白类和小分子药物等,已成为目前最为关注的 EV 研究方向。目前研究多集中于 EV 包载 RNA 或小分子药物的抗肿瘤研究。EV 的生化特性可用于靶向递送药物至某些细胞群^[12],实现选择性递送,由于 EV 是由细胞产生的,具有跨膜蛋白和表面受体等特异性蛋白,可避免或促进靶细胞的识别和相互作用。EV 的装载方式分为主动装载和被动装载两种。主动装载包括:电穿孔、化学转染(转染 EV 或转染 EV 亲本细胞)、物理转染(超声法、挤出法、反复冻融法)、点击化学;被动装载指孵育(EV 或 EV 的亲本细胞与药物孵育)。不同细胞来源的 EV 成分不同,其潜在的生物功能也有较大差异:肿瘤细胞分泌的 EV 作为药物载体时,可较好地归巢至肿瘤部位;巨噬细胞分泌的 EV 具有良好的炎症趋向作用,且可跨越血脑屏障用于脑部疾病的治疗;树突状细胞分泌的 EV 则具有良好的免疫效应。此外, EV 与核酸分子有更好的亲和性,能显著提高包封效率。EV 结构具有可改造性,膜修饰方式多样,如基因修饰 EV 表面功能化蛋白,增强靶向性,提高 EV 递送效率。EV 还可与病毒载体结合使用,如外泌体与腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)杂交可显著降低免疫原性^[12]。天然 EV 进行工程改造可提高质粒的效率和容量,如外泌体与脂质体杂交可包裹和递送 CRISPR-Cas9,并减轻脂质体的毒性^[13]。

大多数注射的 EV 会优先聚集在肝、肾和脾,被迅速清除,从而限制了外源性 EV 在靶组织中的浓度^[14]。有研究通过基因修饰或结合靶向配体、抗体、刺激因子或免疫逃逸因子进行 EV 改造^[15-16],如在 EV 表面修饰能与肿瘤组织特异性结合的多肽,增加抗肿瘤药物的运送效率和疗效。同时,药物在 EV 内的运输可产生不同于游离药物的药理学特征,保护传统药物免受肿瘤微环境的影响,从而增强药效和改变脱靶效应。

表 1 EV 作为治疗药物的临床试验

Tab. 1 Clinical trials of EV as therapeutic drugs

临床试验编号	年份	临床试验阶段	EV 来源	适应证	给药方式	申办者	地区
NCT02138331	2014	II / III	间充质干细胞	1 型糖尿病	静脉注射	教学医院和研究所总委员会	埃及
NCT02565264	2015	早 I	血浆	顽固性皮肤溃疡	皮肤黏膜给药	熊本大学	日本
NCT03437759	2018	早 I	间充质干细胞	黄斑裂孔	玻璃体内注射	天津医科大学	中国
NCT03857841	2019	I	骨髓间充质干细胞	支气管肺发育不良	静脉注射	United Therapeutics 公司	美国
NTC04173650	2019	I / II	骨髓间充质干细胞	营养不良性大疱性表皮松解症	皮肤黏膜给药	Aegle Therapeutics 公司	美国
NCT04202783	2019	不适用	-	颅面神经痛	静脉注射	西洛杉矶神经学协会	美国
NCT04202770	2019	不适用	-	难治性抑郁症、焦虑症、神经退行性疾病	静脉注射	西洛杉矶神经学协会	美国
NCT04213248	2019	I / II	脐带血间充质干细胞	干眼症	眼黏膜给药	中山大学	中国
NCT04270006	2020	早 I	脂肪干细胞	牙周炎	局部注射	贝尼苏夫大学	埃及
NCT04276987	2020	I	骨髓间充质干细胞	COVID-19	吸入给药	Cellular Biomedicine 公司	中国
NCT04281901	2020	不适用	血浆	慢性中耳炎	耳黏膜给药	卢布尔雅那大学	斯洛文尼亚
NCT04313647	2020	I	脂肪间充质干细胞	健康	吸入给药	Cellular Biomedicine 公司	中国
NCT04327635	2020	I	-	急性心肌梗死	动脉注射	Rion 公司	美国
NCT04356300	2020	不适用	脐带间充质干细胞	多器官功能障碍综合征	静脉注射	福建医科大学	中国
NCT04389385	2020	I	T 细胞	COVID-19	吸入给药	托尔西耶斯大学	土耳其
NCT04491240	2020	I / II	间充质干细胞	COVID-19	吸入给药	萨马拉地区临床医院	俄罗斯
NCT04493242	2020	II	骨髓	COVID-19	静脉注射	Direct Biologics 公司	美国
NCT04544215	2020	I / II	间充质干细胞	肺部感染耐药	吸入给药	Cellular Biomedicine 公司	中国
NCT04602104	2020	I / II	间充质干细胞	呼吸窘迫综合征	吸入给药	Cellular Biomedicine 公司	中国
NCT04652531	2020	不适用	自体血清	静脉溃疡	伤口周围注射	都灵大学	意大利
NCT04657458	2020	-	骨髓间充质干细胞	COVID-19	静脉注射	Direct Biologics 公司	-
NCT04664738	2020	I	血浆	皮肤移植	皮肤黏膜给药	Rion 公司	美国
NCT04747574	2021	I	-	COVID-19	吸入给药	特拉维夫苏拉斯基医疗中心	以色列
NCT04761562	2021	II / III	血浆	慢性中耳炎 鼓膜穿孔	耳黏膜给药	卢布尔雅那大学	斯洛文尼亚
NCT04798716	2021	I / II	间充质干细胞	COVID-19	静脉注射	AVEM HealthCare 公司	美国
NCT04849429	2021	I	血浆	慢性下腰痛 退变性盘病	纤维环和髓核内注射	Dr. Himanshu Bansal 基金会	印度
NCT04850469	2021	-	间充质干细胞	脓毒症危重病	-	复旦大学儿童医院	中国
NCT04902183	2021	II	-	COVID-19	吸入给药	Elpen Pharmaceutical 公司	希腊
NCT05127122	2021	I / II	骨髓间充质干细胞	急性呼吸窘迫综合征	静脉注射	Direct Biologics 公司	美国
NCT05078385	2021	I	骨髓间充质干细胞	二度烧伤	-	Aegle Therapeutics 公司	美国
NCT05130983	2021	I	骨髓间充质干细胞	克罗恩病	静脉注射	Direct Biologics 公司	美国
NCT05176366	2022	I	骨髓间充质干细胞	溃疡性结肠炎	静脉注射	Direct Biologics 公司	美国
NCT05216562	2022	II / III	间充质干细胞	COVID-19	静脉注射	生物皮肤病实验室	印度尼西亚
NCT05261360	2022	II	间充质干细胞	半月板退行性损伤	关节内注射	伊斯基谢希尔·奥斯曼加齐大学	土耳其

注：“-”表示未见报道。

表 2 EV 作为载体的临床试验

Tab. 2 Clinical trials of EV as vectors

临床试验编号	年份	临床试验阶段	装载药物	EV 来源	适应证	给药方式	申办者	国家
NCT01159288	2010	II	肿瘤抗原	树突状细胞	非小细胞肺癌	皮下注射	Gustave Roussy Grand Paris 癌症学院	法国
NCT01294072	2011	I	姜黄素	植物	结肠癌	口服	路易斯维尔大学	美国
NCT01854866	2013	II	化疗药物	肿瘤细胞	恶性腹水、恶性胸腔积液	腹腔灌注、胸腔灌注	华中科技大学	中国
NCT02657460	2016	II	甲氨蝶呤	肿瘤细胞	恶性胸腔积液	-	武汉协和医院	中国
NCT03384433	2017	I / II	miRNA	间充质干细胞	缺血性脑卒中	立体定向室管膜下注射	塔比亚特莫达雷斯大学	伊朗
NCT03608631	2018	I	siRNA	间充质干细胞	胰腺癌	静脉注射	M.D.Anderson 癌症中心	美国
NCT04592484	2020	I / II	STING 激动剂	-	实体瘤(重点是头颈部鳞状细胞癌、三重阴性乳腺癌、间变性甲状腺癌和皮肤鳞状细胞癌)	瘤内注射	CodiakBioSciences 公司	美国
NCT04602442	2020	II	microRNA	间充质干细胞	COVID-19	吸入给药	Olga Tyumina 公司	俄罗斯
NCT05156229	2021	I	IL-12	-	皮肤 T 细胞淋巴瘤	瘤内注射	CodiakBioSciences 公司	美国
NCT05043181	2021	I	mRNA	骨髓间充质干细胞	家族性高胆固醇血症	腹腔注射	空军军事医科大学	中国

注：“-”表示未见报道。

2 基于 EV 疗法的研发特点

2.1 基于 EV 疗法的优势 EV 来源广泛,无生命但具有生物活性,由于其生物相容性、稳定性、靶向性、归巢性和可扩展性^[8],并且可反映细胞起源,是药物开发和递送的理想候选者。

相比于传统药物治疗和细胞治疗, EV 作为一种无细胞疗法具有独特的优势。EV 富含黏附分子和信号分子,能够识别靶细胞并刺激摄取,比游离型药物具有更强的细胞靶向性和摄取性^[17]。与更易被免疫清除的游离型药物和细胞疗法相比,跨膜 CD47 的存在允许 EV 通过 CD47-Sirp α 发出“不要吃我”的信号来避免免疫排斥反应^[18],有助于延长 EV 在体内的循环时间,延长半衰期^[8]。EV 的膜结构可提供保护,防止其被分子组成中的酶和非酶物质降解。此外,与细胞疗法相比, EV 比亲本细胞更小、更简单、更稳定,相对容易修改和制造,来源丰富且产量高,能够适应专业化和规模化生产,比细胞更适合长期储存,功能损失较小。有研究表明,给因实验性心脏病发作而导致心肌受损的幼年猪注射人诱导性多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)产生的心脏细胞(hiPSC-CC)或 hiPSC-CC 细胞来源的外泌体后,药效学作用未见明显差异,但外泌体治疗并未增加心律失常的频率,具有更好的安全性^[19]。与传统的细胞移植相比, EV 作为一种简单的微小囊泡结构,不含细胞核,不能异常增殖和分化^[20],致癌性和免疫原性风险较低,具有更高的治疗安全性。

EV 作为载体,能够保护包载的药物在人体复杂的环境中不被降解,随后通过膜融合将药物直接运输至细胞质中,使药物摄取量更大、循环时间更久、药物释放更加持续。相比于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、AAV 等病毒载体, EV 毒性低,无整合及致畸致瘤风险。与合成纳米载体相比, EV 输送系统在靶向性和药代动力学方面具有显著优势。内源性纳米载体具有更好的体内生物相容性,清除率低。纳米尺度的 EV 可通过包括血脑屏障在内的绝大多数生物屏障系统,其表面存在一些特殊的蛋白,能避免网状内皮系统的捕获,逃脱单核吞噬细胞系统的快速清除,引起的有害免疫反应极低,纳米级分子的 EV 可利用增强渗透滞留效应渗入到肿瘤内发挥作用。EV 也可迁移至无血液供应的组织或区域,如致密的软骨基质^[21]。此外,可通过改造 EV 的表面蛋白实现多种目的,例可将靶向细胞或组织的肽附加在 EV 表面,以实现针对特定组织的选择性靶向,避免在其他器官中不必要的积累,从而降低全身毒性^[14]。

2.2 基于 EV 疗法的存在的问题 EV 的临床转化受到大规模生产、纯化、修饰和储存的挑战,且 EV 亚群之间的异质性对于生产制造和临床转化的质量控制提出了要求。EV 作为载体也面临着许多问题,如载药效率较低、封装率低;残留的转染试剂可能会影响封装过程和改变 EV 的细胞功能;电穿孔法易引起 EV 聚集,对药物和 EV 的完整性会产生影响等。肿瘤细胞分泌的 EV 存在促进肿瘤生长及免疫抑制的风险,含有的肿瘤相关抗原和免疫抑制分子能够下调免疫系统的应答,还能传递某些抑制信号,在机体免疫应答过程中起负性调节作用,诱导肿瘤细胞形成免疫耐受。促进肿瘤转移的蛋白质和 RNA 也可利用 EV 作为逃逸载体而免受机体的免疫应答作用。此外,基因修饰后的 EV 是否会引起机体免疫反应、是否保持原有功能尚不确定。目前,人们对 EV 的了解尚不足,天然外泌体难以体内示踪,其在人和动物体内的生物分布仍有待阐明。

3 EV 的监管

EV 领域相对较新,其来源广、种类繁多,难以统一归类并研究,相关知识涉及多个领域和学科。目前的技术手段对于 EV 这样纳米级的非细胞结构的操作尚存在一定困难。不同的操作人员、仪器、实验系统以及生物标本来源均会引起实验结果的差异^[22]。明确分类、规范实验方法、保证实验的严谨性和可重复性成为行业内亟需了解并亟待解决的问题。

2011 年,国际细胞外囊泡协会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)成立,并与欧盟欧洲科技合作组织(European Cooperation in Science and Technology, COST)组成了欧洲健康与疾病微囊和外泌体网络(European Network on Microvesicles and Exosomes in Health and Disease, ME-HaD)^[23]。ISEV 和 ME-HaD 的成立旨在规范 EV 领域的研究,促进学术、临床转化及工业化生产之间的交流,以加强对 EV 的基本理解和临床转化潜力。ISEV 和 ME-HaD 发表了多份立场声明和文件,为 EV 的基础研究和临床转化提供了信息,并提出基本指导要求。美国 FDA 明确将外泌体纳入动物细胞、组织以及基于细胞和组织的产品(Animal Cells, Tissues, and Cell- and Tissue-Based Products, ACTPs)。

3.1 ISEV 和 ME-HaD 立场声明及文件 为了提高实验结果的可靠性和可重复性, ISEV 于 2014 年发表了一篇立场声明 MISEV2014^[22],内容是“细胞外囊泡研究的最低实验要求”,包括 EV 的分离、鉴定和功能研

究。2015 年,ME-HaD 与 ISEV 联合发表立场声明^[7],重点介绍了 EV 生产和临床应用必须考虑的安全和监管要求。随着研究者对 EV 的研究不断深入,EV 领域的知识不断演变,ISVE 在 2017 年^[24]和 2018 年^[2]分别对 MISEV2014 中的内容进行了更新和补充,MISEV2018 还增加了规范 EV 命名的建议。MISEV 作为业内研究者的共识,是目前国际公认的 EV 指导要求。

此外,ISEV 在 2013 年发表立场文件^[25],指出了 EV 样品采集、分离和分析方法标准化建议;2013 年^[26]和 2017 年^[27]发表的立场文件中概述了 EV RNA 领域的知识现状,讨论了 EV RNA 分析和生物信息学;2019 年发表了关于 EV 生物膜的立场文件^[28],列举了 EV 生物膜的生物发生、稳定性、摄取、内容物转移、研究技术和功能分析;2021 年 5 月,最新发表了关于尿液 EV 的立场文件^[29],介绍了 EV 的生物学信息以及当前收集、分离、表征尿液 EV 的技术手段,分析了基于尿液 EV 临床应用分析中的发展趋势和挑战,并提出在尿液 EV 研究中标准化,提高严谨性和可重复性的建议。

3.2 ISEV 建议分类及基于 EV 疗法的监管建议 由于当前对于 EV 的了解尚不够深入,目前尚无专门针对基于 EV 疗法的相关政策和法规出台。EV 可归类为生物制品,基于 EV 的疗法受到欧盟、美国、澳大利亚、日本和中国有关生物制品的监管。ISEV 建议对基于 EV 的疗法进行分类^[10]:①来自未经基因修饰的细胞的天然 EV;②来自基因修饰的细胞的非转基因天然 EV;③来自基因修饰的细胞的转基因天然 EV,分类属于生物制品中的基因治疗产品;④EV 作为化学药物或其他分子成分的药物递送系统,属于生物和化学联合治疗,归类为生物药物。必须确定 EV 是否为有效成分,若不是有效成分,则被视为“赋形剂”。

由于 EV 的特殊性,可能需要专门针对基于 EV 疗法的指导原则^[10]。EV 领域发展迅速,建议各国药监部门对 EV 类产品引起重视、及时跟进,希望通过出台技术指导文件来规范和指导 EV 产品的研发上市,促进 EV 产业的发展。

4 EV 的非临床评价策略

随着 EV 临床试验的大量开展,基于 EV 疗法的安全性和有效性是关注重点。EV 多来源于细胞,在复杂性、组成和生物学作用方面可能与其来源材料有许多相似之处,基于 EV 的治疗药物将与基于细胞治疗产品密切相关。与细胞治疗产品相同,传统的非临床评价方法及标准在 EV 的评价上具有一定的

局限性。因此,在 EV 的非临床研究中,研究者应设计合理的试验,证明其有效性并观察潜在毒性,为临床试验提供更多参考依据。EV 的非临床研究可能包括体内外药效研究、药代动力学研究以及非临床安全性研究。

4.1 非临床研究的一般原则 EV 非临床研究尚无特定指导原则,临床前评价经验较少,结合 ME-HaD 对基于 EV 疗法安全性研究的建议,应按照“product by product”的原则进行试验设计。需重视概念验证 (proof of concept, POC) 试验,并通过 POC 研究初步验证药效、作用机制及靶点,探索量效关系,优化给药途径和方案,为临床试验提供可行性和有效性的非临床证据。进行非临床研究应关注 EV 是否修饰。受试物需尽量采用具有临床代表性的产品进行非临床研究。动物模型的选择上应明确疾病特异性和物种特异性,根据研究目的来选择适当的动物种属^[12]。所选择的动物生物反应与预期人体反应相似,必要时可考虑选择疾病模型动物进行安全性研究。在合适的情况下,其药理学、药代动力学、毒理学试验可考虑联合开展。给药方式应能最大程度模拟临床拟用给药方式。此外还应关注系统给药或局部给药的毒性风险,以及给药方式的潜在风险。应用同种异体 EV 时,必须考虑组织相容性的潜在影响^[10]。此外,有研究结果显示,脂肪组织来源和心脏来源的 EV 比骨髓来源的 EV 显示出更强的血管生成能力^[30-31]。骨髓来源的 EV 的产生能力和分泌谱高于脂肪来源的 EV^[32],表明不同组织来源的 EV 具有不同的活性。但目前尚未研究比较不同物种的 EV。基于 EV 疗法的非临床研究必须考虑到不同物种及不同来源(自体、同种异体、异体、异种)的 EV 的生物学差异。

4.2 药学研究 EV 的生产使用活细胞,制备过程中的微小变化可能会对 EV 的产品特性产生深远影响。在评估产品的整体风险时,应考虑各种因素对产品风险的影响,如细胞的来源、操作程度、培养时间、存活情况和代次,EV 的储存条件,物理性及化学性处理或基因修饰/改造对 EV 特性的改变程度,使用方式以及预处理等多方面因素。

对于 EV 的质量控制,需定义关键质量属性。评估这些属性的方法可包括评估亲代细胞特性(如评估生存力和表面标记表达以评估表型)、EV 特征(如评估数量、大小、表面标记表达和内容物)、微生物污染(如检测内毒素和支原体)和功能活性^[33]。对于批间差异性的评估,可引入生物类似药研究中的概念,即受试物的分析特性应与参照药高度相似^[34]。

EV 的表征是安全性、有效性的先决条件。目前

尚无特定的指导原则用于指导 EV 制剂的表征,参考国家药品监督管理局 2008 年颁布的《多组分生化药注射剂基本技术要求(试行)》执行,应尽可能对所含组分进行特征性鉴别,如组成过于复杂,应至少明确所含的起药效的主要成分。MISEV2018 中指出了 EV 表征的最低实验要求和检测技术,包括量化、整体和单个特征描述及拓扑结构的表征要求(表 3)^[2]。MISEV2018 中虽未提及对 EV 作为载体时的包封率要求,但 EV 作为药品仍需关注包封率。

4.3 药效学和药代动力学研究 大多数 EV 是在体外获得,其在体内的分泌、转移和蓄积部位并不清楚^[35],EV 可在递送部位和周围被细胞相对较快地内化,通常进入非特定的细胞类型和全身循环。结合生物分布实验,可以研究 EV 的半衰期和降解情况,监测周期应设合适的时间间隔,来显示“EV 命运”。若 EV 表面设计了靶向的工程改造,关注靶组织和非靶组织分布特点有利于进一步研究该产品的有效性和安全性。但 EV 中生物活性成分的多样性使得临床前药效和药代动力学研究更为复杂。因此,需找出可量化的方式来进行 EV 的生物分布研究,目前已研究通过采用放射性同位素标记成像技术^[36]、活体成像技术^[37]、聚合酶链反应分析^[37-38]以及流式细胞术^[39-40]等方式开展相关研究。若对 EV 标记进行体内示踪,则必须考虑染料等标记方式对 EV 组分功能的影响^[7],且需排除游离染料本身信号的风险^[37],可综合运用一种或多种合适的细胞追踪方法,并进行必要的验证。

当采用 EV 作为药物载体时,参考国家药品监督管理局 2021 年 8 月颁布的《纳米药物非临床药代动

力学研究技术指导原则(试行)》和 2008 年颁布的《化学药品注射剂基本技术要求(试行)》中特殊注射剂(如脂质体、微球、微乳等)的要求,尽量解析载药粒子和装载药物等多种形态成分在体内的相互关系。如为改良型生物制品,建议进行普通注射剂型和 EV 载体药物的比较药代动力学研究,根据研究结果确定如何开展进一步的毒理研究。

4.4 非临床安全性研究 目前国内尚无 EV 相关产品的非临床研究指导性文件,但因 EV 主要来源于细胞,当 EV 作为治疗药物时,临床前试验设计需参考细胞治疗产品相关指导原则要求^[41-42],若同时存在基因编辑操作,则兼具了基因治疗产品特点,还需参考基因治疗产品相关指导原则^[43-45]进行临床前研究设计。当 EV 作为药物载体时,除 EV 本身关注因素外,还需参考化学药或生物制品相关指导原则,针对包载药物本身的特点制定基于包载药物的临床前研究策略,可参考国家药品监督管理局 2021 年 8 月颁布的《纳米药物非临床安全性研究技术指导原则(试行)》。

与细胞和基因治疗产品相同,EV 的非临床安全性研究同样应尽量遵从《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)。对于某些在非 GLP 状况下开展的研究或检测,应予说明并评估非 GLP 对试验结果可靠性、完整性及对产品总体安全性评价的影响。

非临床安全性研究主要包括一般毒性研究(以常规毒理学检测终点为主要观察指标的单次给药和/或多次给药毒性研究),以心血管、呼吸和中枢神经系统为主的安全药理研究,制剂安全性研究,以及遗传和生殖毒性研究等。

表 3 MISEV2018 中对 EV 表征的最低实验要求

Tab. 3 Minimum experimental requirements for characterization of EV in MISEV 2018

表征内容	最低实验要求	检测技术
量化	测定总蛋白量、粒子数或总脂质量	BCA 蛋白浓度检测 / 纳米粒子跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA) / 荧光的磷脂染料如 DiI 等
EV 整体特征描述	至少 3 种 EV 蛋白标记物呈阳性,其中跨膜 / 脂质结合蛋白质(如 CD9、CD63、CD81)和胞质蛋白(如 ALIX、TSG101、HSP70、HSP90)分别至少 1 种;至少 1 种阴性蛋白标志物(如内质网标志物 CANX、高尔基体标志物 GM130、线粒体标志物 Cytochrome C、细胞核标志物 Histones 等)	蛋白质印迹法(Western blot)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、流式细胞仪等
单个 EV 特征描述	使用两种不同但互补的技术,如电子显微镜和 NTA	高分辨率流式细胞术、电子或原子力显微镜等
EV 拓扑结构	评估 EV 关联组分的拓扑结构(EV 表面还是 EV 内部)	蛋白酶 / 核酸酶消化等

一般毒性研究选择毒理学终点时,除应包含常规毒理学评价终点外,还需关注免疫原性和免疫毒性风险。虽然在 EV 治疗中尚未研究或观察到潜在致命反应细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS),但在基于 EV 的癌症免疫治疗中,CRS 应被考虑在内。EV 携带的蛋白质和脂质等组分也可能引入免疫原性和免疫毒性风险,在临床前研究阶段同样需适当关注。建议在非临床研究阶段重点观察相关的免疫指标,包括血液学(含白细胞分类)、免疫细胞表型分型、血清球蛋白水平、详细的免疫器官组织病理学检查和淋巴器官称重等。若上述研究发现明显异常,还应考虑进行进一步的免疫功能试验以明确其作用的机理,为临床研究方案的设计提供重要参考。此外,不同于亲本细胞, EV 本身不能在体内增殖分化,但可能携带了较为复杂的亲本细胞的遗传信息,可能具有潜在的致癌风险,除需关注亲本细胞本身的成瘤/致瘤性风险外,还需在 EV 安全性评价中重点关注体内试验中异常/异位增生性病变(如增生、肿瘤)发生情况,初步评估其致瘤性风险。如目前备受关注的环状 RNA(circRNA)已被证明广泛存在于 EV^[46], circRNA 具有独立于亲本 mRNA 的生理和病理功能,其治疗机制为体内目标 circRNA 分子的过表达或敲低^[47]。基于 EV 的治疗需关注 circRNA 过表达产生潜在的错误剪接副产物(包括同源线性 RNA)的风险,以及通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)方法敲除 circRNA 对线性同源基因或其他基因的影响^[47]。

5 小结与展望

EV 应用前景十分广阔,未来的发展应集中在辅助现有治疗方法上,完善现有疗法的不足。最近,实时和高分辨率显微镜技术结合创新的 EV 标记策略和报告系统,为在体内生理环境和单囊泡水平研究 EV 提供了新工具^[48]。目前基于 EV 的治疗作为药物或医疗技术的研发进程尚处于起步阶段,距离工业化生产并成功应用于临床尚有很长一段距离。开发和完善 EV 的表征和表型检测技术,研究外泌体结构和组成,优化生产工艺,减少组成的异质性,将有利于其在疾病诊断和治疗中的应用。基于目前技术水平的限制及对 EV 认识的不足, EV 在研究、监管、生产、非临床研究和临床试验等方面均还需标准化的规则。尤其是临床前研究,尚需各项体内和体外试验来阐明 EV 各种生物学功能的机制,加快推进 EV 的临床转化。相信随着各项技术的快速发展, EV 作

为无细胞治疗方式和新型载药系统,将具有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] ABHANGE K, MAKLER A, WEN Y, *et al.* Small extracellular vesicles in cancer [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6 (11): 3705-3743.
- [2] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7 (1): 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [3] KALRA H, DRUMMEN G P, MATHIVANAN S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (2): 170.
- [4] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164 (6): 1226-1232.
- [5] RECORD M, CARAYON K, POIROT M, *et al.* Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841 (1): 108-120.
- [6] SHAO H, IM H, CASTRO C M, *et al.* New technologies for analysis of extracellular vesicles [J]. *Chem Rev*, 2018, 118 (4): 1917-1950.
- [7] LENER T, GIMONA M, AIGNER L, *et al.* Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 30087. DOI: 10.3402/jev.v4.30087.
- [8] MARAR C, STARICH B, WIRTZ D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22 (5): 560-570.
- [9] TUNG S L, BOARDMAN D A, SEN M, *et al.* Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 6065.
- [10] TUNG S L, FANELLI G, MATTHEWS R I, *et al.* Regulatory T cell extracellular vesicles modify T-effector cell cytokine production and protect against human skin allograft damage [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 317.
- [11] CHEN L, HUANG H, ZHANG W, *et al.* Exosomes derived from T regulatory cells suppress CD8+ cytotoxic T lymphocyte proliferation and prolong liver allograft survival [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 4877-4884.
- [12] TIAN T, ZHANG H X, HE C P, *et al.* Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 150: 137-149.
- [13] DUAN L, XU L, XU X, *et al.* Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, 13 (3): 1387-1397.
- [14] BARILE L, VASSALLI G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 63-78.
- [15] WALKER S, BUSATTO S, PHAM A, *et al.* Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment [J]. *Therano-*

- stics, 2019, 9 (26): 8001-8017.
- [16] DE JONG B, BARROS E R, HOENDEROP J G J, *et al.* Recent advances in extracellular vesicles as drug delivery systems and their potential in precision medicine [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12 (11): 1006.
- [17] SUN H, GUO X, ZENG S, *et al.* A multifunctional liposomal nanoplatform co-delivering hydrophobic and hydrophilic doxorubicin for complete eradication of xenografted tumors [J]. *Nano-scale*, 2019, 11 (38): 17759-17772.
- [18] WHITESIDE T L. Therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer by engineered exosomes [J]. *Transl Cancer Res*, 2017, 6 (Suppl9): S1406-S1408. DOI: 10.21037/tcr.2017.10.32.
- [19] GAO L, WANG L, WEI Y, *et al.* Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12 (561): eaay1318. DOI: 10.1126/scitranslmed.aay1318.
- [20] MAUMUS M, ROZIER P, BOULESTREAU J, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: opportunities and challenges for clinical translation [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 997.
- [21] LIANG Y, XU X, LI X, *et al.* Chondrocyte-targeted microRNA delivery by engineered exosomes toward a cell-free osteoarthritis therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12 (33): 36938-36947.
- [22] LÖTVALL J, HILL A F, HOCHBERG F, *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.
- [23] O'DRISCOLL L, STOOBVOGEL W, THÉRY C, *et al.* European network on microvesicles and exosomes in health and disease (ME-HaD) [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98: 1-3.
- [24] WITWER K W, SOEKMADJI C, HILL A F, *et al.* Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1): 1396823. DOI: 10.1080/20013078.2017.1396823.
- [25] WITWER K W, BUZÁS E I, BEMIS L T, *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- [26] HILL A F, PEGTEL D M, LAMBERTZ U, *et al.* ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.22859.
- [27] MATEESCU B, KOWAL E J, VAN BALKOM B W, *et al.* Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1): 1286095. DOI:10.1080/20013078.2017.1286095.
- [28] RUSSELL A E, SNEIDER A, WITWER K W, *et al.* Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8 (1): 1684862. DOI: 10.1080/20013078.2019.1684862.
- [29] ERDBRÜGGER U, BLIJSDORP C J, BIJNSDORP I V, *et al.* Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (7): e12093. DOI: 10.1002/jev2.12093.
- [30] CHANCET C, HERZIG M C, CHRISTY B A, *et al.* Human mesenchymal stromal cell source and culture conditions influence extracellular vesicle angiogenic and metabolic effects on human endothelial cells *in vitro* [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2020, 89 (2S Suppl 2): S100-S108. DOI: 10.1097/TA.0000000000002661.
- [31] KANG I S, SUH J, LEE M N, *et al.* Characterization of human cardiac mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles comparing with human bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *BMB Rep*, 2020, 53 (2): 118-123.
- [32] VILLATORO A J, ALCOHOLADO C, MARTÍN-ASTORGA M C, *et al.* Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2019, 208: 6-15.
- [33] ROHDE E, PACHLER K, GIMONA M. Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21 (6): 581-592.
- [34] HERRMANN I K, WOOD M J A, FUHRMANN G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16 (7): 748-759.
- [35] ANDROUIN A, VERWEIJ F J, VAN NIEL G. Zebrafish as a preclinical model for extracellular vesicle-based therapeutic development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113815. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.025.
- [36] ALMEIDA S, SANTOS L, FALCÃO A, *et al.* *In vivo* tracking of extracellular vesicles by nuclear imaging: advances in radiolabeling strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (24): 9443.
- [37] WORST T S, PREVITI C, NITSCHKE K, *et al.* miR-10a-5p and miR-29b-3p as extracellular vesicle-associated prostate cancer detection markers [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 12 (1): 43.
- [38] YEKULA A, MINCIACCHI V R, MORELLO M, *et al.* Large and small extracellular vesicles released by glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 9 (1): 1689784. DOI: 10.1080/20013078.2019.1689784.
- [39] TERTEL T, GÖRGENS A, GIEBEL B. Analysis of individual extracellular vesicles by imaging flow cytometry [J]. *Methods Enzymol*, 2020, 645: 55-78.
- [40] RICKLEFS F L, MAIRE C L, REIMER R, *et al.* Imaging flow cytometry facilitates multiparametric characterization of extracellular vesicles in malignant brain tumours [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8 (1): 1588555. DOI:10.1080/20013078.2019.1588555.
- [41] 国家药品监督管理局药品审评中心. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2017-12-22)[2022-05-15]. <https://www.cde.org.cn/zdzyz/domesticinfopage?zdzyzIdC-ODE=452c529b299638297210fe4a1294eb31>.

- association with epigenetic modifications [J]. *Genome Res*, 2007, 7 (8): 1186-1194.
- [50] BARR S D, CIUFFI A, LEIPZIG J, *et al.* HIV integration site selection: targeting in macrophages and the effects of different routes of viral entry [J]. *Mol Ther*, 2006, 14 (2): 218-225.
- [51] CIUFFI A, MITCHELL R S, HOFFMANN C, *et al.* Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested T cells [J]. *J Virol*, 2006, 80 (12): 5833-5841.
- [52] CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Y, *et al.* CAR T cell therapy: current status and future perspectives [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (12): 1985-1995.
- [53] CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Y, *et al.* CAR T cell therapy: current status and future perspectives [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (12): 1985-1995.
- [54] STERNER R C, STERNAR R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies [J]. *Blood Cancer*, 2021, 11 (4): 69.
- [55] HARTMANN J, SCHUSSLER-LENZ M, BONDANZA A, *et al.* Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9 (9): 1183-1197.
- [56] GUO B, MHEN H, HUI F, *et al.* CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma [J]. *Cell Immunother*, 2016, 2 (1): 28-35.
- [57] ESHHAR Z, WAKS T, GROSS, *et al.* Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90 (2): 720-724.
- [58] ORMHOJ M, BEDOYA F, MAUS M V, *et al.* CARs in the lead against multiple myeloma [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2017, 2 (2): 119-125.
- [59] WANG Z G, WU Z Q, YIU L, *et al.* New development in CAR-T cell therapy [J]. *Hematol Oncol*, 2017, 10 (1): 53.
- [60] CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Y, *et al.* CAR T cell therapy: current status and future perspectives [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (12): 1985-1995.
- [61] CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Y, *et al.* CAR T cell therapy: current status and future perspectives [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (12): 1985-1995.
- [62] CHONG E A, SVOBODA J, DWIVEDY NASTA S, *et al.* Sequential anti-CD19 directed chimeric antigen receptor modified T-cell therapy (CART19) and PD-1 blockade with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphomas [J]. *Blood*, 2018, 132 (Suppl 1): 4198.
- [63] GAUTHIER J, HIRAYAMA A V, PURUSHE J, *et al.* Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure [J]. *Blood*, 2020, 135 (19): 1650-1660.
- [64] SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, GODEL P, SUBKLEWE M, *et al.* Cytokine release syndrome [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6 (1): 56.

收稿日期:2023-01-07 编辑:王佳凤

(上接第 1255 页)

- [42] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(征求意见稿)》意见的通知 [EB/OL]. (2020-09-30)[2022-05-15]. <https://www.cde.org.cn/zdlyz/opinioninfopage?zdyzIdCODE=5ebd6a-292d-46c5988ac8837081473a1e>.
- [43] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《基因修饰细胞治疗产品非临床研究及评价技术指导原则(试行)》意见的通知 [EB/OL]. (2021-02-23)[2022-05-15]. <https://www.cde.org.cn/zdlyz/opinioninfopage?zdyzIdCODE=1bda3483a71-67f1bcdae9667af6cfc7b>.
- [44] 国家药品监督管理局药品审评中心. 基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-12-03)[2022-05-15]. <https://www.cde.org.cn/zdlyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=3c3eef7964f7950ca9a18b9ce095088c>.
- [45] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于《基因治疗产品药
- 学研究与评价技术指导原则(征求意见稿)》征求意见的通知 [EB/OL]. (2020-09-14)[2022-05-15]. <https://www.cde.org.cn/zdlyz/opinioninfopage?zdyzIdCODE=68ff22adad8c94aa73-a57c84b764c2ae>.
- [46] LI J, ZHANG G, LIU C G, *et al.* The potential role of exosomal circRNAs in the tumor microenvironment: insights into cancer diagnosis and therapy [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (1): 87-104.
- [47] WU N, QADIR J, YANG B B. CircRNA perspective: new strategies for RNA therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28 (4): 343-344.
- [48] VERWEIJ F J, BALAJ L, BOULANGER C M, *et al.* The power of imaging to understand extracellular vesicle biology *in vivo* [J]. *Nat Methods*, 2021, 18 (9): 1013-1026.

收稿日期:2023-01-26 编辑:何巍