(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992659 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.01

(22) Дата подачи заявки
2018.05.11

(51) Int. Cl. ***C12N 15/10*** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЗАГРУЗКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ХИМИЧЕСКИМИ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ/МОЛЕКУЛАМИ

(31) **62/504,941; 62/631,060**
(32) **2017.05.11; 2018.02.15**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/032226**
(87) **WO 2018/209182 2018.11.15**
(88) **2018.12.20**

(71) Заявитель:
ДЗЕ РЕСЁЧ ФАУНДЭЙШЕН ФОР ДЗЕ ШТАТ ЮНИВЕРСИТИ ОВ НЬЮ ЙОРК (US)

(72) Изобретатель:
Нгуен Джулиан, Фергусон Скотт (US)

(74) Представитель:
Рыбина Н.А., Рыбин В.Н. (RU)

(57) Представлены нуклеотидные последовательности РНК, называемые ЭКЗО-кодами, и более длинные РНК-полинуклеотиды, которые содержат ЭКЗО-коды. ЭКЗО-коды обеспечивают РНК способностью a) быть селективно отсортированными во внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, и b) к доставке различных видов грузов для программирования или перепрограммирования внеклеточных везикул и клеток, которые получают экзосомы. Также представлены способы получения ЭКЗО-кодов, модификации клеток с использованием ЭКЗО-кодов, векторы экспрессии, кодирующие ЭКЗО-коды, а также экзосомы и другие секретируемые везикулы, которые включают РНК-полинуклеотиды, которые содержат ЭКЗО-коды.

201992659 A1

201992659 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЗАГРУЗКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ХИМИЧЕСКИМИ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ/МОЛЕКУЛАМИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[1] Данная заявка претендует на преимущество приоритета по предварительной заявке США № 62/504,941, поданной 11 мая 2017 года, и предварительной заявки США № 62/631,060, поданной 15 февраля 2018 года, раскрытие которых включено в данную заявку путем отсылки.

Государственное финансирование

[2] Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства грантами под номерами HL126082, EB021454 и EB023262, предоставленными Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

[3] Настоящее изобретение в общем относится к композициям и способам загрузки экзосом/внеклеточных везикул химическими и биологическими агентами и/или модулирования сортировки груза в экзосомы/внеклеточные везикулы.

Уровень техники

[4] В миллилитре крови человека содержится примерно один миллиард экзосом: липидные везикулы, которые содержат белки, микроРНК (miRNA) и мРНК (mRNA). Клетки выделяют экзосомы во внеклеточную среду, где они участвуют в ряде физиологических и патофизиологических процессов. Экзосомы происходят из мультивезикулярных телец (MVB), которые сливаются с плазматической мембраной клетки перед высвобождением во внеклеточную среду. После высвобождения экзосома может сливаться с соседними клетками, чтобы передать свой груз. В настоящее время известно, что экзосомы не только являются транспортными средствами для нежелательных клеточных белков и «мусорной РНК», но и что клетки активно секретируют экзосомы, чтобы модулировать свою микросреду.

[5] Экзосомы участвуют в патогенезе некоторых заболеваний, включая раковые, нейродегенеративные, аутоиммунные заболевания и заболевания печени. Несколько исследований изучали роль экзосом при росте рака и метастазах [Costa-Silva B, et al. Nat Cell Biol. 2015;17(6):816-826; Grange C, et al. Cancer research. 2011;71(15):5346-5356; Hood JL, et al. Cancer research. 2011;71(11):3792-3801; Kucharzewska P, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

2013;110(18):7312-7317; Peinado H, et al. Nat Med. 2012;18(6):883-891]. Поскольку внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, происходящие из опухолевых клеток, обладают потенциалом для преобразования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в ассоциированные с опухолью миофибробласты, было предложено, что эти экзосомы могут внести свой вклад в развитие опухоли и злокачественного фенотипа путем генерации стромы опухоли [Cho JA, et al. Int J Oncol. 2012;40(1):130-138]. Экзосомы также играют определенную роль в стимулировании метастазов, которые в конечном счете ответственны за более, чем 90% случаев смерти от онкологических заболеваний: лечение метастатического заболевания остается клинической проблемой. Экзосомы, происходящие из раковых клеток, имеют потенциал для преобразования здоровых клеток в формирующие опухоль клетки в их непосредственной микросреде: экзосомы, высвобождаемые из раковых клеток, могут передавать онкогены (в основном через онкогенные малые РНК) в клетки-реципиенты, вызывать миграцию раковых клеток и содействовать ангиогенезу, которые являются критическими «маркерами» рака [Meehan K, et al. Crit Rev Clin Lab Sci. 2015:1-11]. Из-за присущей им способности к системному распространению, они могут также инициировать новый рост опухоли в отдаленных местах путем подготовки предварительной метастатической ниши. В частности, было показано, как экзосомы из раковых 4175-LuT клеток, расположенных в легких, (MDA-MB-231 сублинии рака молочной железы) специфично локализовались в легких и поглощались легочными резидентными фибробластами после системного введения. Эти экзосомы были способны не только перенаправлять миграцию опухолевых клеток с тропностью к костям из костных сайтов в легкие, но и увеличивать метастатический потенциал этих клеток в легком в 10000 раз [Hoshino A, et al. Nature. 2015;527(7578):329-335]. Эти данные указывают на то, что циркулирующие экзосомы подготавливают дискретные сайты для будущих метастатических опухолей в соответствии с гипотезой «семена-почва». Экзосомы и/или внеклеточные везикулы также играют важную роль в физиологических процессах и могут иметь регенеративные эффекты. Например, было показано, что экзосомы/внеклеточные везикулы, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток (MSC), опосредуют восстановление сердечной ткани после инфаркта миокарда путем модуляции среды поврежденной ткани, вызывая ангиогенез, и индуцирования клеточной пролиферации и дифференциации [Barile L et al. Cardiovasc Res. 2014;103(4):530-541; Lai RC. et al. Stem cell research. 2010;4(3):214-222].

[6] Следовательно, существует постоянная и неудовлетворенная потребность в композициях и способах, которые являются полезными для блокирования нежелательной

клеточной коммуникации путем перепрограммирования экзосом для остановки и/или регресса прогрессирования заболевания, а также для перепрограммирования или загрузки экзосом химическими и биологическими агентами таким образом, что они могут доставить другой желаемый груз в клетки-мишени. Настоящее изобретение имеет отношение к этим потребностям.

Сущность изобретения

[7] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидным последовательностям РНК (называемым в данной заявке в отдельных случаях как «ЭКЗО-коды»), которые способны к a) селективной сортировке во внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, и b) доставке различных видов груза для программирования или перепрограммирования внеклеточных везикул. В то время как неограничивающие варианты осуществления настоящего изобретения проиллюстрированы с помощью экзосом, изобретение включает использование ЭКЗО-кодов для сортировки полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, в любые секретируемые мембранные структуры, включая, но необязательно ограничиваясь приведенным, экзосомы, везикулы, микровезикулы, микрочастицы, везикулы, происходящие из эндосом, мультивезикулярные тельца, апоптозные тельца и их комбинации.

[8] В некоторых аспектах настоящее изобретение включает реагент, содержащий ЭКЗО-коды, который включает сегмент РНК, при этом сегмент РНК содержит последовательность ЭКЗО-кода, и при этом агент дополнительно содержит грузовой компонент. Грузовой компонент может быть выбран из полинуклеотидов, пептидов, полипептидов, белков, флуорофоров и малых молекул (лекарств).

[9] Настоящее изобретение включает сравнение эффектов любого модифицированного полинуклеотида и/или модифицированной экзосомы и/или модифицированной клеточной композиции с подходящими референтными образцами. Референтный образец может содержать любой подходящий контроль, значение или измерение функции модифицированных полинуклеотидов и/или модифицированных экзосом и/или модифицированных клеточных композиций, такие как стандартизованная кривая, титрование, площадь под кривой или сравнение со способностью композиций или процессов, встречающихся в природе, включая, но не ограничиваясь, эффективность, кинетику, количество и т.д., сортировки РНК-экзосом в немодифицированных или других системах контроля.

[10] Изобретение включает композиции, включая, но не ограничиваясь, фармацевтические композиции, приемлемые для медицинского и/или ветеринарного

использования, при этом композиции содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Фармацевтические композиции, как правило, содержат, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, разбавитель и тому подобное. Изобретение включает клеточные культуры, модифицированные для продуцирования экзосом, которые содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, среду для культивирования клеток, содержащую экзосомы, а также выделенные и/или очищенные популяции экзосом, при этом, по меньшей мере, некоторые из экзосом в популяции содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, которые содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Изобретение включает способы получения полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, например, путем химического синтеза или транскрипцией *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, включены комбинации различных полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, при этом комбинация имеет больший, чем аддитивный или синергический эффект на, по меньшей мере, одно свойство и/или эффект сортировки ЭКЗО-кода/экзосомы на клетку, в которую вводится модифицированная экзосома согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или более, чем одну последовательность ЭКЗО-кода, и могут содержать более, чем одну из той же последовательности ЭКЗО-кода или различных последовательностей ЭКЗО-кодов.

[11] Более подробно, мультивалентность является хорошо установленным подходом в разработке взаимодействий с высоким сродством между двумя фрагментами. По существу, неограниченное количество ЭКЗО-кодов и комбинаций различных ЭКЗО-кодов может быть включено в любой отдельный полинуклеотид для возможности достижения улучшенной доставки экзосом. Однако, может иметь место обратная зависимость между повышенным сродством и размером полинуклеотида, поскольку включается больше ЭКЗО-кодов. Таким образом, в неограничивающих вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением содержат 1, 2, 3 или более ЭКЗО-кодов. Кроме того, хотя преимущество ЭКЗО-кодов реализуется при электропорации непосредственно в живые клетки для активной упаковки экзосом, в тех случаях, когда это невозможно, можно использовать прямую загрузку экзосом. Для целей доставки *in vivo* ЭКЗО-коды могут быть загружены непосредственно в изолированные происходящие от пациента экзосомы по хорошо известным протоколам электропорации. Кроме того, они могут быть включены в любое синтетическое липидное средство доставки, такое как липосомы, катионные липоплексы, другие полимерные

средства доставки или любое основное средство доставки, способное доставлять ЭКЗО-коды в цитоплазму клеток реципиента. Эти клетки могут затем упаковывать ЭКЗО-коды в экзосомы для программирования экзосом *in vivo*, или для других целей.

[12] Настоящее изобретение включает наборы для получения, скрининга и использования ЭКЗО-кодов и полинуклеотидов, содержащих их, для широкого спектра научно-исследовательских, лечебных и профилактических подходов, которые будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом преимуществ настоящего изобретения. Эти наборы могут включать реагенты для получения и скрининга экзосом и могут включать полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды и могут содержать реагенты, необходимые для введения таких полинуклеотидов в клетки.

Краткое описание чертежей

[13] Для более полного понимания сущности и целей настоящего изобретения, должна быть сделана ссылка на следующее подробное описание, взятое в сочетании с сопровождающими фигурами.

[14] Фигура 1 представляет собой неограничивающую иллюстрацию использования полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, для перепрограммирования экзосом, высвобожденных из раковых клеток, и, таким образом, остановки прогрессирования заболевания. (A) Опухолесекретируемые экзосомы, как было показано, подготавливают метастатические ниши в отдаленных органах. (B) Схематическое изображение ЭКЗО-кодов, конъюгированных с терапевтическим грузом для перепрограммирования экзосом, происходящих из опухоли, для остановки прогрессирования заболевания.

[15] Фигура 2 представляет собой схему, иллюстрирующую приспосабливание экзосомального биогенеза для идентификации биомиметических ЭКЗО-кодов, которыми специально обогащены экзосомы. Во время экзосомального биогенеза, некодирующая РНК/мРНК может быть загружена в экзосомы во время внутреннего отщепления мембраны MVB. Загрузка нуклеиновых кислот может происходить посредством: (A) пассивного механизма, и (B)/(C)/(D) с помощью механизмов активной сортировки через последовательности, специфические для последовательностей. (E&F) Экзосомы высвобождаются во внеклеточную среду посредством слияния с клеточной мембраной. (D) Мы адаптировали этот процесс для идентификации ЭКЗО-кодов, описанных в данной заявке.

[16] Фигура 3 представляет собой схематическое изображение подхода скрининга библиотеки РНК, используемого для идентификации ЭКЗО-кодов в

соответствии с настоящим изобретением. Клетки подвергают электропорации большим пулом последовательностей РНК (разнообразие 10^{12}). Экзосомы собирают и РНК-последовательности экстрагируют. После преобразования в кДНК ПЦР-амплифицированные ДНК транскрибируют в РНК для создания пула РНК, используемого для последующих раундов отбора. Раунды отбора повторяют от 6 до 10 раз с повышенным давлением отбора (за счет уменьшения количества вводимых РНК). Illumina-секвенирование следующего поколения было выполнено для раундов отбора от 3 до 10 в MDA-MB-231 клетках, PC-3 клетках, HEK293 клетках, мезенхимальных стволовых клетках и Raw 264.7 клетках.

[17] Фигура 4 показывает иллюстративный пример доказательства правильности концепции использования методов настоящего изобретения для идентификации последовательностей ЭКЗО-кодов. (A) Мотив ЭКЗО-кода был определен после трех раундов отбора. E-значение: 9.5e-018, (B) Для неспецифического контроля, точечные мутации были введены в ЭКЗО-код в высококонсервативных положениях. (C) Это привело к почти полной абляции экзосомального обогащения и четко указывает на специфику нашего нового ЭКЗО-кода. Данные представляют собой среднее ± sd. **P<0,01 согласно двустороннему критерию Стьюдента.

[18] Фигура 5 показывает (A) уменьшение разнообразия библиотеки РНК с каждым раунда отбора. Это показывает, что наша процедура отбора приводит к обогащению специфических последовательностей. (B) Топ 15, обогащенных ЭКЗО-кодов после 10 раундов отбора в MDA-MB-231 клетках.

[19] Фигура 6 показывает обогащение последовательностей РНК после нескольких раундов отбора в MDA-MB-231 клетках, Raw 264.7 клетках, мезенхимальных стволовых клетках и HEK 293 клетках. Были проанализированы считывания на миллион каждой последовательности, присутствующей в раунде отбора 3, 5, 7 и/или 10.

[20] Фигура 7 показывает IUPAC нуклеотидные коды в соответствии с настоящим изобретением и легенду для IUPAC нуклеотидных кодов.

[21] Фигура 8 показывает (A и B) нормированные *in silico* баллы докинга, которые показывают высокую корреляцию (R2=0,82) с экспериментально определенными аффинностями связывания последовательностей РНК с hnRNP L. Последовательности в ЭКЗО-кодах связываются с hnRNP L с спрогнозированными аффинностями связывания 3,23 нМ (CCCCACA) и 223,2 нМ (CACAGCA). (C) Презентация поверхности CCCCACA (белый) связывания с мотивом РНК-распознавания (RRM) HNRNP L. (D) Рассчитанный электростатический потенциал поверхности показывает взаимодействие CCCCACA с

hnRNP L (показаны анионные заряды и катионные заряды). (E) Основным мотивом связывания с hnRNP L, как спрогнозировано в докинге *in silico,* является «CACA». Начальная часть «CACA» с «CCC», которая может быть найдена в нашем мотиве (CCCCCACA), по-видимому, не вызывала стерических препятствий, так как балл докинга *in silico* по-прежнему относил этот мотив в низкий наномолярный диапазон. Связывание CCCCCACA с hnRNP L опосредуется межмолекулярными водородными связями (пунктирные линии). Связывание дополнительно стабилизировано электростатическими взаимодействиями между C4 и Arg102 и путем стэкинг-взаимодействия между A5 и Tyr168. Эти данные согласуются со связыванием hnRNP L с CA-повторами (например, CACACA) или повторами, разделенными спейсерами, такими как CANRCA и CANRCA.

[22] Фигура 9 показывает относительное экзосомальное обогащение ЭКЗО-кодов после электропорации в их родительские клеточные линии (MDA-MB-231 клетки, мезенхимальные стволовые клетки, Raw 264.7 клетки и HEK 293 клетки).

[23] Фигура 10 показывает (A, B и C) анализ соосаждения РНК.

[24] Фигура 11 показывает A) MDA-MB-231 клетки, обработанные контрольной миРНК (siRNA) (смысловая последовательность: UCACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGGA (SEQ ID NO: 61)) или двумя hnRNPM миРНК (смысловая последовательность 1: GCAUAGGAUUUGGAAUAAA (SEQ ID NO: 62)) смысловая последовательность 2: GGAAUGGAAGGCAUAGGAUUU (SEQ ID NO: 63)) при 30 пмоль общей миРНК в 12-луночном планшете с использованием RNAiMAX. A) Три лунки из каждого условия собирали через 48 часов после трансфекции и вестерн-блоттинг проводили для оценки hnRNPM нокдауна (Origene TA301557). B) Процент нокдауна, нормированный к GAPDH, оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ. В течение 48 часов после обработки миРНК, дополнительные 3 лунки из каждого условия подвергали электропорации с 1 мкг ЭКЗО-кода M1 РНК или M8. Через 24 часа после электропорации экзосомы/EV собирали и экстрагировали РНК. Относительную M1 и M8 представленность определяли с помощью кПЦР. Клетки, в которых истощено около 75% hnRNPM, показали уменьшение примерно на 60% при нагрузке M8 ЭКЗО-кодом и уменьшение примерно на 90% при загрузке M1 ЭКЗО-кодом в экзосомах/EV. hnRNPM нокдаун не влияет на сортировку случайной контрольной последовательности (RC).

[25] Фигура 12 показывает (A) схематическое изображение ЭКЗО-код/pre-miR-31 химеры. (B) Экзосомы, перепрограммированые химеризированным ЭКЗО-кодом/pre-miR-31, ингибируют миграцию клеток на 75%. В противоположность этому, экзосомы,

происходящие из клеток, обработанных NS-Ctrl/pre-miR-31 химерой, показали ингибирование миграции MDA-MB-231 клеток только на 31%. По сравнению с pre-miR-31 только контрольное ингибирование не было статистически значимым. (C) Типовые изображения анализа методом зарастания царапин показывают полное закрытие зазора, когда клетки инкубировали экзосомами, происходящими из клеток, обработанных NS-Ctrl/pre-miR-31 и контрольной pre-miR-31. Через 24 часа, существенный зазор может быть еще видно с MDA-MB-231 клетками, обработанными экзосомами, перепрограммированными ЭКЗО-кодом/pre-miR-31. Масштабная метка: 200 мкм. Данные представляют собой среднее ± sd. **P<0,01, *P<0,05 с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием теста Тьюки.

[26] Фигура 13 показывает (A) ЭКЗО-код S6, последовательность №6 из стволовых клеток после 7 раундов отбора добавляли к комплементарной последовательности miR-132, разнесенных друг от друга линкером «A», с образованием верхней нити РНК: GCUGGUCAGGAUGCGGGGGCAAAGUAACAAUCGAAAGCCACGGUUUU (SEQ ID NO: 66); эту РНК затем дуплицировали к синтетической miR-132: AACCGUGGCUUUCGAUUGUUACUU (SEQ ID NO: 67). (B) Мезенхимальные стволовые клетки подвергали электропорации в трех экземплярах с равными молярными количествами синтетических miR-132 в одиночку или miR-132, прикрепленной к S6 ЭКЗО-коду. Экзосомы собирали и определяли количество для miR-132, электропорированная miR-132 повышала количество этой микроРНК в экзосомах мезенхимальных стволовых клеток в 10 раз. Используя ЭКЗО-код S6, достигается дополнительное 6-кратное увеличение экзосомального содержания - увеличение эффективности miR-132 в экзосомах MSC в 60 раз. (C) Анализ ангиогенеза на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC). HUVEC обрабатывали экзосомами, собранными из мезенхимальных стволовых клеток человека, подвергнутых электропорации ЭКЗО-код-MSC6/miR-132 или немодифицированной miR-132. Во всех показанных параметрах экзосомы, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток, обработанных ЭКЗО-код-MSC6/miR-132, показали статистически значимое увеличение числа узлов, количества переходов, общей длины, общей длины ответвлений и количества ответвлений. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием теста Тьюки (N = 3), ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,5.

[27] Фигура 14 показывает схему, показывающую оценку возможностей ЭКЗО-

кодов доставлять груз различных размеров в экзосомы. Содержащие микроРНК/миРНК и мРНК мультивалентные ЭКЗО-коды могут быть доставлены в MDA-MB-231, PC-3, а также в другие клетки (A) с помощью электропорации и (B) с помощью липосомальной, полимерной и пептидной трансфекции, а также с помощью других подходящих способов. Количество микроРНК/миРНК и мРНК, отсортированное в экзосомы, может быть определено количественно с помощью ПЦР-РВ «петля-на-стебле» (для микроРНК/миРНК) и ПЦР-РВ для мРНК.

[28] Фигура 15 показывает увеличение загрузки SNAIL миРНК в стволовые клетки и MDA клетки с использованием модифицированных нуклеотидов.

[29] Фигура 16 показывает в (A): Анализ 1000 лучших последовательностей из последнего раунда отбора по алгоритму мотива MEME продемонстрировал статистически значимые мотивы (показано минимальное E-значение мотивов). Наиболее значимые мотивы из RAW и MSC клеток показывают высокое сходство. (B) Менее статистически значимые мотивы из PC-3 и RAW клеток показывают высокое сходство.

[30] Фигура 17 показывает исследования характеристик экзосом/EV (A) анализом траекторий наночастиц (NTA) популяции экзосом/EV. (B) Трансмиссионной электронной микроскопией (TEM). NTA и TEM показывают, что большинство экзосом/EV попадают в ожидаемый диапазон размеров 30-150 нм. (C) Подсчет частиц с помощью NTA также коррелирует с содержанием белка в качестве вторичных средств подсчета везикул.

[31] Фигура 18 показывает, что мотивы, разделяющие подобные элементы последовательности были выровнены визуально и сгруппированы; стрелки указывают похожие мотивы между клеточными линиями.

[32] Фигура 19 показывает дополнительные последовательности для MSC и MDA-MB-231 клеток. В частности, идентифицированные в подходе *in silico* мотивы и антисмысловая нить SNAIL миРНК были синтезированы в непрерывную нить, разделенную тремя аденинами. Эти конструкции гибридизировали в Cy5-меченую смысловую нить SNAIL РНК и подвергали электропорации в 5 мкг смысловой флуоресцентной репортерной миРНК на 120000 MSC или 300000 MDA-MB-231 клеток в трех экземплярах. Клетки культивировали в среде, свободной от экзосом, в течение 24 ч и экзосомы/EV выделяли с помощью метода Total Exosome Isolation Reagent. Экзосомы/EV затем повторно суспендировали в PBS и связывали с CD63 гранулами в течение ночи при 4°C. Гранулы, связанные с экзосомами/EV, промывали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Были нанесены на схему кратные изменения средней

интенсивности флуоресценции по отношению к фону. Фон был определен как случайный контроль, связанный с Cy5-меченой SNAIL, за исключением гранул, связанных с экзосомами, без Cy5-меченной SNAIL, электропорированной в продуцирующие клетки. Некоторые из спрогнозированных *in silico* мотивов показывают значительное более высокое обогащение, чем контроль. Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Даннетта.

[33] Фигура 20 показывает повышения загрузки ЭКЗО-кодов mCherry мРНК в экзосомы MDA-MB-231 клеток в ~ 7 раз по сравнению с немодифицированной mCherry мРНК.

[34] Фигура 21 показывает сортировку SNAIL миРНК, меченной гибридным ЭКЗО-кодом для экзосом, полученных из MDA-MB-231 клеток. Мутации были введены в гибридный ЭКЗО-код для оценки влияния на сортировку.

[35] Фигура 22 показывает сортировку SNAIL миРНК, меченной M8 ЭКЗО-кодом для экзосом, полученных из MDA-MB-231 клеток. Мутации были введены в M8 ЭКЗО-код для оценки влияния на сортировку.

[36] Фигура 23 показывает сортировку SNAIL миРНК, меченной S6 ЭКЗО-кодом для экзосом, происходящих из MSC. Мутации были введены в S6 ЭКЗО-код для оценки влияния на сортировку.

Подробное описание изобретения

[37] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[38] Каждый числовой диапазон, указанный в данном заявке, включает верхнее и нижнее значения, а также каждый более узкий числовой диапазон, который попадает в него, как если бы такие более узкие численные диапазоны были все явным образом указаны в настоящей заявке.

[39] Изобретение включает все полинуклеотидные и аминокислотные последовательности, описанные в данной заявке. Каждая последовательность РНК включает ее эквивалент ДНК, и каждая последовательность ДНК включает ее эквивалент РНК. Включены комплементарные и анти-параллельные последовательности полинуклеотидов. Настоящее изобретение охватывает каждую последовательность ДНК и РНК, кодирующую полипептиды, раскрытые в данной заявке. Изобретение включает

полинуклеотидные консенсусные последовательности и мотивы.

[40] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидным последовательностям РНК (называемым в данной заявке в отдельных случаях как «ЭКЗО-коды»), которые способны к a) селективной сортировке во внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, и b) доставке различных видов груза для программирования или перепрограммирования внеклеточных везикул. В то время как неограничивающие варианты осуществления изобретения проиллюстрированы с помощью экзосом, изобретение включает использование ЭКЗО-кодов для сортировки полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, в любые секретируемые мембранные структуры, включая, но необязательно ограничиваясь приведенным, экзосомы, везикулы, микровезикулы, микрочастицы, везикулы, происходящие из эндосом, мультивезикулярные тельца, апоптозные тельца и их комбинации.

[41] В отношении одного варианта осуществления, и, как будет понятно специалистам в данной области техники, экзосомы являются мембраносвязанными везикулами, секретируемыми клетками. Они принадлежат к группе внеклеточных везикул, которые в совокупности включают экзосомы, микровезикулы, апоптозные тельца и другие экстра-везикулярные популяции, такие как эктосомы. Их размер находится в диапазоне 30-150 нм. Обогащенные белки в экзосомах включают, но не ограничиваются приведенным, эндосомные и трансмембранные маркеры, такие как тетраспанины (CD63, CD9, CD81), интегрины, молекулы клеточной адгезии (EpCAM), рецепторы фактора роста, гетеротримерные G-протеины и фосфатидилсерин-связывающие MFG-E8/лактадгерин. Кроме того, экзосомы могут быть обогащены в эндосомно- или мембранно-связывающих белках (TSG101), аннексинах, Rab и белках-переносчиках сигнала или каркасных белках. Тем не менее, присутствие любых таких белковых составляющих не требуется для того, чтобы выделяемая везикула считалась экзосомой. В частности, экзосомальная мембранная композиция является разнообразной и может содержать различные пропорции фосфолипидов (таких как фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и фосфатидилсерин), а также их «-лизо» и «глицериновые» производные, сфингомиелин, гликосфинголипиды, церамиды, холестерин (и этерифицированный холестерин), а также лизобисфосфатидиновую кислоту (LBPA) в числе других липидов. Экзосомы, используемые для иллюстрации вариантов осуществления настоящего изобретения, которые модифицированы с использованием ЭКЗО-кодов, как описано далее в данной заявке, могут доставить груз в целевые клетки. В некоторых подходах настоящее изобретение включает

перепрограммирование патологических экзосом. В других подходах изобретение включает модуляцию нуклеиновой кислоты или сортировку груза в экзосомы. В вариантах осуществления, экзосомы или другие секретируемые мембранные структуры содержат РНК-полинуклеотиды, описанные в данной заявке. Экзосома «содержит» РНК-полинуклеотид, когда РНК-полинуклеотид включен в экзосому. Поэтому РНК-полинуклеотид может содержаться во внутренней части экзосомы, как например в водном растворе или смеси, содержащихся в ней, например, в цитозоле или другой клеточной жидкости, которая секретируется в качестве компонента экзосомы или в синтетическом растворе. В вариантах осуществления РНК-полинуклеотид может быть, по меньшей мере, частично встроен в структуру мембраны. В вариантах осуществления часть груза РНК-полинуклеотида также может содержаться внутри экзосомы или груз может быть, по меньшей мере, частично встроен в мембрану, или груз может выступать наружу из мембраны, как например двухслойной экзосомальной мембраны.

[42] Настоящее изобретение включает сравнение эффектов любого модифицированного полинуклеотида и/или модифицированной экзосомы и/или модифицированной клеточной композиции с подходящими референтными образцами. Референтный образец может содержать любой подходящий контроль, значение или измерение функции модифицированных полинуклеотидов и/или модифицированных экзосом и/или модифицированнох клеточных композиций, такие как стандартизованная кривые, титрование, площадь под кривой или сравнение со способностями композиций или процессов, встречающихся в природе, включая, но не ограничиваясь, эффективность, кинетику, количество и т.д., сортировки РНК-экзосом в немодифицированных или других системах контроля. В вариантах осуществления экзосома или другая мембранная структура, в которой РНК-полинуклеотиды содержат последовательность ЭКЗО-кода в соответствии с настоящим изобретением, преимущественно сортируется в экзосомы, секретируемые клеткой, и, как таковые, экзосомы содержат большее количество РНК-полинуклеотидов по отношению к контрольному значению. Подходящие значения контроля будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом преимуществ настоящего изобретения, а также могут включать, например, количество не содержащих ЭКЗО-код РНК, которые сортируются в экзосомы, и/или количество скремблированной последовательности РНК (т.е. полностью или частично генерируемой случайным образом последовательности), которая отсортирована в экзосомы.

[43] В вариантах осуществления любая из последовательностей РНК ЭКЗО-кодов в соответствии с настоящим изобретением может содержать или состоять из

последовательностей или сегментов последовательностей, представленных в описании изобретения, таблицах настоящего изобретения и на чертежах настоящего изобретения. В вариантах осуществления последовательности могут включать одну или несколько вставок, делеций и мутаций, до тех пор, пока они сохраняют свой потенциал, чтобы быть преимущественно сортированными в экзосомы или другие мембранные структуры.

В некоторых вариантах осуществления последовательности ЭКЗО-кодов содержат или состоят из 3-70 нуклеотидов включительно и, включают все целые числа и диапазоны целых чисел между ними. В вариантах осуществления РНК-полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность ЭКЗО-кода, описанную в данной заявке. В вариантах осуществления РНК-полинуклеотид содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 последовательностей ЭКЗО-кодов, описанных в данной заявке.

[44] Экзосомы, модифицированные в соответствии с настоящим изобретением, как правило, будут иметь диаметр 30-150 нм и внутренний радиус приблизительно 10-70 нм, при этом внутренний объем одной экзосомы ($4/3\ \pi R^3$) составляет примерно 4×10^{-24} – 1.5×10^{-21} $м^3$. Объем одного среднего 50 кДа белка или 100 нт молекулы РНК составляет примерно 6×10^{-26} $м^3$. Таким образом, каждая экзосома, как ожидается, способна вместить около 70-25 000 небольших РНК или белковых молекул (см., например, Li, et al. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers, Phil. Trans. R. Soc. B369: 20130502, dx.doi.org/10.1098/rstb.2013, описание которого включено в данную заявку путем отсылки). Поэтому, даже очень большие РНК могут быть включены в экзосомы при условии активного упаковочного аппарата.

[45] В некоторых аспектах изобретение содержит реагент, содержащий ЭКЗО-код, который включает сегмент РНК, при этом сегмент РНК содержит последовательность ЭКЗО-кода, и при этом агент дополнительно содержит грузовой компонент. Грузовой компонент может быть выбран из полинуклеотидов, пептидов, полипептидов, белков, флуорофоров и малых молекул (лекарств).

[46] Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут содержать модификации для улучшения их функции, биодоступности, стабильности и т.п. Например, полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут включать модифицированные нуклеотиды и/или модифицированные нуклеотидные линкеры. Подходящие модификации и способы их получения хорошо известны в данной области техники. Некоторые примеры включают, но не ограничиваются приведенным, полинуклеотиды, которые содержат модифицированные рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. Например, модифицированные рибонуклеотиды могут содержать метилирования и/или

замещения в положении 2' рибозного фрагмента --O--низшей алкильной группой, содержащей 1-6 насыщенных или ненасыщенных атомов углерода, или --O--арильной группой, содержащей 2-6 атомов углерода, причем такая алкильная или арильная группа, может быть незамещенной или может быть замещенной, например, галогеном, гидрокси, трифторметильной, циано, нитро, ацильной, ацилокси, алкокси, карбоксильной, карбоалкоксильной или аминогруппами; или гидрокси, аминогруппой или галогеном. В вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды содержат метилцитидин и/или псевдоуридин. Нуклеотиды могут быть связаны фосфодиэфирными связями или с помощью синтетического линкера, то есть линкера, которые не является фосфодиэфирным линкером. Примеры межнуклеозидных линкеров в полинуклеотидных агентах, которые могут быть использованы в изобретении, включают, но не ограничиваются приведенным, фосфодиэфир, алкилфосфонат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфатэфир, алкилфосфонотиоат, фосфорамидат, карбамат, карбонат, морфолино, фосфаттриэфир, ацетамидат , карбоксиметиловый эфир, или их комбинации.

[47] В некоторых аспектах, как например для модуляции экспрессии гена в клетке-мишени или изменения свойства или функции в экзосоме, и/или для перепрограммирования экзосом, полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут содержать функциональный сегмент полинуклеотида. «Функциональный» сегмент означает сегмент полинуклеотида, который способен оказывать влияние на клетки, в которые он вводится, и, в частности, при введении в качестве компонента, или путем слияния с экзосомой или другой мембранной структурой. В вариантах осуществления, эффект, который оказывается на клетки включает ингибирование транскрипции РНК и/или трансляции белка, редактирование хромосомы, вмешательство в функции фермента, и/или вызов или участие в вызове изменений фенотипа клеток, таких как изменение от патологического фенотипа к непатологическому фенотипу, неограничивающим примером которого является переход от злокачественного к незлокачественному фенотипу. В одном из вариантов осуществления клетка-получатель перепрограммируется для выработки белка, который она не производила до получения полинуклеотида, содержащего ЭКЗО-код. Функциональный сегмент может также вызывать или участвовать в вызывании ингибирования роста клеток, включая, но не ограничиваясь, гибель клеток.

[48] В вариантах осуществления, эффект, который проявляется на клетке, включает экспрессию белка, кодируемого РНК груза, которая является компонентом полинуклеотида, содержащего ЭКЗО-код, описанного в данной заявке. В

неограничивающих вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть адаптированы для использования в сайленсинге или понижающей регуляции мРНК-мишени, опосредованных РНК-интерференцией (RNAi), или могут быть адаптированы для доставки микроРНК (микроРНК) или других некодирующих РНК (нкРНК). Это может быть достигнуто, например, путем присоединения последовательности ЭКЗО-кода к, по меньшей мере, одному агенту RNAi. Агенты RNAi могут быть экспрессированы в клетках, как малые шпилечные РНК (мшРНК). мшРНК представляет собой молекулу РНК, которая содержит смысловую нить, антисмысловую нить и короткую последовательность петли между смысловым и антисмысловым фрагментами. мшРНК экспортируется в цитоплазму, где она обрабатывается дайсером в малую интерферирующую РНК (миРНК). миРНК являются 21-23-нуклеотидными двухцепочечными молекулами РНК, которые распознаются РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC). После введения в RISC, миРНК облегчают расщепление и деградацию мРНК-мишени. Таким образом, для использования в сайленсинге или понижающей регуляции РНК-мишени, опосредованных RNAi, компонент полинуклеотида может быть либо миРНК, мшРНК или микроРНК. В вариантах осуществления функциональный сегмент РНК транскрибируется в цис последовательностью ЭКЗО-кода. В вариантах осуществления функциональный сегмент РНК может быть химически присоединен к последовательности, содержащий ЭКЗО-код. В вариантах осуществления нацеливание РНК с помощью функционального сегмента РНК может быть достигнуто путем использования рибозима в качестве груза. В вариантах осуществление рибозим содержит рибозим типа hammerhead, шпилечный рибозим или рибозим вируса гепатита дельта.

[49] В вариантах осуществления сегмент полинуклеотида, содержащего ЭКЗО-код, включает функциональный сегмент РНК, который может участвовать в CRISPR (коротких палиндромных повторах, регулярно расположенных группами) ДНК или РНК редактирования. В вариантах осуществления РНК груза может быть CRISPR РНК (crРНК) или направляющей РНК, такой как sgРНК. Таким образом, последовательность РНК груза может включать сегмент, который является таким же и комплементарным любому CRISPR сайту в полинуклеотиде-мишени, который может также включать мотив, примыкающий к протоспейсеру (PAM), который обычно представляет собой последовательность ДНК из 2-6 пар оснований, сразу же после последовательности ДНК, на которую нацелена нуклеаза, которая может катализировать разрыв одно- или двуцепочечной ДНК. В вариантах осуществления, сегмент РНК груза, который может

участвовать в CRISPR ДНК или РНК редактировании, будет содержать или состоять из сегмента, который имеет 12-20 нуклеотидов в длину, и может быть таким же или комплементарным так называемой спейсерной последовательности в мишени. 12-20 нуклеотидов, направленных на спейсерную последовательность, могут присутствовать в РНК груза, независимо от того, представляет ли собой РНК-мишень crРНК или направляющую РНК. В вариантах осуществления отдельная транс-активирующая crРНК (tracrРНК) может быть использована для содействия созреванию crРНК. Мишенью могут быть любая РНК или мРНК или ДНК. В неограничивающих вариантах осуществления мишенью могут быть хорошо известные Snail или Slug мРНК, или мРНК S100A4, или их комбинации.

[50] Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут кодировать или не кодировать белок, включая, но необязательно ограничиваясь, белок, который предназначен для облегчения локализации и/или визуализации РНК и/или экзосом, или белок, который способен выполняет функции в экзосоме и/или в клетке-мишени. В вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, может содержать последовательность внутренней посадки рибосомы (IRES). В неограничивающих вариантах осуществления IRES является диким типом или IRES модифицированного вируса энцефаломиокардита или IRES вируса гепатита С. В вариантах осуществления последовательность, проксимальная к IRES, такая как 3’ к IRES, содержит открытую рамку считывания. В вариантах осуществления последовательность 3’ к IRES содержит трансляционный стоп-кодон, так что трансляция открытой рамки считывания может остановиться. В вариантах осуществления хвост поли-А может присутствовать на полинуклеотиде, содержащем ЭКЗО-код, в соответствии с настоящим изобретением. В вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, в соответствии с настоящим изобретением. В вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, настоящего изобретения, может быть снабжен 5’ кэпом. Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения включают полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, по меньшей мере, часть которого может функционировать как мРНК, включая, таким образом, трансляционную открытую рамку считывания. В вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут включать последовательность, кодирующую одну или более нуклеаз, включая, но не ограничиваясь, нуклеазы Cas, такие как нуклеазы Cas9. В вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут кодировать другие нуклеазы, такие как эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), или нуклеазам с мотивом

«цинковые пальцы» (ZFN). Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут кодировать или включать в себя сигналы ядерной локализации.

[51] В некоторых аспектах полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут кодировать и/или могут быть изменены для присоединения к белку, который генерирует детектируемый сигнал, включая, но необязательно ограничиваясь, визуально детектируемый сигнал, флуоресцентный сигнал и т.д. В некоторых подходах, полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть ковалентно связаны с любым пептидом или полипептидом. Тип, последовательность и функция таких фрагментов не особо ограничены, кроме ограничений по размеру экзосомы или другой секретируемой мембранной структуры. В некоторых подходах полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, может быть связан с функциональным белком или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из ферментов, включая, но не ограничиваясь описанными выше, или рецепторных лигандов, транскрипционных факторов, факторов роста, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, пептидных или белковых иммуногенов, которые могут быть использованы для стимуляции иммунного ответа (то есть вакцины), химиотерапевтических агентов на основе белка и токсинов. В некоторых вариантах осуществления, связанный белок включает инсулин, гормон роста или фактор высвобождения гормона роста, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, любой инсулиноподобный фактор роста, фактор свертывания крови, интерферон, любой интерлейкин, лимфотоксин и тому подобное. В вариантах осуществления, связанный белок содержит токсин на основе белка, такой как ферментативно активные токсины, которые включают, но не ограничиваются приведенным, дифтерийную цепь А, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из синегнойной палочки), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь модецина, альфа-сарцин, белки Aleurites fordii, диантиновые белки и белки Phytolaca americana (PAPI, PAPII и PAP-S). В общем, следует ожидать, что белок с объемом $1,5 \times 10^{-21}$ $м^3$ способен присутствовать внутри экзосом с диаметром 30-150 нм. В частности, экзосомы с диаметром 30-150 нм имеют внутренний радиус приблизительно 10-70 нм, при этом внутренний объем одной экзосомы ($4/3\ \pi R^3$) составляет примерно 4×10^{-24} - $1,5 \times 10^{-21}$ $м^3$. Объем одного среднего 50 кДа белка или 100 нт молекулы РНК составляет примерно 6×10^{-26} $м^3$. В неограничивающих вариантах осуществления изобретения каждая экзосома может вместить любые белки с объемом меньшим, чем $1,5 \times 10^{-21}$ $м^3$. В тех случаях, когда ЭКЗО-коды опосредуют сортировку по большим внеклеточным везикулам, могут быть размещены и более крупные белки.

[52] В вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, описанные в данной заявке, секретируют экзосомы, которые содержат полинуклеотиды, и такие экзосомы поглощаются отличными клетками. «Отличные клетки» обозначает клетки, которые не содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, до первоначального воздействия полинуклеотидами, содержащими ЭКЗО-коды, посредством поглощения экзосом. Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут соответствующим образом оказывать влияние на отличные клетки с помощью груза, который является компонентом полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды.

[53] В вариантах осуществления последовательность ЭКЗО-кода не включает в себя последовательность 5’ UAG GGA AGA GAA GGA CAU AUG AU (SEQ ID NO:1) и/или не включает в себя последовательность 5’ UU GAC UAG UAC AUG ACC ACU UGA 3’ (SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах осуществления последовательность ЭКЗО-кода не включает в себя последовательность: ACCCUGCCGCCUGGACUCCGCCUGU (SEQ ID NO:3). В некоторых вариантах осуществления последовательность ЭКЗО-кода не включает в себя GGAG мотив.

[54] Для того, чтобы полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, проявляли свою функцию, их вводят в экзосомы или другие мембранные структуры с использованием любого из множества подходов. В вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, вводят в экзосомы посредством клеточного процессинга.. Таким образом, полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть введены в клетки, которые включают полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, в экзосомы в естественной клеточной среде и оборудовании для обработки экзосом, или их вводят в индивидуума, таким образом, что они вводят клетки в индивидуум и впоследствии включаются в экзосомы. Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, вводят в клетки с помощью любого подходящего способа, примеры которых включают, но не ограничиваются приведенным, электропорацию, инкубацию, активацию клеток и трансфекцию, липидную трансфекцию, липидную доставку, липосомальную доставку, полимерную трансфекцию, полимерную доставку, путем пептидной доставки (т.е., но не ограничиваясь, катионные пептиды, амфифильные пептиды, проникающие в клетки пептиды), осаждение кальция или магния, и осаждение ионов (также известное как осаждение ДНК-кальция фосфата). Таким образом, изобретение включает культуры клеток *in vitro*, содержащие один или более полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, и один или более реагентов, которые облегчают вхождение полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, в клетки. Изобретение

включает шаблоны транскрипции, кодирующие полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, такие как экспрессирующие векторы, сконфигурированные для экспрессии полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды. Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть введены непосредственно в экзосомы или другие везикулярные структуры, как описано в данной заявке, с использованием любых подходящих способов, примеры которых включают, но не ограничиваются приведенным, электропорацию, инкубацию, активацию клеток и трансфекцию, липидную трансфекцию, липидную доставку, липосомальную доставку, полимерную трансфекцию, полимерную доставку, путем пептидной доставки (т.е., но не ограничиваясь, катионные пептиды, амфифильные пептиды, проникающие в клетки пептиды), осаждение кальция или магния, и осаждение ионов (также известное как осаждение ДНК-кальция фосфата).

[55] Изобретение включает композиции, включая, но не ограничиваясь, фармацевтические композиции, пригодные для медицинского и/или ветеринарного использования, при этом композиции содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Фармацевтические композиции, как правило, содержат, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, разбавитель и тому подобное. Изобретение включает клеточные культуры, модифицированные для продуцирования экзосом, которые содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, среду для культивирования клеток, содержащую экзосомы, а также выделенные и/или очищенные популяции экзосом, при этом, по меньшей мере, некоторые из экзосом в популяции содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, которые содержат полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды. Изобретение включает способы получения полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, например, путем химического синтеза или транскрипцией *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, включены комбинации различных полинуклеотидов, содержащие ЭКЗО-коды, при этом комбинация имеет больший, чем аддитивный или синергический эффект на, по меньшей мере, одно свойство и/или эффект сортировки ЭКЗО-кода/экзосомы на клетку, в которую вводится модифицированная экзосома согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или более, чем одну последовательность ЭКЗО-кода, и могут содержать более, чем одну из той же последовательности ЭКЗО-кода или различных последовательностей ЭКЗО-кодов. Более подробно, мультивалентность является хорошо установленным подходом в разработке взаимодействий с высоким сродством между двумя фрагментами. По существу, неограниченное количество ЭКЗО-

кодов и комбинаций различных ЭКЗО-кодов может быть включено в любой отдельный полинуклеотид для возможности достижения улучшенной доставки экзосом. Однако, может иметь место обратная зависимость между повышенным сродством и размером полинуклеотида, поскольку включается больше ЭКЗО-кодов. Таким образом, в неограничивающих вариантах осуществления полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением содержат 1, 2, 3 или более ЭКЗО-кодов. Кроме того, хотя преимущество ЭКЗО-кодов реализуется при электропорации непосредственно в живые клетки для активной упаковки экзосом, в тех случаях, когда это невозможно, можно использовать прямую загрузку экзосом. Для целей доставки *in vivo* ЭКЗО-коды могут быть загружены непосредственно в изолированные происходящие от пациента экзосомы по хорошо известным протоколам электропорации. Они также могут быть включены в любое синтетическое липидное средство доставки, такое как липосомы, катионные липоплексы, другие полимерные средства доставки или любое основное средство доставки, способного доставлять ЭКЗО-коды в цитоплазму клеток реципиента. Эти клетки затем могут упаковывать ЭКЗО-коды в экзосомы для программирования экзосом *in vivo*, или для других целей. В вариантах осуществления изобретения, клетки, которые секретируют экзосомы, описанные в данной заявке, могут находиться в клеточных композициях *in vitro*, таких как эукариотические клетки любого происхождения, линии эукариотических клеток, и тому подобное.

[56] Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть введены индивидууму с использованием любого подходящего способа, техники и подхода. Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть введены индивидууму в виде модифицированной или немодифицированной РНК, или с помощью, например, рекомбинантного вирусного вектора, который может экспрессировать полинуклеотиды, включая, но необязательно ограничиваясь, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и адено-ассоциированные вирусные векторы. В некоторых подходах полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, вводят индивидууму в качестве компонента одного или нескольких клеток, которые могут быть аутологичными клетками или гетерологичными клетками, включая, но необязательно ограничиваясь, стволовые клетки широкого спектра типов и этапов развития. В одном варианте осуществления композиция, содержащая полинуклеотид, содержащий ЭКЗО-код, или полинуклеотид, кодирующий такой ЭКЗО-код, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом. В вариантах осуществления индивидуум нуждается в профилактике и/или терапии одного или нескольких видов рака, нейродегенеративных расстройств, аутоиммунных расстройств

или любого другого расстройства, в котором перепрограммированная экзосома может иметь терапевтическую или профилактическую пользу для индивидуума. В вариантах осуществления изобретения эффективное количество полинуклеотида, содержащего ЭКЗО-код, вводят или экспрессируют в индивидууме таким образом, что экспрессия, по меньшей мере, одной РНК ингибируется или устраняется или экспрессированная РНК, такая как мРНК, распадается, или трансляция мРНК ингибируется. В вариантах осуществления такое введение приводит к улучшению одного или более симптомов заболевания или расстройства у индивидуума. В некоторых аспектах композиции и способы в соответствии с изобретением используют для ингибирования метастазирования, например, путем перепрограммирования экзосом, происходящих из раковых клеток, для уменьшения или устранения их способности превращать здоровые клетки в опухолеобразующие клетки в их непосредственной микросреде и/или для уменьшения или устранения передачи онкогенных факторов, таких как онкогенные малые РНК, в клетки-реципиенты. В других определенных аспектах композиции и способы в соответствии с изобретением используются в связи с регенерацией тканей, например, в контексте заживления ран, включая, но необязательно ограничиваясь, раны, полученные во время медицинских процедур, а также раны, полученные за пределами медицинского назначения, включая, но не ограничиваясь, травму тканей и костей, полученную по любой немедицинской причине. Таким образом, в вариантах осуществления изобретение относится к, например, экстренной и не экстренной медицинской помощи. В вариантах осуществления изобретение относится к стимуляции ангиогенеза, например, в любом случае, когда ангиогенез будет желательным компонентом заживления ран.

[57] Специалисту в данной области техники будет понятно, как отделить модифицированные экзосомы, полученные в соответствии с настоящим изобретением. В общем экзосомы собирают из клеточного супернатанта и они могут быть выделены с помощью дифференциального центрифугирования или центрифугирования с градиентом плотности в соответствии с хорошо известными протоколами. Экзосомы, содержащие полинуклеотиды, могут быть отделены от тех, которые не содержат полинуклеотиды, и могут быть получены подгруппы экзосом. Полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, могут быть выделены из экзосом с использованием стандартных подходов. Последовательности ЭКЗО-кодов могут быть определены с использованием стандартных подходов, включая, но необязательно ограничиваясь, создание и амплификацию кДНК и определение последовательности кДНК с использованием известных способов и устройств секвенирования, включая, но не ограничиваясь, высокопроизводительные

подходы. Таким образом, изобретение включает способы получения, скрининга и идентификации последовательностей ЭКЗО-кодов, как описано далее в данной заявке. В целом способы идентификации ЭКЗО-кодов включают подвергание множества ЭКЗО-кодов, имеющих различные последовательности, действию естественной внутриклеточной среды, которая приспосабливает механизм эндогенного клеточного переноса для сортировки ЭКЗО-кодов в экзосомы. Такой подход называется POSTAL: Процедура органелл-специфичного таргетинга по библиотекам аптамеров. Путем химического синтеза последовательностей РНК высокого разнообразия, мы вводим последовательности, которые могут превзойти природные микроРНК и мРНК по их способности сортироваться в экзосомы. Таким образом, этот метод имеет потенциал выбора для последовательностей, которые показывают улучшенное обогащение в экзосомах по сравнению с существующими подходами, которые ищут мотивы только в эндогенных микроРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, в соответствии с настоящим изобретением показывают преимущественное обогащение в экзосомах по сравнению с встречающимися в природе РНК-полинуклеотидами, которые эндогенно сортируются в экзосомы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют, по меньшей мере, 2-1000 кратное обогащение, включительно, и включая все целые числа и диапазоны целых чисел между ними. Обогащение в экзосомах может быть определенно путем сравнения со значением, полученным из определения обогащения с использованием последовательности дикого типа или эндогенно встречающейся последовательности.

[58] Изобретение включает наборы для получения, скрининга и использования ЭКЗО-кодов и полинуклеотидов, содержащих их, для широкого спектра научно-исследовательских, терапевтических и профилактических подходов, которые будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом преимуществ настоящего изобретения. Наборы могут включать реагенты для получения и скрининга экзосом и могут включать полинуклеотиды, содержащие ЭКЗО-коды, и могут содержать реагенты, необходимые для введения таких полинуклеотидов в клетки.

[59] В одном из аспектов изобретение включает множественную, единую библиотеку и т.д., которая включает, по меньшей мере, два различных полинуклеотида, которые содержат различные последовательности ЭКЗО-кодов, которые описаны в данной заявке. Таким образом, библиотека может содержать от 2 до 1000 различных последовательностей ЭКЗО-кодов. Соответственно, изобретение включает библиотеку,

содержащую от 2 до 10000 различных последовательностей ЭКЗО-кодов, в которой, по меньшей мере, одна из последовательностей ЭКЗО-кода описана в данной заявке.

[60] В одном подходе изобретение включает выбор клетки или типа клетки для модификации путем контактирования с модифицированной экзосомой в соответствии с настоящим изобретением. Способ обычно включает смешивание клеточной композиции с модифицированными экзосомами, так что экзосомы поглощаются клетками и модифицированный полинуклеотид, который содержит ЭКЗО-код и любой конкретный груз, которым полинуклеотид был модифицирован, высвобождается в цитоплазму. Впоследствии модифицированный полинуклеотид, который содержит ЭКЗО-код, может оказывать свое влияние на клетку-мишень. Эти подходы могут быть использованы *in vitro*, и, как ожидается, будут пригодны для использования *in vivo*. Таким образом, изобретение включает выбор индивидуума, который нуждается в модификации и/или перепрограммировании экзосом, и введение индивидууму полинуклеотида, содержащего ЭКЗО-код, который охватывается настоящим изобретением.

[61] Следующие примеры приведены для иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, но не предназначены для ограничения его каким-либо образом.

ПРИМЕР 1

[62] Фигура 1 представляет собой неограничивающую иллюстрацию использования полинуклеотидов, содержащих ЭКЗО-коды, для перепрограммирования экзосом, высвобожденных из раковых клеток, и, таким образом, остановки прогрессирования болезни. (A) Как было показано, опухолево-секретируемые экзосомы подготавливают метастатические ниши в отдаленных органах. (B) Схематическое изображение ЭКЗО-кодов, конъюгированных с терапевтическим грузом для перепрограммирования экзосом, происходящих из опухоли, для остановки прогрессирования заболевания.

[63] Фигура 2 представляет собой схему, иллюстрирующую приспосабливание экзосомального биогенеза для идентификации биомиметических ЭКЗО-кодов, которыми специально обогащены экзосомы. Во время экзосомального биогенеза, некодирующая РНК/мРНК может быть загружена в экзосомы во время внутреннего отщепления мембраны MVB. Загрузка нуклеиновых кислот может происходить посредством: (A) пассивного механизма, и (B)/(C)/(D) с помощью активных механизмов сортировки через последовательности, специфические для последовательностей. (E&F), Экзосомы

высвобождаются во внеклеточную среду посредством слияния с клеточной мембраной. (D) Мы адаптировали этот процесс для идентификации ЭКЗО-кодов, описанных в данной заявке.

[64] Фигура 3 представляет собой схематическое изображение подхода скрининга библиотеки РНК, используемого для идентификации ЭКЗО-кодов в соответствии с настоящим изобретением. Клетки подвергают электропорации большим пулом последовательностей РНК (разнообразие 10^{12}). Экзосомы собирают и последовательности РНК экстрагируют. После преобразования в кДНК ПЦР-амплифицированные ДНК транскрибируют в РНК для создания пула РНК, используемого для последующих раундов отбора. Раунды отбора повторяют 10 раз с повышенным давлением отбора (за счет уменьшения количества вводимых РНК). Illumina-секвенирование следующего поколения было выполнено для раундов отбора от 3 до 10 в MDA-MB-231 клетках, PC-3 клетках, HEK293 клетках, мезенхимальных стволовых клетках и Raw 264.7 клетках.

[65] Пример иллюстративного доказательства правильности концепции использования методов настоящего изобретения для идентификации последовательностей ЭКЗО-кодов представлен на Фигуре 4. Мы скринингговали библиотеки РНК в метастатической MDA-MB-231 клеточной линии рака молочной железы, что привело к идентификации кандидатов ЭКЗО-кодов. В частности, большая библиотека РНК (10^{12} разнообразие видов с центральной 20-основной случайной областью между двумя сайтами праймеров ПЦР) была введена в MDA-MB-231 клетки с помощью электропорации. Чтобы разрешить РНК сортироваться в экзосомы, клетки выращивали в течение 48-72 ч до сбора секретированных экзосом. Обогащенные последовательности РНК экстрагировали из экзосом и подвергали двум дополнительным раундам отбора. Для повышения давления отбора количество вводимых РНК снижали с 50 мкг до 10 мкг РНК в течение нескольких раундов отбора. Считывания обогащенного РНК ЭКЗО-кода были проанализированы с помощью секвенирования следующего поколения (Illumina MiSeq2000, Genomics and Bioinformatics Core, University at Buffalo). Три раунда отбора позволили идентифицировать представителя и неограничивающий ЭКЗО-код, как показано на Фигуре 4. Как можно видеть на Фигуре 4, мотив ЭКЗО-кода был идентифицирован после трех раундов отбора. E-значение: 9.5e-018, (B) Для неспецифического контроля точечные мутации были введены в ЭКЗО-код в высококонсервативных позициях. (C) Это привело к почти полной абляции экзосомального обогащения и четко указывает на специфику нашего нового ЭКЗО-кода.

Данные представляют собой среднее ± sd. ** P <0,01 согласно двустороннему критерию Стьюдента.

[66] При введении в MDA-MB-231 клетки ЭКЗО-коды, изображенные на Фигуре 4, показали 22-кратное обогащение в экзосомах, по сравнению с объемными клеточными лизатами. Для оценки специфичности экзосомального обогащения точечные мутации были введены в ЭКЗО-код, что привело к неспецифическому контролю ACAGUAGAGCCUUCACCGGC (SEQ ID NO: 4)), который показал только фоновое обогащение в экзосомах (~1,25-кратное обогащение соотношения экзосома/клетка). Таким образом, данные показывают, что этот ЭКЗО-код является высокоспецифичным для экзосом. Затем мы проводили дополнительные раунды отбора и идентифицировали дополнительные последовательности РНК, обогащенные в экзосомах. Раунды отбора 3, 5, 7 и 10 были проанализированы на MDA-MB-231 клетках. 15 наиболее представленных последовательностей после десяти раундов отбора показаны на Фигуре 5B. Широкий спектр экзосомального обогащения этих последовательностей (примерно от 185 до 806 раз) обеспечивает основу для выяснения отношения структура-активность.

[67] Как можно видеть на Фигуре 5(A) разнообразие библиотеки РНК уменьшается с каждым раундом отбора. Это показывает, что наша процедура выбора приводит к обогащению специфических последовательностей. 5(B) Топ 15, обогащенных ЭКЗО-кодов после 10 раундов отбора в MDA-MB-231 клетках. После 10 раундов отбора мы смогли идентифицировать дополнительные последовательности, которые могут функционировать в качестве ЭКЗО-кодов. Фигура 6 показывает обогащение последовательности РНК после нескольких раундов отбора в MDA-MB-231 клетках, Raw 264.7 клетках, мезенхимальных стволовых клетках и HEK 293 клетках. Были проанализированы считывания на миллион каждой последовательности, присутствующей в раунде отбора 3, 5, 7 и/или 10. С помощью описательной статистики для распределения обогащения были установлены 6 уровней обогащения на основе стандартного отклонения, при этом самый низкий уровень охватывания составлял до одного стандартного отклонения выше среднего считывания на миллион, а самый высокий уровень обогащения был закреплен для наиболее обогащенных последовательностей, падающих на примерно 32σ выше среднего. Этот сортировочный подход был использован для самого раннего раунда отбора, а средние значения считываний на миллион для каждого кластера наносили на график. Каждый кластер затем наносился на эти уровни для последующих раундов отбора, позволяющих ответвляться в дальнейшие обогащенные или иногда обедненные фракции последовательностей. Изучение

траекторий обогащения последовательностей таким образом с помощью раундов отбора показало, что большинство последовательностей не становятся значительно обогащенными или отобранными. С другой стороны, для 10 топ последовательностей, которые были проверены в качестве потенциальных ЭКЗО-кодов, существует значительное и продолжительное обогащение по сравнению с фоновыми считываниями.

[68] Наши протоколы для идентификации экзосом-обогащенных последовательностей включают раунды отбора, которые приводят к объективному и соответствующему обогащению пула. Оптимизированная поставка большой и разнообразной библиотеки РНК (разнообразие 10^{12}) в MDA-MB-231 клетки, НЕК 293 клетки, МСК, Raw 264.7 клетки и другие типы клеток путем электропорации, приводит в результате к доставке библиотеки РНК в цитоплазму, где последовательности сортируются в экзосомы. Библиотека содержит однонитиевые РНК-последовательности, которые имеют 20 нуклеотидных оснований в длину, фланкированные двумя константными областями для обратной транскрипции и амплификации ПЦР (Trilink Biotechnologies). Экзосомы могут быть собраны через 24-72 часов культивирования. РНК экстрагируют из экзосом с использованием QIAzol лизирующего реагента, транскрибируют обратно и амплифицируют с помощью ПЦР со следующими праймерами: FP 5'-TTCAGGTAATACGACTCACTATAGGGAAGAGA-AGGACATATGAT-3' (SEQ ID NO:5) и RP 5'-TCAAGTGGTCATGTAC-TAGTCAA-3' (SEQ ID NO:6). T7 промотор включен в прямой праймер для облегчения транскрипции в РНК. Продукты ПЦР правильного размера выделяют и транскрибируют в РНК с использованием бесклеточной системы транскрипции (Megashortscript T7 от Ambion).

[69] Высокопроизводительное РНК секвенирование и анализ. Для Illumina MiSeq секвенирования последовательности РНК из раундов отбора 3, 5, 7 и 10 подвергают обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы и праймеров ампликона Illumina, содержащих лигирование адаптера и последовательности ген-специфических праймеров для нашей библиотеки РНК. Были использованы следующие прямые и обратные праймеры: FP5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAGGGAAGAGAAGGACATATGA T-3' (SEQ ID NO:7) и RP5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGTGGTCATG-TACTAGTCAA-3' (SEQ ID NO:8). Полученный продукт амплифицировали с использованием ограниченного числа циклов ПЦР, чтобы избежать переамплификации библиотеки и потенциального смещения. Продукты ПЦР (каждую последовательность,

содержащую лигирование адаптера для гибридизации на чипе) затем секвенировали. Как было сделано для в MDA-MB-231 клеток, вновь сгенерированные данные анализировали с помощью «Fastaptamer»: после обрезки последовательностей адаптера и сайтов праймеров для ПЦР и устранения неправильной длины считывания. Уменьшение количества уникальных считываний и увеличение числа последовательностей, показывающих несколько операций считывания, происходивших в каждом раунде отбора, четко указывает на обогащение экзосом-специфических последовательностей (Фигура 5A).

[70] Оценка обогащения ЭКЗО-кодами в экзосомах и определение кинетики обогащения. ЭКЗО-коды Фигуры 5B и других, описанных в данной заявке, могут быть оценены для экзосомального обогащения, как показано для главного ЭКЗО-кода на Фигуре 4. Вкратце, обогащение вновь идентифицированными ЭКЗО-кодами, определяют с помощью модифицированного протокола петли-на-стебле ПЦР-РВ. Во-первых, РВ-праймер петли-на-стебле гибридизуют с 3’ частью видов РНК, присутствующих в клетке перед обратной транскрипцией экзосомальных лизатов (Applied Biosystems). Продукт РВ будет количественно определен с помощью TaqMan ПЦР в реальном времени. Далее, количественно определяют кинетику экзосомальной сортировки для всех идентифицированных ЭКЗО-кодов. ЭКЗО-коды трансфицируют в соответствующую клеточную линию, и экзосомы собирают через 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч, 60 ч и 72 ч после введения. Экзосомальные ЭКЗО-коды количественно определяют с помощью ПЦР-РВ, и рассчитывают кинетику сортировки для определения взаимосвязи структура-активность в последовательностях.

[71] Анализ конкурентной сортировки. В подходе пять наиболее обогащенных ЭКЗО-кодов для каждой клеточной линии подвергали анализу конкурентной экзосомальной сортировки. После электропорации всех пяти последовательностей в каждую клеточную линию, был проведен анализ для того, чтобы определить, могут ли последовательности быть одновременно отсортированы в экзосомы, и демонстрирует ли какая-либо из них предпочтительную и/или более быструю сортировку в экзосомы.

[72] Настоящее изобретение включает то, что, как полагают, является первой попыткой систематически собирать и анализировать опубликованные данные об экзосомально-обогащенных микроРНК, для идентификации консервативных мотивов, ответственных за активную сортировку. Чтобы идентифицировать экзосомально-обогащенныу мотивы в встречающихся в природе последовательностях, мы провели ретроспективный анализ *in silico* данных микроРНК из публикаций, сообщающих об

относительном содержании микроРНК в клетках и экзосомах. Только микроРНК, которыми были обогащены экзосомы по сравнению с лизатами целых клеток, были выбраны для дальнейшего изучения. В результате было получено в общей сложности 253 последовательности микроРНК. Последовательности были проанализированы с использованием набора MEME для поиска мотивов с марковской моделью фона нулевого порядка и предположением «нуль-или-ничего» для ряда мотивов в последовательности и длины мотивов, ограниченной 4-12 нуклеотидами. Это привело к 3 статистически значимым мотивам (Фигура 7). Глобальный мотив A имел E-значение 1.0e-9, мотив 4.0e-5 и C 2.4e-4.

[73] ЭКЗО-коды, которые показывают значительное экзосомальное обогащение. Настоящее изобретение включает, но не ограничивается, последовательности ЭКЗО-кодов, сгенерированные из экспериментальных данных и из анализов *in silico* (Фиг. 5, 6 и 7). Может быть установлена связь структура-активность для этих последовательностей и их способность опосредовать сортировку.

[74] Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, считается, что экзосомальная сортировка ЭКЗО-кодов регулируется взаимодействием с клеточными белками и их уровнями экспрессии. ЭКЗО-коды в соответствии с настоящим изобретением могут принимать во внимание такие взаимодействия. В частности, наш анализ с использованием карты РНК-связывающих белков (RBPmap) и SYBYL в *in silico* докинге, указывает на то, что одна последовательность ЭКЗО-кода, идентифицированная выше, вероятно, связывается с hnRNP L и G3BP1, оба из которых присутствуют в экзосомах из MDA- MB-231 клеток. HnRNP (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин) белки являются важным семейством РНК-связывающих белков, которые, как уже давно известно, являются ключевыми участниками биогенезе и экспрессии РНК, цитоплазматического экспорта и трансляции мРНК. Данные показывают, что они имеют более широкую функцию в регуляции и распаде микроРНК. В частности, было показано, что hnRNP L регулирует онкогенную способность различных раковых клеток и, следовательно, может сам по себе быть онкогенным. Поразительно, что hnRNP L представляет собой белок, который присутствует в раковых экзосомах. На основании прогнозов *in silico*, мотив «CCCCACA» в нашей последовательности(ях) ЭКЗО-кода, описанной в данной заявке, проявляет низкую наномолярную аффинность, в то время как мотив «CACAGCA» может связываться в высоком наномолярном диапазоне. Была использована модель кристаллической структуры белок-РНК для hnRNP L (RCSB PDB ID: 2MQO). Эти нативные виды РНК (CACACA) были использованы для создания докинг

зоны протомола, а затем мутировали для удовлетворения любых вариаций последовательностей. При поиске решения для 20 поз и выборе лучшей позы в качестве наивысшего «общего балла» с «консенсусным баллом», равным, по меньшей мере, 4, был получен ранговый порядок связывания для 8 РНК. Нормированный *in silico* балл докинга коррелировал с экспериментально определенными аффинностями связывания, полученными из известных ссылок. Это показало сильную связь log-log (r2=0,82), как показано на Фигуре 8B. Нуклеотидные мутации в пределах «CACA» мотива уменьшают аффинность связывания с hnRNP L, как показано на Фигуре 8A. Фигура 8A являет собой демонстрацию *in silico*, которая не предназначена для ограничения. В частности, Фигура 8 (A&B) показывает нормализованные *in silico* баллы докинга, которые показывают высокую корреляцию (r2=0,82) с экспериментально определенными аффинностями связывания последовательностей РНК с hnRNP L (кружки). Последовательности в ЭКЗО-кодах связываются с hnRNP L с спрогнозированными аффинностями связывания 3,23 нМ (CCCCACA) и 223,2 нМ (CACAGCA). (C) Презентация поверхности CCCCACA (белый) связывания с мотивом РНК-распознавания (RRM) HNRNP L. (D) Рассчитанный электростатический потенциал поверхности показывает взаимодействие CCCCACA с hnRNP L (показаны анионные заряды и катионные заряды). (E) Основным мотивом связывания с hnRNP L, как спрогнозировано в докинге *in silico*, является «CACA». Начальная часть CACA» с «CCC», которая может быть найдена в нашем мотиве (CCCCCACA), по-видимому, не вызывала стерических препятствий, так как балл докинга *in silico* по-прежнему относил этот мотив в низкий наномолярный диапазон. Связывание CCCCCACA с hnRNP L опосредуется межмолекулярными водородными связями (пунктирные линии). Связывание дополнительно стабилизировано электростатическими взаимодействиями между C4 и Arg102 и путем стэкинг-взаимодействия между A5 и Tyr168. Эти данные согласуются со связыванием hnRNP L с CA-повторами (например, CACACA) или повторами, разделенными спейсерами, такими как CANRCA и CANRCA. В частности, как показано на Фигуре 8 E, связывание «CCCCACA» в пределах нашего одного из ЭКЗО-кодов, описанных в данной заявке, с hnRNP L опосредуется межмолекулярными водородными связями, показанными в виде желтых пунктирных линий (A5/Prol90, C6/Tyr168/Thr170/Ser169, A7/Ser175). Связывание дополнительно стабилизировано с помощью электростатических взаимодействий между C4 фосфатной группой и Arg102 и путем стэкинг-взаимодействия между A5 и Tyr168. Кроме того, на основе его последовательности можно было бы спрогнозировать, что главный ЭКЗО-код UGUGUGCCCCACAGCAGUG (SEQ ID NO: 9) будет связываться с G3BP1 через

CCCACAGCAG (SEQ ID NO: 10). Подобно hnRNP L, G3BP1 (GTPase активирующий белок (домен SH3) связывающий белок 1) принадлежит к семейству РНК-связывающих белков. G3BP1 играет важную роль в пролиферации MDA-MB-231 и других линий клеток рака молочной железы.

[75] В дополнение к прогнозам *in silico*, изобретение включает экспериментальные определения новых ЭКЗО-код-связывающих белков с использованием анализов соосаждения и масс-спектрометрии. После того, как связанные белки были идентифицированы, выполняется анализ докинга *in silico* для прогнозирования и анализа связывания РНК-мотивов с идентифицированными белками и выяснения связи структура-активность ЭКЗО-кодов и их белковых партнеров. Мы успешно показали, что наш подход *in silico* может правильно спрогнозировать ранговый порядок по степени аффинности связывания РНК-мотивов с hnRNP L (Фигура 8). Нормированные *in silico* баллы докинга (мера аффинности связывания), сгенерированные с использованием SYBYL, показывают высокую корреляцию с экспериментально определенными аффинностями связывания.

Таблица 1:

Ранг	MDA-MB-231 клетки (Раунд 10) Последовательность 5'→3'	Мезенхимальные стволовые клетки (Раунд 7) Последовательность 5'→3'	RAW 264.7 клетки (Раунд 10) Последовательность 5'→3'	HEK 293 клетки (Раунд 7) Последовательность 5'→3'
1	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:11)	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:21)	GAUGGUAAGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:31)	UGAUGUAUUGGUAAGUUUCG (SEQ ID NO:41)
2	GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO:12)	GGUUCAGGGUGUGGGCCGCC (SEQ ID NO:22)	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:32)	UAUAGAUGUGCUAGUUUGCA (SEQ ID NO:42)
3	CCCGCUUCUUCCUCGGGUGG (SEQ ID NO:13)	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:23)	GAUGGUAUGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:33)	UUUCGUGUUUAGCGUUUGAC (SEQ ID NO:43)
4	GUCACUCGGCCUAGUGCGUC (SEQ ID NO:14)	AAGGCCGGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:24)	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:34)	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:44)
5	CCUGACCUUACUCGGGUGGC (SEQ ID NO:15)	GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO:25)	UUCGUGUAUCUAGUGCAGUC (SEQ ID NO:35)	ACGUGUAUUACUAUUGACUA (SEQ ID NO:45)
6	GUGGUCGAUAAGCGUACGCG (SEQ ID NO:16)	GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC (SEQ ID NO:26)	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:36)	GAGGCCUGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:46)
7	AGGGCGUUUGCUCGCGGGUC (SEQ ID NO:17)	GCUGCGAAGUGGGGCAGGUC (SEQ ID NO:27)	UUUCGUGUAUCCUAGUUGCU (SEQ ID NO:37)	UUAGCGUUGUAUUAGUUGCA (SEQ ID NO:47)
8	CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG (SEQ ID NO:18)	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:28)	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:38)	UCAUUGUGCUGAAUUGACUA (SEQ ID NO:48)
9	CAGACGGUACUCAGGUGUGC (SEQ ID NO:19)	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:29)	UUCGUGUUCUGGUUGAGUGU (SEQ ID NO:39)	AAUUACACUGUGCUAGGAUG (SEQ ID NO:49)
10	GGCCUUGGUCGCGUGCUGGC (SEQ ID NO:20)	GGGCGAAAUUGGCAUGGCCG (SEQ ID NO:30)	GCGCGGGAAGGGUGGCAUGG (SEQ ID NO:40)	AUCGAUGUAUGAGUCAUAUA (SEQ ID NO:50)

Таблица 1: Топ 10 последовательностей по числу считываний (от высшего к низшему) при раундах отбора 7 или 10 для MDA-MB-231 клеток, мезенхимальных стволовых клеток, Raw 264.7 клеток, HEK 293 клеток

5

[76] Фигура 9 показывает относительное экзосомальное обогащение ЭКЗО-кодов после электропорации в их родительские клеточные линии (MDA-MB-231 клетки, мезенхимальные стволовые клетки, Raw 264.7 клетки и HEK 293 клетки). Следующие последовательности служат в качестве контрольных последовательностей. Случайная 20N: ACAGUAGAGCCUUCACCGGC (SEQ ID NO: 51), MDA Скремблированная 20N: GCUCUCGGAAGGCUUGGGCU (SEQ ID NO: 52), RAW Скремблированная 20N: AGUCGGGGUAUGCCUGGAUG (SEQ ID NO: 53), ЭКЗО-мотив VB1 из литературы: UGGUCUAGGAUUGUU-GGAGGAG (SEQ ID NO: 54), ЭКЗО-VB2 мотив из литературы: GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC (SEQ ID NO: 55) [из Villarroya-Beltri et al. Nat Commun. 2013;4:2980. doi: 10.1038/ncomms3980.] и ЭКЗО-мотив B из литературы: ACCCUGCCGCCUGGACUCCGCCUGU (SEQ ID NO: 56) [Bolukbasi et al. Mol Ther Nucleic Acids. 2012 Feb 7;1:e10. doi: 10.1038/mtna.2011.2.]. 10 мкг каждой РНК подвергали электропорации в MDA, 6E5 клетки; для RAW, 1.5E6 клетки; для HEK, 1E6 клетки и для MSC, 3E5 клетки с использованием оптимизированных NEON параметров для каждой клеточной линии в наконечнике на 100 мкл. Клетки распределяли в DMEM и промывали три раза. Суспензию клеток для каждой РНК разделяли на 3 лунки 12-луночного планшета и дополняли до 500 мкл ЭКЗО-средой. Клетки культивировали вблизи конфлюэнтности в течение 72 часов до сбора экзосом/EV. Экзосомы/EV ресуспендировали в 100 мкл PBS, 1 мкл использовали для количественного определения экзосом/EV, а оставшийся образец обрабатывали РНКазой, а затем обрабатывали Qiazol для экстракции РНК. 30 нг C. elegans микроРНК 39 (UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO: 57)) и 54 (UACCCGUAA-UCUUCAUAAUCCGAG (SEQ ID NO: 58)) вносили в каждый образец на этой стадии. Суммарную РНК очищали на колонке miRNeasy и кДНК синтезировали с qScript микроРНК кДНК из набора для синтеза от Quanta. РНК оценивали количественно с помощью SYBR Low ROX от Quanta в реакции ПЦР. Копии РНК были получены из стандартной кривой каждой РНК, а также с поправкой на вводимое количество кДНК и средний процент восстановления из двух spike-in РНК. Это число нормализовали по количеству экзосом/EV, которые были выделены для каждого образца. B) Установка Случайный 20N до 1 демонстрирует кратность обогащения от 15 до 400 относительных копий РНК на EV для самых эффективных ЭКЗО-кодов. C) Установка панели количественных эндогенных микроРНК из одних и тех же образцах до 1 демонстрирует заметное увеличение активности РНК с использованием технологии ЭКЗО-кодов.

ЭКЗО-коды от 1E5 в 3E6 раз больше распространены в экзосомах/EV, чем эндогенных РНК.

[77] Фигура 10 А показывает анализы соосаждения РНК с использованием двух топ-последовательностей, идентифицированных в раунде 10 для MDA-MB-231 клеток. Дорожка 4 & 5: UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO: 59), Дорожка 6 & 7: GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO: 60). Белки, показанные стрелкой на дорожках 4-7, идентифицированы как hnRNPM. Фигура 10 В: показывает как контрольную РНК, так и РНК М8 ЭКЗО-кода, связанную с NONO (Не содержащий POU домен октамер-связывающий белок) и SFPQ (фактор сплайсинга, пролин- и глутамин-обогащенный) РНК-связывающими белками. Однако, М8 ЭКЗО-код связан с hnRNPM намного больше, чем контрольная РНК в анализе соосаждения (показано стрелкой). На Фигуре 10 С, в анализе соосаждения для наиболее обогащенного ЭКЗО-кода в RAW клетках (R2) биотинилированная РНК связывается с многочисленными белками больше, чем контрольная РНК. С помощью масс-спектрометрии определили, что наиболее дифференцированно связанными белками были мышиные ASCC3, DOCK2, ddx17, ddx5, hnRNPF и hnRNPH1/H2.

[78] Анализ соосаждения РНК на Фигуре 10 показывает две полосы между 70 и 100 кДа (показаны стрелками), присутствующие для двух топ-последовательностей, идентифицированных в раунде 10 для MDA клеток (дорожки 4-7), которые не присутствуют в соосаждении скремблированной контрольной последовательности (дорожки 8 и 9). Две полосы вырезали из дорожек 6 и 7 и вместе с соответствующей контрольной областью в дорожках 8 и 9 анализировали с помощью масс-спектроскопического анализа. Обе полосы идентифицированы как гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин М (hnRNP M), с прогнозированной массой в 72/74 кДа. Дорожки 4, 6 и 8 загружали в лунки вместе с магнитными шариками стрептавидина, в то время как дорожки 5, 7 и 9 загружали с оставшимся лизатом того же самого соосаждения без магнитных шариков стрептавидина. На Фигуре 10 В и С приведены результаты соосаждения, выполненного с последовательностью MDA №8 из раунда 10 и последовательностью №2 в раунде 10 в RAW 264.7 клетках. Для получения результатов на Фигуре 10, биотинилированные последовательности РНК были модифицированы 3'-биотином. 20 мкг РНК инкубировали в течение 1 ч с предварительно очищенным клеточным лизатом MDA клеток (1 мл 1 мг/мл клеточного лизата из $3x10^7$ клеток). Связанные белки затем захватывали с помощью магнитных шариков стрептавидина Promega (45 мин инкубации) и несвязанные белки удаляли 5

промывками. Все стадии проводили при 4°C с использованием буферов, обработанных протеазой и РНКазой. hnRNP M, как известно, присутствует в экзосомах из MDA-клеток из предыдущих исследований, и, как было показано, играет важную роль в метастатическом фенотипе MDA-MB-231 клеток. Также было показано, что hnRNP M необходим для того, чтобы клетки рака молочной железы эффективно метастазировали в легкие *in vivo* (Xu Y et. Genes Dev. 2014 Jun 1;28(11):1191-203).

[79] Могут быть использованы анализы соосаждения и масс-спектрометрии. Магнитные шарики стрептавидина, покрытые: (a) биотинилированными ЭКЗО-кодами или (b) биотинилированными поли(A) РНК-последовательностями, в качестве отрицательного контроля, инкубировали с клеточными и экзосомальными экстрактами из MDA-MB-231, RAW 264.7 клеток и других типов клеток. Белки, которые связываются с ЭКЗО-кодами, анализируют с использованием протеомного подхода на основе высокочувствительной и всесторонней жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). 3'-биотинилированные ЭКЗО-коды нагревают до 65°C и затем охлаждают до 4°C в течение 30 мин для обеспечения надлежащего фолдинга. Затем 3'-биотинилированную РНК добавляют в экзосомальный лизат или клеточный лизат и инкубируют в течение 1 ч при 4°C с вращением. Блокированные казеином магнитные шарики стрептавидина добавляют к смеси и инкубируют в течение 30 мин. Шарики промывают с помощью магнитной сепарации. Шарики повторно суспендируют в воде после окончательной промывки и подготавливают в LDS-восстановительном буфере перед запуском на Nupage 4-12% Бис/Трим гели. Гели окрашивают красителями Coomassie (BioRad) или SilverQuest (Invitrogen), если это необходимо. Белковые полосы, уникальные для РНК ЭКЗО-кодов, но не обнаруженные на контрольной РНК, вырезали и анализировали с помощью масс-спектрометрии на Q Exactive plus. Данные анализируют на Proteome Discoverer 1.4 с помощью поисковой системы Mascot SwissProt FASTA человеческой базы данных. Трипсин используют в качестве фермента, при этом допускается 1 пропущенное расщепление. Окисленный метионин будет установлен в качестве переменной модификации, в то время как карбамидометил будет установлен в качестве статической модификации.

[80] Минимальные требования к последовательности и аффинности связывания. *In silico* докинг-информационные точечные мутации вводят в идентифицированные последовательности ЭКЗО-кодов, чтобы выяснить минимальные требования к последовательности. Используя докинг-инструментарий Surflex на

платформе SYBYL мы смогли ранжировать по порядку РНК-последовательности и их мутации в соответствии с их аффинностями связывания с HNRNP L. Этот подход может быть распространен на любые дополнительные ЭКЗО-коды, обнаруженные или описанные в данной заявке, а также *de novo* ЭКЗО-кодсвязывающие белки-мишени, идентифицированные в экспериментах соосаждения с масс-спектрометрией.

[81] Взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. Идентифицированные белки подвергали сверхэкспрессиии и очищали из *E.coli* и выполняли анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием очищенных белков, наших новых ЭКЗО-кодов, а также контрольной поли (А) РНК-последовательности. Эксперименты проводили с использованием радиоактивно меченных субстратов РНК. ^{32}P-радиоактивно меченные Т7-транскрибированные субстраты РНК инкубируют с возрастающими концентрациями идентифицированного белка, а затем разделяют на 4,5% нативном полиакриламидном геле. Гель визуализировали с помощью Phosphorimager SI (Amersham). Связанная с белками РНК будет мигрировать медленнее, чем свободная РНК.

[82] Поверхностный плазмонный резонанс может быть использован для определения аффинности связывания ЭКЗО-кодов и их мутаций с идентифицированными белками. Анализ связывания выполняется с помощью прибора Reichert SR7000 DC SPR. Идентифицированные белки иммобилизованы на поверхности карбоксиметилдекстрановых гидрогелевых золотых чипов с использованием стандартной химии связывания амина. Образцы, содержащие последовательности РНК, пропускают над чипом, чтобы определить аффинность связывания. Регенерацию золотого чипа проводят с использованием 10 мМ раствора глицина с pH 2 для удаления связанных аналитов. Данные по аффинности связывания коррелируют с прогнозами *in silico*, а также с эффективностью сортировки и кинетиками ЭКЗО-кодов.

[83] Исследования потери функции: сайленсинг и сверхэкспрессия идентифицированных белков. Исследования потери функции могут проводить для оценки влияния соответствующих белков на сортировку ЭКЗО-кодов путем сайленсинга генов и сверхэкспрессиии идентифицированных кандидатов в MDA-MB-231, PC-3, Raw 264.7, HEK293 и мезенхимальных стволовых клетках. Сайленсинг и сверхэкспрессия белков может быть подтверждена с помощью ПЦР-РВ (на уровне мРНК) и вестерн-блоттинга (на уровне белка) клеточных и экзосомальных образцов. Обогащение РНК в экзосомах контролируют с помощью ПЦР-РВ.

[84] На Фигуре 11 A) MDA-MB-231 клетки были обработаны контрольной миРНК (смысловая последовательность: UCACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGGA (SEQ ID NO: 61)) или двумя hnRNPM миРНК (смысловая последовательность 1: GCAUAGGAUUUGGAAUAAA (SEQ ID NO: 62)) смысловая последовательность 2: GGAAUGGAAGGCAUAGGAUUU (SEQ ID NO: 63)) при 30 пмоль общей миРНК в 12-луночном планшете с использованием RNAiMAX. A) Три лунки из каждого условия собирали через 48 часов после трансфекции и вестерн-блоттинг проводили для оценки hnRNPM нокдауна (Origene TA301557). B) Процент нокдауна, нормированный к GAPDH оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ. В течение 48 часов после обработки миРНК, дополнительные 3 лунки из каждого условия подвергали электропорации с 1 мкг ЭКЗО-кода M1 РНК или M8. Через 24 часа после электропорации экзосомы/EV собирали и экстрагировали РНК. Относительную M1 и M8 представленность определяли с помощью кПЦР. Клетки, в которых истощено около 75% hnRNPM, показали уменьшение примерно на 60% при нагрузке M8 ЭКЗО-кодом и уменьшение примерно на 90% при загрузке M1 ЭКЗО-кодом в экзосомах/EV. hnRNPM нокдаун не влияет на сортировку случайной контрольной последовательности (RC).

[85] Изобретение включает в себя оценку способности ЭКЗО-кодов доставлять терапевтический груз в экзосомы. Мы идентифицировали ЭКЗО-коды, которые обогащены в экзосомах. Эти ЭКЗО-коды, как ожидается, будут использоваться для доставки терапевтического груза для перепрограммирования патологических экзосом и оказания фенотипического эффекта. Могут быть определены соотношения размер РНК-эффективность и соотношения размер РНК-кинетика. Способность ЭКЗО-кодов к перепрограммированию экзосом, происходящих из опухоли, может быть оценена в анализе миграции и инвазии.

[86] В одном неограничивающем иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения мы прикрепили pre-miR-31 к ЭКЗО-коду, идентифицированному, как описано выше, для перепрограммирования экзосом, происходящих из MDA-MB-231 клеток. miR-31, анти-метастатическая микроРНК действует как супрессор опухоли и ингибирует пролиферацию, миграцию и метастазирование раковых клеток.

[87] Фигура 12 (A) представляет собой схематическое изображение ЭКЗО-код/pre-miR-31 химеры. (12B) Экзосомы перепрограммированные химеризированным ЭКЗО-код/pre-miR-31 ингибируют миграцию клеток на 75%. В противоположность этому, экзосомы, происходящие из клеток, обработанных NS-Ctrl/pre-miR-31 химерой

показали ингибирование миграции MDA-MB-231 клеток только 31%. По сравнению с pre-miR-31 только контрольное ингибирование не было статистически значимым. (12C) Типовые изображения анализа методом зарастания царапин показывают полное закрытие зазора, когда клетки инкубировали экзосомами, происходящими из клеток, обработанных NS-Ctrl/pre-miR-31 и контрольной pre-miR-31. Через 24 часа, существенный зазор может быть еще виден с MDA-MB-231 клетками, обработанными экзосомами, перепрограммированными ЭКЗО-кодом/pre-miR-31. Масштабная метка: 200 мкм. Данные представляют собой среднее ± sd. **P<0,01, *P<0,05 с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием теста Тьюки.

[88] Для экзосомального перепрограммирования, MDA-MB-231 клетки подвергали электропорации с ЭКЗО-код/pre-miR-31 химерой, только pre-miR-31 и неспецифической Ctrl/pre-miR-31 химерой и культивировали в обедненной экзосомами среде в течение 48 часов. Для получения ЭКЗО-код/pre-miR-31 химеры, как показано на Фигуре 9A, ЭКЗО-код синтезируют с областью линкера, что приводит к следующей последовательности: 5'*GUACAUUCUAGAUAGCC*augau-**UGUGUGUCCCCACAGCACUG**uug-3' (SEQ ID NO:64). Эту область линкера гибридизировали с комплементарным линкером, прикрепленным к pre-miR-31: 5'*GGCUAUCUAGAAUGUAC*aaAGGCAAGAGCUGGCAUAGCUGUUGAACUGGGAACUGCUAUGCCA-ACAUA-UUGCCAU-3' (SEQ ID NO:65). Выделение *курсивом* указывает на комплементарные линкерные участки, выделение *жирным шрифтом* указывает на ЭКЗО-код, а зрелые miR-31 выделены подчеркиванием. Среду собирали и экзосомы осаждали с помощью Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen). Экзосомы ресуспендировали в PBS и вводили в MDA-MB-231 клетки, высеянные для *in vitro* анализа зарастания царапины, хорошо известного метода оценки клеточной миграции и клеточной инвазии [64]. Вкратце, для получения бесклеточного зазора центры лунок царапали с использованием кончика пипетки. Закрытие зазора было использовано в качестве маркеров клеточной миграции. Перепрограммированные экзосомы, происходящие из клеток, обработанных ЭКЗО-код/pre-miR-31, ингибировали миграцию клеток на 75% (Фигура 9 B и C). В противоположность этому, экзосомы, происходящие из клеток, обработанных NS-Ctrl/pre-miR-31 химерой, показали ингибирование миграции MDA-MB-231 клеток только 31%.

[89] **Доставка груза различных размеров и определение экзосомальной нагрузочной способности.** Для оптимизации загрузки груза, оценивается способность

ЭКЗО-кодов загружать груз различных размеров. Загрузку микроРНК, миРНК, ДНК и больших нуклеиновых кислот (таких как мРНК или плазмидная ДНК) в экзосомы контролируют с помощью ПЦР-РВ. Может быть определена взаимосвязь между размером РНК и эффективностью загрузки и размером РНК и кинетиками загрузки. В литературе широко распространены пассивные стратегии, которые стабильно трансфицируют клетки миРНК или микроРНК для непрямой загрузки экзосом,. Однако, эти методы крайне неэффективны, требуют больших количеств РНК и непригодны для прямого перепрограммирования *in vivo*, с загрузкой больших нуклеиновых кислот, таких как мРНК и пДНК, что особенно сложно с использованием обычных методов (эффективность загрузки около 0,3%). Считают, что РНК загружаются в экзосомы с помощью последовательность-специфической сортировки. Путем присоединения ЭКЗО-кодов к мРНК, изобретение имитирует стратегию эндогенной сортировки для эффективной загрузки мРНК в экзосомы. Зеленый флуоресцентный белок (GFP), может быть использован в качестве модельного белка для доставки мРНК. микроРНК/миРНК и мРНК, прикрепленные к ЭКЗО-кодам, доставляются в MDA-MB-231, мезенхимальные стволовые клетки и другие клетки с помощью (a) электропорации и (b) липосомальной трансфекции с использованием наших липидов, полимеров или пептидов. Количество микроРНК/миРНК и мРНК, отсортированных в экзосомы, может быть определено количественно с помощью ПЦР-РВ «петля-на-стебле» (для микроРНК/миРНК) и ПЦР-РВ для мРНК.

[90] Загрузка груза, способного опосредовать регенерацию тканей, в экзосомы. На Фигуре 13, показана загрузка микроРНК в экзосомы, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток человека (MSC). ЭКЗО-код-MSC6 опосредовал значительно более высокое обогащение MIR-132 в экзосомах, чем при электропорации только miR-132 в MSC человека. Для проверки влияния загруженных экзосом на ангиогенез эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) обрабатывали экзосомами, происходящими из клеток, подвергнутых электропорации только miR-132 или ЭКЗО-код-MSC6/miR-132 химерой, а затем высевали на 96-лунковый планшет, покрытый Geltrex. Через 17 часов клетки окрашивали кальцеином и визуализировали в em/ex 495/515 с помощью SpectraMax MiniMax 300 Imaging Cytometer. Экзосомы, содержащие ЭКЗО-код-MSC6-miR-132, опосредовали значительно более высокие эффекты на ангиогенез, чем немодифицированные экзосомы или экзосомы, происходящие из MSC, подвергнутых электропорации только miR-132. Анализ ангиогенеза часто используется в качестве суррогатного анализа для оценки

образования новых кровеносных сосудов, что имеет отношение к процессам, связанным с заживлением ран и регенерацией тканей.

[91] Фигура 13 показывает данные, полученные из загрузки микроРНК в экзосомы мезенхимальных стволовых клеток человека, и влияние на ангиогенез. Фигура 13: (A) ЭКЗО-код S6, последовательность №6 из стволовых клеток после 7 раундов отбора добавляли к комплементарной последовательности miR-132, разнесенных друг от друга линкером «A», с образованием верхней нити РНК: GCUGGUCAGGAUGCGGGGGCAAAGUAACAAUCGAAAGCCACGGUUUU (SEQ ID NO: 66); эту РНК затем дуплицировали к синтетической miR-132: AACCGUGGCUUUCGAUUGUUACUU (SEQ ID NO: 67). (B) Мезенхимальные стволовые клетки подвергали электропорации в трех экземплярах с равными молярными количествами синтетических miR-132 в одиночку или miR-132, прикрепленной к S6 ЭКЗО-коду. Экзосомы собирали и количественно определяли для miR-132, электропоррированная miR-132 повышала количество этой микроРНК в экзосомах мезенхимальных стволовых клеток в 10 раз. Используя ЭКЗО-код S6, достигается дополнительное 6-кратное увеличение экзосомального содержания - увеличение эффективности miR-132 в MSC экзосомах в 60 раз. (C) Анализ ангиогенеза на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVECs). HUVEC обрабатывали экзосомами, собранными из мезенхимальных стволовых клеток человека, подвергнутых электропорации ЭКЗО-код-MSC6/miR-132 или немодифицированной miR-132. Во всех показанных параметрах экзосомы, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток, обработанных ЭКЗО-код-MSC6/miR-132, показали статистически значимое увеличение числа узлов, количества переходов, общей длины, общей длины ответвлений и количества ответвлений. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием теста Тьюки (N = 3), ****p <0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,5.

[92] Может быть оценено влияние мультивалентности на кинетики и эффективность экзосомальной сортировки. ЭКЗО-коды могут быть прикреплены к грузу (микроРНК и мРНК) в разных валентностях (n = 1-3). В связи с этим, на Фигуре 14 представлена схема, демонстрирующая оценку возможностей ЭКЗО-кодов доставлять груз различных размеров в экзосомы. Содержащие микроРНК/миРНК и мРНК мультивалентные ЭКЗО-коды могут быть доставлены в MDA-MB-231, PC-3 и другие клетки с помощью (a) электропорации и (b) липосомальной, полимерной и пептидной трансфекции, а также с помощью других подходящих способов. Количество

микроРНК/миРНК и мРНК, отсортированное в экзосомы, может быть количественно определено с помощью ПЦР-РВ «петля-на-стебле» (для микроРНК/миРНК) и ПЦР-РВ для мРНК.

[93] **Доставка миРНК/микроРНК, подавляющих метастазирование**. В некоторых вариантах осуществления SnaiI и Slug нацелены на перепрограммирование патологических, инициирующих метастазирование экзосом. SnaiI и Slug играют важную роль в росте опухоли и индукции отдаленных метастазов в различных типах рака. Они принадлежат к семейству факторов транскрипции с доменами типа «цинковые пальцы», которые участвуют в «эпителиально-мезенхимальном переходе» (ЭМТ) раковых клеток. ЭМТ, который играет важную роль в метастазировании опухолей, представляет собой механизм, с помощью которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, который обладает расширенной миграционной способностью и является значительно более инвазивным. Было показано, что сайленсинг Snail и Slug значительно уменьшает рост опухоли и метастазирование лимфатических узлов рака молочной железы и клеток рака простаты. Изобретение включает доставку химеризированных ЭКЗО-кодов/миРНК против SnailI и Slug в качестве мишеней для экзосомального перепрограммирования в раковых клетках. Для получения химеризированных конструкций ЭКЗО-код/миРНК смысловую нить ковалентно связывали с ЭКЗО-кодом, а антисмысловую нить гибридизировали со смысловой нитью. Будут использоваться следующие последовательности миРНК: Snail: 5-CCACAGAAAUGGCCAUGGGAAGGCCUC-3 (SEQ ID NO: 68), Slug: 5-UCCGAAUAUGCAUCUUCAGGGCGCCCA-3 (SEQ ID NO: 69), отрицательный контроль. 5- UCACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGGA-3 (SEQ ID NO: 70).

[94] **Миграциионный анализ с использованием *in vitro* анализ методом зарастания царапин.** ЭКЗО-коды могут быть химеризированы с антиметастатическими микроРНК (miR-31). Анти-Snail и анти-Slug миРНК, как известно, действуют как ингибиторы клеточной миграции, инвазии и метастазирования. Ожидается, что эти ЭКЗО-коды/микроРНК и ЭКЗО-коды/миРНК будут доставлены в опухолевые клетки для экзосомального перепрограммирования. Способность у перепрограммированных экзосом ингибировать клеточную миграцию может быть проанализирована с помощью анализа методом зарастания царапин (Фигура 12). Миграция MDA-MB-231, PC-3 клеток и других раковых клеток, получающих перепрограммированные экзосомы, будет контролироваться с помощью микроскопа через 24 ч и 48 ч после инкубации. Площадь царапины и количество

клеток, которые мигрировали в область царапины, будут количественно определены с помощью программного обеспечения ImageJ. Эффект перепрограммированных экзосом на клеточную миграции может быть подтвержден с помощью ПЦР-РВ соответствующей мРНК, чтобы исключить неспецифические ингибирующие механизмы.

[95] **Анализ на инвазивность.** Для оценки инвазивности MDA-MB-231 клеток, PC-3 клеток и других раковых клеток, обработанных перепрограммированными экзосомами может быть использована анализ с камерой Бойдена, покрытой модифицированным матригелем. Клетки высевают на апикальный участок трансвел и обрабатывают перепрограммированными экзосомами. Через 24 и 48 ч подсчитывают количество клеток, мигрирующих в базолатеральном направлении. Будет подсчитано 10 полей на мембрану с минимальным числом в 10 клеток.

[96] **Взаимосвязь доза-ответ.** Для того, чтобы установить взаимосвязь доза-ответ, клетки можно обрабатывать возрастающими концентрациями перепрограммированных экзосом и определять влияние на клеточную миграцию и инвазию. Кроме того, может быть определено поглощение клетками перепрограммированных экзосом в MDA-MB-231 клетках, PC-3 клетках, HEK 293 клетках, мезенхимальных стволовых клетках, Raw клетках, кардиомиоцитах, эндотелиальных клетках и других типах клеток. Экзосомы могут быть флуоресцентно помечены PKH26 мембранным красителем (Sigma Aldrich). Количество экзосом, поглощенное клетками, будет количественно определено с помощью проточной цитометрии.

[97] Для генерирования химически модифицированной РНК для повышения стабильности ЭКЗО-кодов, матрицы ДНК были переведены в РНК с использованием метил-CTP и псевдо-UTP в реакции *in vitro*. В двух примерах (Фигура 15), химически модифицированные ЭКЗО-коды показали значительно возросшее обогащение в экзосомах по сравнению со случайным контролем и/или немодифицированными ЭКЗО-кодами.

[98] Фигура 15 демонстрирует повышенную загрузку SNAIL миРНК в стволовые клетки и MDA клетки с использованием модифицированных нуклеотидов. В частности, ЭКЗО-код S6, случайный контроль, химически модифицированные ЭКЗО-коды mod-S6, ЭКЗО-код M1, химически модифицированный ЭКЗО-код mod-M1 с модифицированными нуклеотидами (метилцитидин и псевдоуридин для придания повышенной стабильности) были синтезированы в 5’-направлении антисмысловой

последовательности SNAIL миРНК, отделенные друг от друга 3-аденозиновым линкером. Смысловую нить SNAIL миРНК затем конъюгировали с помощью спаривания оснований, и эти конструкции подвергали электропорации в клетки MDA-MB-231 и мезенхимальные стволовые клетки (n=3-4). Через 24 часа экзосомы собирали и РНК экстрагировали в соответствии с протоколом miRNeasy (Qiagen). кДНК генерировали с использованием набора для синтеза кДНК mirScript и проводили кПЦР с использованием SYBR low ROX (Quanta) против смысловой нити SNAIL. Данные представлены в виде кратного улучшения загрузки по сравнению со случайным контролем методом дельта Ct + стандартная средняя ошибка. Кратное улучшение загрузки оценивали по статистической значимости с использованием анализа ANOVA с апостериорным критерием теста Тьюки (*=p<0,05, **=p<0,001, ***=p<0,0001). В MDA-MB-231 клетках химически модифицированные ЭКЗО-коды mod-M1 показали ~118-кратное улучшение по сравнению со случайным контролем, а немодифицированный ЭКЗО-код M1 показал ~8-кратное улучшение по сравнению со случайным контролем. В MSC химически модифицированный ЭКЗО-код mod-S6 показал ~21-кратное улучшение по сравнению со случайным контролем, а немодифицированный ЭКЗО-код S6 показал ~9-кратное улучшение по сравнению со случайным контролем.

[99] На Фигуре 12, донорские MDA клетки подвергали электропорации ЭКЗО-код-пре-микроРНК химерами (n=3), ЭКЗО-кодом и только пре-микроРНК в качестве контролей (n=3, n=2), а также контролем роста без РНК (n=5). Экзосомы из этих клеток затем высевали на MDA клетки реципиента, которые были поцарапаны, в 96-луночном планшете со стеклянным дном. Закрытие раны от 6 до 10 ч перед посевом поцарапанных клеток с экзосомами было нормализовано для контроля роста без РНК. Площадь раны была получена с помощью запрограммированного микроскопа Zeiss и количественно определена с помощью программного обеспечения Axiovision. Сравнивая обработанные группы с помощью анализа ANOVA с апостериорным критерием теста Тьюки, нацеленная miR-31 с обогащенной последовательностью (E-31) лучше, чем нецелевая miR-31 в альфа 0,01, p-значение miR-31 только по сравнению с E-31 = 0,0011. Скремблированный контроль (S-31) статистически отличается от E-31 и «только miR-31» при альфа 0,05, p=0,0308 и 0,0352 соответственно. Не обнаружено статистически значимых различий между контролем роста и контролем «только miR-31», а также среди обогащенных или скремблированных последовательностей аптамеров контроля с помощью анализа ANOVA с апостериорным критерием теста Тьюки. Для повышения стабильности ЭКЗО-кодов матрицы ДНК транслировали в РНК

с использованием метил-CTP и псевдо-UTP в реакции *in vitro*.

[100] Репрезентативные и неограничивающие последовательности ЭКЗО-кодов, которые могут быть использованы отдельно или в любой комбинации в вариантах осуществления настоящего изобретения, и связанная с ними информация приведены на Фигуре 16, которая предоставляет мотивы и анализ использованных последовательностей. В частности, Фигура 16: показывает в A): Представление 1000 топ последовательностей из последнего раунда отбора по алгоритму мотива MEME продемонстрировало статистически значимые мотивы (показаны минимальные E-значения мотивов). Наиболее значимые мотивы из RAW и MSC клеток показывают высокое сходство. 16B) Менее статистически значимые мотивы из PC-3 и RAW клеток показывают высокое сходство.

[101] **Таблица 2: Общие Последовательности в топ 10 после заключительного раунда отбора**

Общие последовательности в топ 10 испытанных ЭКЗО-кодах		
1	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:71)	RAW #4 | MSC #9
2	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:72)	RAW#6 | MSC #8
3	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:73)	HEK#4 | RAW#8
4	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:74)	MSC#1 | RAW#2
5	GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO:75)	MDA#2 | MSC#5
6	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:76)	MDA#1 | MSC#3

Таблица 2: в топ десятке последовательностей ЭКЗО-кодов, которые были протестированы, 6 присутствовали в двух клеточных линиях. 1) ЭКЗО-код RAW#4 и MSC#9, ЭКЗО-код RAW#6 и MSC#8, 3) ЭКЗО-код HEK#4 и RAW#8, 4) ЭКЗО-код MSC#1 и RAW#2, 5) ЭКЗО-код MSC#2 и MSC#5, 6) ЭКЗО-код MSC#1 и MSC#3.

[102] **Фигура 17: Характеристика экзосома/EV.** В частности, Фигура 17 показывает: исследование характеристик экзосома/EV A) Анализом отслеживания наночастицы (NTA) из популяции экзосома/EV. B) Трансмиссионной электронной микроскопией (TEM). NTA и TEM показывают, что большинство экзосом/EV попадают в ожидаемый диапазон размеров 30-150 нм. C) Подсчет частиц NTA также коррелирует с содержанием белка в качестве вторичных средств подсчета везикул.

[103] Репрезентативные и неограничивающие последовательности экзосом, предусмотренные настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются

следующими:

RAW, Раунд 5, ТОП 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	GAAUGAUCUUGGUUGUCAAC (SEQ ID NO:77)	285
2	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:78)	211
3	AGCGAGGUGGAGUGGCGUGG (SEQ ID NO:79)	151
4	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:80)	142
5	GCGCGGGAAGGGUGGCAUGG (SEQ ID NO:81)	130
6	GAUGGUAUGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:82)	129
7	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:83)	106
8	GAUGGUAAGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:84)	98
9	CAGUAUUAGCAAGGGAGGGG (SEQ ID NO:85	94
10	GAGGGGGAGGAGGGCAUGCC (SEQ ID NO:86)	80

RAW, Раунд 7, TOP 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:87)	3213
2	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:88)	2212
3	GAUGGUAAGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:89)	1932
4	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:90)	1820
5	GAUGGUAUGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:91)	1510
6	GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC (SEQ ID NO:92)	1043
7	CAACCUAGGUGCGGGGCGGG (SEQ ID NO:93)	970
8	GGAAGAUCAAGGUGCGGGGC (SEQ ID NO:94)	916
9	GGUUCAGGGUGUGGGCCGCC (SEQ ID NO:95)	914
10	GCGCGGGAAGGGUGGCAUGG (SEQ ID NO:96)	831

RAW, Раунд 10, TOP 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	GAUGGUAAGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:97)	1645
2	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:98)	1526
3	GAUGGUAUGUUGGAAAGCGA (SEQ ID NO:99)	1139
4	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:100)	1138
5	UUCGUGUAUCUAGUGCAGUC (SEQ ID NO:101)	965
6	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:102)	877
7	UUUCGUGUAUCCUAGUUGCU (SEQ ID NO:103)	609
8	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:104)	454
9	UUCGUGUUCUGGUUGAGUGU (SEQ ID NO:105)	406
10	GCGCGGGAAGGGUGGCAUGG (SEQ ID NO:106)	350

MDA-MB-231 клетки, Раунд 5, TOP 10 Последовательностей

Раунд 5

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	GAGUCUUUCCGUCUUGCGUG (SEQ ID NO:107)	142
2	AGCGAGUACGCUGCGAUUGC (SEQ ID NO:108)	126
3	GCGAUGUAUGGUUUUCGGUG (SEQ ID NO:109)	104
4	CCAGAGGUGAUGGCGGUCGC (SEQ ID NO:110)	103
5	GGCGAUCGGAAGGCAUGCAC (SEQ ID NO:111)	97
6	CACUCGAGAUGCCGCGUAGG (SEQ ID NO:112)	94
7	CACGCAGGCGAGGUGGCAGC (SEQ ID NO:113)	93
8	CCUUUGUGUCUGCAGGCUCU (SEQ ID NO:114)	88
9	CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG (SEQ ID NO:115)	88
10	CAUCUGCUCUCGGGGGCACA (SEQ ID NO:116)	80

MDA-MB-231 клетки, Раунд 7, TOP 10 Последовательностей

РАНГ	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ**
1	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:117)	436
2	CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG (SEQ ID NO:118)	417
3	GUGGUCGAUAAGCGUACGCG (SEQ ID NO:119)	265
4	UGCGACGUCGUUAGUGGUAC (SEQ ID NO:120)	238
5	GGCCUUGGUCGCGUGCUGGC (SEQ ID NO:121)	224
6	CCAGAGGUGAUGGCGGUCGC (SEQ ID NO:122)	210
7	CCGCGUGGUUUGUGCGGGUG (SEQ ID NO:123)	185
8	CCAGAACUUGUGGUACCUGC (SEQ ID NO:124)	167
9	GCGAUGUAUGGUUUUCGGUG (SEQ ID NO:125)	162
10	CAUCUGCUCUCGGGGGCACA (SEQ ID NO:126)	143

MDA-MB-231 клетки, Раунд 10, TOP 10 Последовательностей

РАНГ	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ**
1	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:127)	806
2	GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO:128)	644
3	CCCGCUUCUUCCUCGGGUGG (SEQ ID NO:129)	506
4	GUCACUCGGCCUAGUGCGUC (SEQ ID NO:130)	406
5	CCUGACCUUACUCGGGUGGC (SEQ ID NO:131)	309
6	GUGGUCGAUAAGCGUACGCG (SEQ ID NO:132)	239
7	AGGGCGUUUGCUCGCGGGUC (SEQ ID NO:133)	235
8	CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG (SEQ ID NO:134)	225
9	CAGACGGUACUCAGGUGUGC (SEQ ID NO:135)	218
10	GGCCUUGGUCGCGUGCUGGC (SEQ ID NO:136)	216

PC-3 клетки, Раунд 5, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	GUCGGUGAACGACUGGUGGC (SEQ ID NO:137)	13
2	GGUUAAUUUUAUGUGUCAAC (SEQ ID NO:138)	10
3	GGGCUUUCGGCAGGCGGUCG (SEQ ID NO:139)	7
4	GUGGAUGUAGGGGGACGGGC (SEQ ID NO:140)	6
5	UGCGAUGUUGUGAGUGGCCC (SEQ ID NO:141)	6
6	GCAUAUGGGCGCUUGUGUGG (SEQ ID NO:142)	5
7	GGGUGCGGAAGUCAGUGUGG (SEQ ID NO:143)	5
8	GAGCUGCAUGUGGCGUUGGG (SEQ ID NO:144)	5
9	GUGGUAAGGUUGGAAGGUGU (SEQ ID NO:145)	4
10	GGGCCUUGAUCACGUGGUGC (SEQ ID NO:146)	4

PC-3 клетки, Раунд 7, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	GAGGCCUGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:147)	29
2	UGGUAGGUUGGAAGGUCGGG (SEQ ID NO:148)	23
3	CGUGGUAUGGUUGGAACGGU (SEQ ID NO:149)	22
4	AAGGGUAAGUUGGAAAGUCG (SEQ ID NO:150)	18
5	GUGGUAGGUUGGAAGGCCGG (SEQ ID NO:151)	15
6	GUGGUAGGUUGGAAAGGCUG (SEQ ID NO:152)	15
7	GGUGGUAUGUUGGAAGGUUG (SEQ ID NO:153)	15
8	UGCGAUGUUGUGAGUGGCCC (SEQ ID NO:154)	14
9	AGUGGUAAGUUGGAAUGCAC (SEQ ID NO:155)	12
10	GGGCCUUGAUCACGUGGUGC (SEQ ID NO:156)	10

PC-3 клетки, Раунд 10, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	AAGGCCGGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:157)	601
2	GUGGUAGGUUGGAUCGUCGG (SEQ ID NO:158)	248
3	UGUGGUAUCGUUGGAAAGCG (SEQ ID NO:159)	202
4	GGUGGUAGGUUGGAACGGCG (SEQ ID NO:160)	198
5	AGGUAUGGGCGCUUCGUGGC (SEQ ID NO:161)	189
6	GUCGUGGUAUGUUGGAGGGC (SEQ ID NO:162)	129
7	GGGGUAUUGUUGGAACGGCG (SEQ ID NO:163)	119
8	CGGGUAUAGUUGGAACGUCG (SEQ ID NO:164)	117
9	GUGGUAGGUUGGAAAGGCUG (SEQ ID NO:165)	115
10	GUGGUAUGGUUGGAACGCAG (SEQ ID NO:166)	113

Мезенхимальные стволовые клетки, Раунд 5, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:167)	3577
2	GGUUCAGGGUGUGGGCCGCC (SEQ ID NO:168)	2510
3	GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC (SEQ ID NO:169)	1835
4	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:170)	1806
5	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:171)	1662
6	CUAGCGACGGUGCGGGGGUG (SEQ ID NO:172)	860
7	UGGGGAUAAGUAUGUUGCGG (SEQ ID NO:173)	790
8	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:174)	773
9	UGCGAUGUUGUGAGUGGCCC (SEQ ID NO:175)	699
10	GCGCGGGAAGGGUGGCAUGG (SEQ ID NO:176)	688

Мезенхимальные стволовые клетки, Раунд 7, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	UGGAACGUCGAUGUGGGCCG (SEQ ID NO:177)	10617
2	GGUUCAGGGUGUGGGCCGCC (SEQ ID NO:178)	8276
3	UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG (SEQ ID NO:179)	7463
4	AAGGCCGGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:180)	5257
5	GCGAUAGGCGGUCGUUGGUC (SEQ ID NO:181)	4499
6	GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC (SEQ ID NO:182)	4458
7	GCUGCGAAGUGGGGCAGGUC (SEQ ID NO:183)	3919
8	GGUCGAGUGAUGCGGGGCGC (SEQ ID NO:184)	3480
9	CGUGGCUGGUUCGUGCGGGG (SEQ ID NO:185)	3367
10	GGGCGAAAUUGGCAUGGCCG (SEQ ID NO:186)	3197

HEK, Раунд 5, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	AAGGCCGGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:187)	4818
2	UGAUGUAUUGGUAAGUUUCG (SEQ ID NO:188)	4816
3	UAUAGAUGUGCUAGUUUGCA (SEQ ID NO:189)	2566
4	UUAGCGUUGUAUUAGUUGCA (SEQ ID NO:190)	1788
5	AUCGAUGUAUGAGUCAUAUA (SEQ ID NO:191)	1612
6	AAUUACACUGUGCUAGGAUG (SEQ ID NO:192)	1447
7	UUGAAGUGUACAUUGUCGUA (SEQ ID NO:193)	1292
8	UGAUGUGUUAGUUUGAAUGU (SEQ ID NO:194)	1254
9	UGAAAUGAGACUGGUUUUGC (SEQ ID NO:195)	1210
10	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:196)	1082

HEK, Раунд 7, Top 10 Последовательностей

РАНГ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ЧИСЛО СЧИТЫВАНИЙ
1	UGAUGUAUUGGUAAGUUUCG (SEQ ID NO:197)	17993
2	UAUAGAUGUGCUAGUUUGCA (SEQ ID NO:198)	5712
3	UUUCGUGUUUAGCGUUUGAC (SEQ ID NO:199)	5298
4	UGAUGUAUUUGGUUUGCAAG (SEQ ID NO:200)	3512
5	ACGUGUAUUACUAUUGACUA (SEQ ID NO:201)	2615
6	GAGGCCUGUGCUAGUAGUGA (SEQ ID NO:202)	2461
7	UUAGCGUUGUAUUAGUUGCA (SEQ ID NO:203)	2367
8	UCAUUGUGCUGAAUUGACUA (SEQ ID NO:204)	2135
9	AAUUACACUGUGCUAGGAUG (SEQ ID NO:205)	2046
10	AUCGAUGUAUGAGUCAUAUA (SEQ ID NO:206)	1825

[104] Фигуры 18, 19 и 20 включают дополнительные и неограничивающие варианты для ЭКЗО-кодов, спрогнозированных из последовательностей, идентифицированных и проверенных с помощью метода, изложенного на Фигуре 3. В частности, для идентификации консервативных мотивов мы проанализировали последовательности после 3, 5 и 7 раундов отбора, показывая 16 стандартных отклонений от средней считанной последовательности из соответствующих раундов. Эти последовательности были собраны и проанализированы с использованием MEME программ. Критерий поиска был установлен так, чтобы включать мотивы до 12 нуклеотидов, которые могут присутствовать в любом количестве повторений в последовательности. Были 8 мотивов с высокой статистической значимостью для MDA-MB-231 клеток, 10 мотивов с высокой статистической значимостью для мезенхимальных стволовых клеток, а также 8 мотивов с высокой статистической значимостью для RAW 264.7 клеток. Мотивы, разделяющие подобные элементы последовательности, были выровнены визуально и сгруппированы; стрелки указывают аналогичные мотивы между клеточными линиями, как показано на Фигуре 18. MEME представляет мотивы в виде зависящих от положения буквенных матриц вероятности. Каждый символ/мотив последовательности состоит из стеков нуклеотидных символов, при этом один стек представляет каждую позицию в последовательности. Общая высота стека указывает на сохранение последовательности в этом положении, в то время как высота нуклеотидов внутри стека указывает на относительную частоту соответствующего нуклеотида в этом положении. Кроме того, для соответствующих мотивов приведены нуклеотидные коды IUPAC.

[105] Фигура 19 предоставляет дополнительные последовательности для MSC и MDA-MB-231 клеток. В частности, идентифицированные в подходе *in silico* мотивы и

антисмысловая нить SNAIL миРНК были синтезированы в непрерывную нить, разделенную тремя аденинами. Эти конструкции гибридизировали в Cy5-меченую смысловую нить SNAIL РНК и подвергали электропорации в 5 мкг смысловой флуоресцентной репортерной миРНК на 120000 MSC или 300000 MDA-MB-231 клеток в трех экземплярах. Клетки культивировали в среде, свободной от экзосом, в течение 24 ч и экзосомы/EV выделяли с помощью метода Total Exosome Isolation Reagent. Экзосомы/EV затем повторно суспендировали в PBS и связывали с CD63 гранулами в течение ночи при 4°C. Гранулы, связанные с экзосомами/EV, промывали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Были нанесены на схему кратные изменения средней интенсивности флуоресценции по отношению к фону. Фон был определен как случайный контроль, связанный с Cy5-меченой SNAIL, за исключением гранул, связанных с экзосомами, без Cy5-немеченной SNAIL, электропорированной в продуцирующие клетки. Некоторые из спрогнозированных *in silico* мотивов показывают значительно более высокое обогащение, чем контроль. Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Даннетта.

[106] На Фигуре 20 представлены данные, полученные с помощью M8 ЭКЗО-код mCherry (содержащий последовательность AUCUUGUGGUC (SEQ ID NO: 207)) в 3'-UTR транскрипте mCherry. M8-ЭКЗО-код mCherry (содержащий AUCUUGUGGUC последовательность в 3'-UTR транскрипте mCherry) имел в ~7 раз более высокую нагрузочную способность в экзосомах MDA-MB-231 клеток, чем контроль mCherry РНК. 500000 MDA клеток подвергали электропорации конструкциями мРНК с использованием прибора для электропорации NEON на 3 уровнях дозы в трех экземплярах: 0,1 мкг, 1 мкг и 10 мкг. Клетки промывали в среде DMEM 3 раза и высевали в DMEM + 10% обедненной экзосомами FBS. Клетки культивировали в течение 24 часов и экзосомы выделяли с помощью Total Exosome Isolation Reagent от Cell Media (ThermoFisher). Экзосомы осаждали центрифугованием при 13000 оборотах в минуту в течение 1 часа. Супернатант полностью удаляли и экзосомы повторно суспендировали в стерильном PBS (20 мкл). Образцы экзосом обрабатывали 1 мкл РНКазы A/T1 в течение 1 часа при 37°C. Образцы экзосом лизировали с помощью 500 мкл Qiazol и РНК экстрагировали в соответствии с протоколом Qiagen miRNeasy и РНК элюировали в 20 мкл воды, свободной от РНКазы. кДНК из каждого образца генерировали с использованием набора NEB Protoscript II с использованием максимального ввода 6 мкл экзосомальных РНК. mCherry количественно определяли с

помощью кПЦР с использованием мастер-микса Quanta SYBR (FP: CCTGTCCCCTCAGTTCATGT RP: CCCATGGTCTTCTTCTGCAT). M8 ЭКЗО-код mCherry (содержащий последовательность AUCUUGUGGUC (SEQ ID NO: 207)) повышал загрузку mCherry мРНК в экзосомы MDA-MB-231 клеток в ~7 раз по сравнению с немодифицированной mCherry мРНК.

ПРИМЕР 2

[107] Для оценки важности специфических нуклеотидов в потенциале сортировки идентифицированных мотивов ЭКЗО-кодов были синтезированы мутантные конструкции, содержащие отдельные мутации. В каждом случае C был мутирован в G, и наоборот, в то время как A был мутирован в U, и наоборот, за исключением общей последовательности мутанта 4, где была выбрана мутация C в A, так как в мотиве эта позиция была чаще C, G или U, чем A. Мотивы и мотив гибридов были синтезированы в 5'-направлении последовательности SNAIL миРНК, отделенные друг от друга четырьмя нуклеотидами A. Для гибридной последовательности (5'-AAGUGGCGUG-3') (SEQ ID NO: 208) мотив был непрерывным с антисмысловой последовательностью SNAIL и конъюгированный с APC-флуоресцентно-меченной смысловой нитью. Для обоих M8 (5'-AUCUUGUGGUC-3') (SEQ ID NO: 207) и S6 (5'-AUGCGGGGGC-3') (SEQ ID NO: 209) мотивов, эта ориентация была изменена таким образом, что активная антисмысловая нить была конъюгирована с флуоресцентным репортером. MDA или MSC подвергали электропорации каждой конструкцией в трех экземплярах и промывали 5 раз перед посевом. Клеточную среду собирали через 24 ч и экзосомы выделяли и повторно суспендировали в 200 мкл PBS. Общий флуоресцентный сигнал получали путем лизиса 100 мкл экзосом с 50 мкл 10% Тритона в PBS и считывали при 633/660 нм на планшетном ридере SpectraMax. Средний APC-сигнал на экзосому также был получен с использованием проточного цитометра MACsQuant, следуя параметрам производителя для анализа экзосом.

[108] Для гибридной последовательности (AAGUGGCGUG) (SEQ ID NO: 208), мотив был непрерывным с антисмысловой последовательностью SNAIL и был гибридизирован с APC-флуоресцентно-меченной смысловой нитью. Последовательности для SNAIL миРНК были следующими: APC-SNAIL (антисмысловая = GUGGCUUCGGAUGUGCAUCUU (SEQ ID NO: 210), смысловая = GAUGCACAUCCGAAGCCACUU (SEQ ID NO: 211)). Для этого эксперимента MDA-MB-231 клетки подвергали электропорации конструктами и промывали три раза, чтобы

удалить невключенную РНК. Клетки культивировали в течение 24 ч, после чего среду собирали и центрифугировали в течение 30 мин при 2000g. Супернатант среды соединяли с 0,5 объема Total Exosome Isolation Reagent от Cell Media (ThermoFisher) и выдерживали при 4°C в течение ночи. Экзосомы осаждали при 13000 оборотах в минуту в течение 1 часа. Супернатант полностью удаляли и экзосомы повторно суспендировали в стерильном PBS (200 мкл). Общий флуоресцентный сигнал получали путем лизиса 100 мкл экзосом с 50 мкл 10% Тритона в PBS и считывали при 633/660 нм на планшетном ридере Spectramax. 50 мкл каждого образца экзосом также анализировали на проточном цитометре MacsQuant в соответствии с указаниями производителя для экзосом.

[109] Как показано на изображении, каждая мутация приводила к уменьшению загрузки SNAIL миРНК в экзосомы. Снижение сортировки является существенным при $p < 0{,}001$ для HMut1 по сравнению с гибридной последовательностью, и $p < 0{,}05$ для HMut2 и HMut4 по сравнению с гибридным мотивом.

[110] Для M8 Мотива (5' AUCUUGUGGUC) (SEQ ID NO: 207), M8 Полная и соответствующая последовательности, содержащие мутации, последовательности ЭКЗО-кода были непрерывной нитью со смысловой SNAIL миРНК, соединенными через спейсер из четырех нуклеотидов A. Флуоресцентно меченную SNAIL-антисмысловую нить гибридизировали с ЭКЗО-код/SNAIL смысловой нитью РНК. Последовательности для SNAIL миРНК были следующими: APC-SNAIL (антисмысловая = GUGGCUUCGGAUGUGCAUCUU (SEQ ID NO: 210), смысловая = GAUGCACAUCCGAAGCCACUU (SEQ ID NO: 211)). Для этого эксперимента клетки MDA-MB-231 подвергали электропорации с конструкциями и промывали три раза, чтобы удалить невключенную РНК. Клетки культивировали в течение 24 ч, после чего среду собирали и центрифугировали в течение 30 мин при 2000g. Супернатант среды объединяли с 0,5 объемами Total Exosome Isolation Reagent от Cell Media (ThermoFisher) и выдерживали при 4°C в течение ночи. Экзосомы осаждали при 13000 оборотах в минуту в течение 1 часа. Супернатант полностью удаляли и экзосомы повторно суспендировали в стерильном PBS (200 мкл). Общий флуоресцентный сигнал получали путем лизиса 100 мкл экзосом с 50 мкл 10% Тритона в PBS и считывали при 633/660 нм на планшетном ридере Spectramax. 50 мкл каждого образца экзосом также анализировали на проточном цитометре MacsQuant в соответствии с указаниями производителя для экзосом.

[111] Как показано на изображении, каждая мутация приводила к уменьшению

загрузки SNAIL миРНК в экзосомы, происходящие из MDA-MB-231 клеток. Снижение сортировки является существенным при p <0,0001 для M8 мотива, Mut1, Mut2, Mut3, Mut4, Mut5, Mut6, случайной последовательности по сравнению с M8 полной последовательности; p <0,001 для Mut1, Mut2 по сравнению с мотивом M8; p <0,0001 для MUT3, Mut4, Mut5, случайной последовательности по сравнению с мотивом M8; и p <0,01 для Mut6 по сравнению с мотивом M8.

[112] Для S6 (5'-AUGCGGGGGC-3') (SEQ ID NO: 209) и соответствующих последовательностей, содержащих мутации, последовательности ЭКЗО-кодов были непрерывной нитью со смысловой SNAIL миРНК, соединенные через спейсер из четырех нуклеотидов A. Мотив S6 является укороченным мотивом последовательности MSC6: 5'-GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC-3' (SEQ ID NO: 212). Флуоресцентно меченную SNAIL-антисмысловую нить гибридизировали с ЭКЗО-код/SNAILX смысловой нитью РНК. Последовательности для SNAIL миРНК были следующими: APC-SNAIL (антисмысловая = GUGGCUUCGGAUGUGCAUCUU (SEQ ID NO: 210), смысловая = GAUGCACAUCCGAAGCCACUU (SEQ ID NO: 211)). Для этого эксперимента мезенхимальные стволовые клетки (MSC) подвергали электропорации конструкциями и промывали три раза, чтобы удалить невключенную РНК. Клетки культивировали в течение 24 ч, после чего среду собирали и центрифугировали в течение 30 мин при 2000g. Супернатант среды объединяли с 0,5 объемами Total Exosome Isolation Reagent от Cell Media (ThermoFisher) и выдерживали при 4°C в течение ночи. Экзосомы осаждали при 13000 оборотах в минуту в течение 1 часа. Супернатант полностью удаляли и экзосомы повторно суспендировали в стерильном PBS (200 мкл). Общий флуоресцентный сигнал получали путем лизиса 100 мкл экзосом с 50 мкл 10% Тритона в PBS и считывали при 633/660 нм на планшетном ридере Spectramax. 50 мкл каждого образца экзосом также анализировали на проточном цитометре MacsQuant в соответствии с указаниями производителя для экзосом.

[113] Как показано на изображении, каждая мутация приводила к уменьшению загрузки SNAIL миРНК в экзосомы, происходящие из MSC. Снижение сортировки является статистически значимым при p <0,0001 для миРНК (немодифицированной миРНК), скремблирование, S6, S-Mut1, S-Mut2, S-MUT3, S-Mut4, S-Mut5, S-Mut6, S-Mut7 и S-Mut8 по сравнению с конструкцией S6-ЭКЗО-код/миРНК.

В то время как изобретение было описано с помощью конкретных вариантов осуществления, процедуры модификаций будут очевидны специалистам в данной области техники, и такие модификации должны находиться в пределах объема

настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. РНК-Полинуклеотид или ДНК-вектор, кодирующий РНК-полинуклеотид, при этом РНК-полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну РНК-последовательность ЭКЗО-кода, описанную в данной заявке.

2. РНК-Полинуклеотид по п. 1, в котором РНК ЭКЗО-кода содержит последовательность, которая представляет собой:

5’-GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC-3’ (S6) (SEQ ID NO:26),

5’-CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG-3’ (M8) (SEQ ID NO:18) или

5’-AAGUGGCGUG-3’ (HB) SEQ ID NO:208.

3. РНК-Полинуклеотид по п. 1 или п. 2, при этом РНК-полинуклеотид содержит грузовой компонент, причем грузовым компонентом является: i) дополнительный полинуклеотидный сегмент, при этом дополнительный полинуклеотидный сегмент содержит функциональный полинуклеотидный сегмент, или при этом грузовой компонент представляет собой: ii) пептид, полипептид, флуорофор или малую молекулу лекарственного средства.

4. РНК-Полинуклеотид по п. 3, при этом РНК-полинуклеотид содержится в мембранной структуре.

5. РНК-Полинуклеотид по п. 3, в котором мембранной структурой является одна из: экзосомы, везикулы, микровезикулы, микрочастицы, везикулы, происходящей из эндосомы, мультивезикулярного тельца или апоптотического тельца.

6. РНК-Полинуклеотид по п. 5, при этом РНК-полинуклеотид содержится в экзосоме.

7. РНК-Полинуклеотид по любому из п.п. 4-6, в котором присутствует функциональный полинуклеотидный сегмент, и в котором функциональный полинуклеотидный сегмент содержит последовательность: малой шпилечной РНК (мшРНК) или малой интерферирующей РНК (миРНК), или микроРНК (микроРНК), или направляющей РНК с короткими палиндромными

повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR).

8. Способ, включающий введение в клетку или другую мембранную структуру РНК-полинуклеотида по п. 1.

9. Способ по п. 8, в котором РНК-полинуклеотид содержит последовательность, которая представляет собой:

5’-GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC-3’ (S6) (SEQ ID NO:26),

5’-CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG-3’ (M8) (SEQ ID NO:18) или

5’-AAGUGGCGUG-3’ (HB) SEQ ID NO:208.

10. Способ по п. 8 или п. 9, в котором РНК-полинуклеотид содержит грузовой компонент, при этом грузовой компонент представляет собой: i) дополнительный полинуклеотидный сегмент, причем дополнительный полинуклеотидный сегмент содержит функциональный полинуклеотидный сегмент, или при этом грузовой компонент представляет собой: ii) пептид, полипептид, флуорофор или малую молекулу лекарственного средства.

11. Способ по п. 10, в котором РНК-полинуклеотид вводят в клетку, при этом клетка представляет собой эукариотическую клетку, и причем РНК-полинуклеотид секретируется в качестве компонента мембранной структуры.

12. Способ по п. 11, в котором мембранная структура включает экзосому, везикулу, микровезикулу, везикулу, происходящую из эндосомы, мультивезикулярное тельце или апоптотическое тельце.

13. Способ по п. 12, котором мембранная структура представляет собой экзосому.

14. Способ по п. 13, в котором экзосома содержит больше РНК-полинуклеотида, чем контрольное значение, полученное или следующее из сортировки контрольного РНК-полинуклеотида в экзосомы одной или более клетками.

15. Способ по п. 14, в котором мембранная структура поглощается отличными клетками, которые не содержат РНК-полинуклеотид до подвергания воздействию на

мембранной структуры.

16. Способ по п. 15, в котором фенотип отличных клеток изменяется после поглощения мембранной структуры.

17. Способ по п. 16, в котором фенотип отличных клеток изменяется от патологического фенотипа к непатологическому фенотипу.

18. Способ по п. 17, в котором патологический фенотип содержит злокачественный фенотип, и при этом непатологический фенотип включает незлокачественный фенотип.

19. Способ по любому из п.п. 8-18, в котором введение РНК-полинуклеотида включает экспрессирование РНК-полинуклеотида с ДНК-последовательности в клетке.

20. Вектор экспрессии, кодирующий РНК-полинуклеотид по п. 3.

21. Вектор экспрессии по п. 20, при этом РНК-полинуклеотид содержит грузовой компонент, причем грузовой компонент содержит дополнительный полинуклеотидный сегмент, при этом дополнительный полинуклеотидный сегмент содержит функциональный полинуклеотидный сегмент.

22. Выделенная или синтезированная экзосома, содержащая РНК-полинуклеотид по п. 1 или п. 2, при этом РНК-полинуклеотид содержит грузовой компонент, причем грузовой компонент представляет собой: i) дополнительный полинуклеотидный сегмент, при этом дополнительный полинуклеотидный сегмент содержит функциональный полинуклеотидный сегмент, или причем грузовой компонент содержит ii) пептид, полипептид, флуорофор или малую молекулу лекарственного средства.

23. Выделенная или синтезированная экзосома по п. 22, при этом экзосома содержит дополнительный полинуклеотидный сегмент, причем дополнительный полинуклеотидный сегмент содержит функциональный полинуклеотидный сегмент.

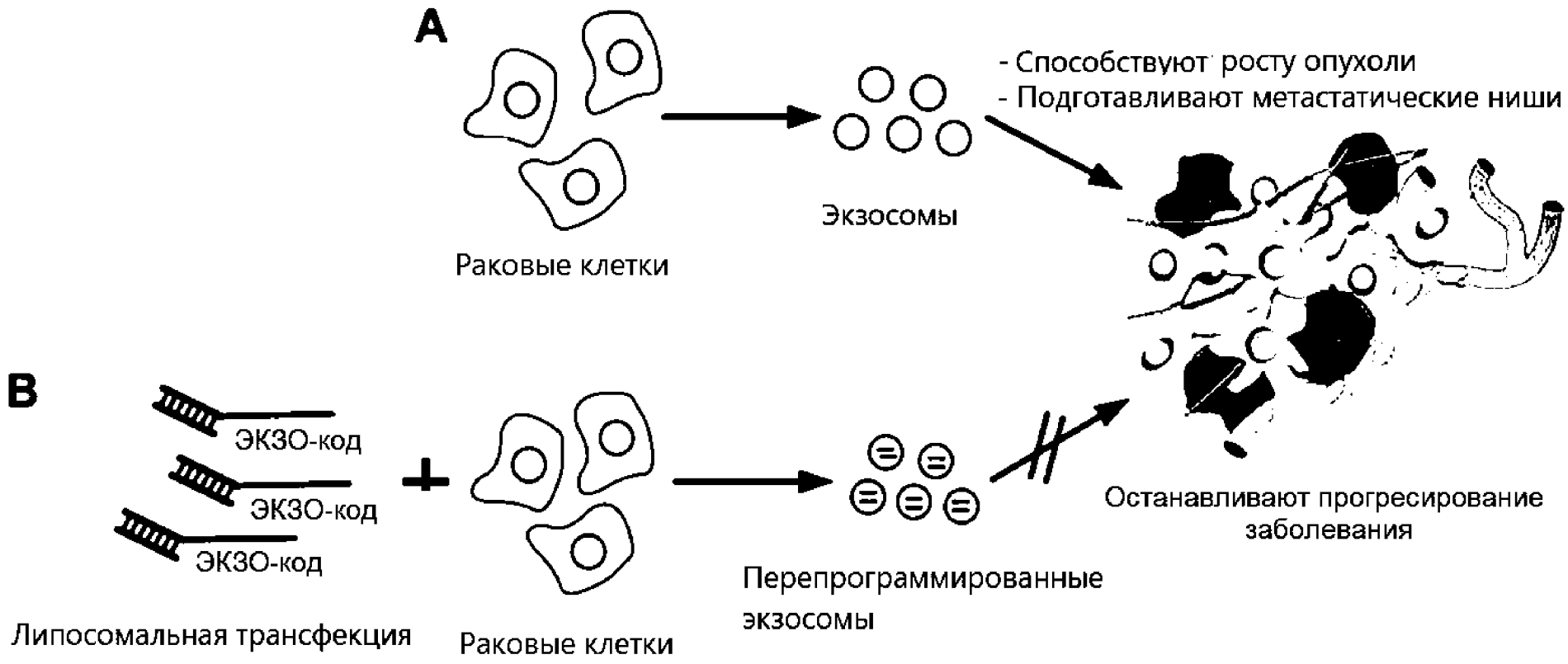
24. Выделенная или синтезированная экзосома по п. 23, в которой функциональный

полинуклеотидный сегмент содержит последовательность: малой шпилечной РНК (мшРНК) или малой интерферирующей РНК (миРНК), или микроРНК (микроРНК), или направляющей РНК с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR).

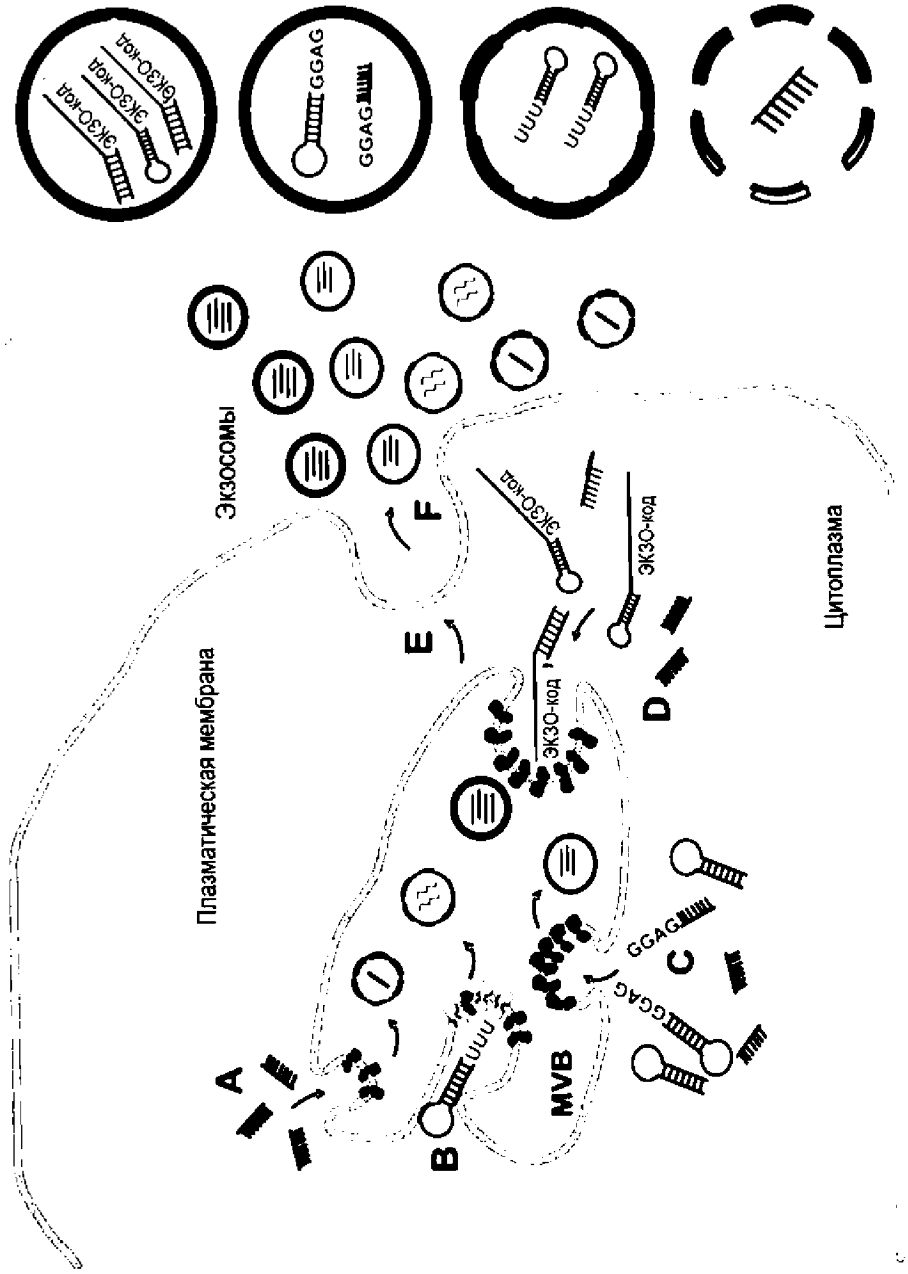
25. Способ, включающий введение вектора экспрессии по п. 20 в клетки и обеспечение возможности экспрессии указанного вектора экспрессии.

26. Способ по п. 25, в котором клетки экспрессируют РНК-полинуклеотид, и при этом РНК-полинуклеотид включен в экзосомы.

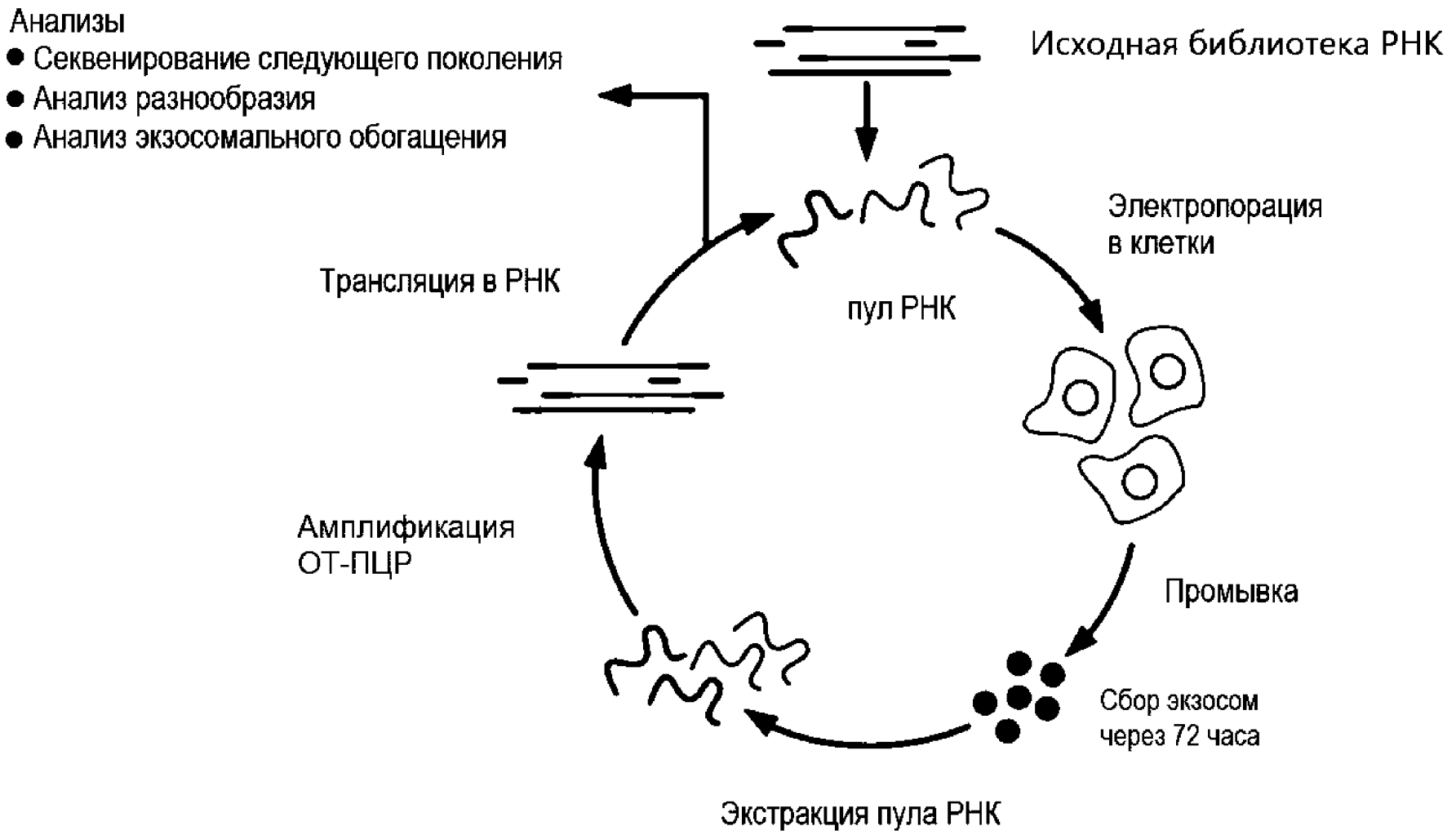
27. Способ по п. 26, в котором в экзосомы включено больше РНК-полинуклеотида, по отношению к контрольному значению, полученному или следующему из сортировки контрольного РНК-полинуклеотида в экзосомы одной или более клетками.


A
- Способствуют росту опухоли
- Подготавливают метастатические ниши
Раковые клетки
Экзосомы
B
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
Липосомальная трансфекция
или электропорация
Раковые клетки
Перепрограммированные
экзосомы
Останавливают прогресирование
заболевания

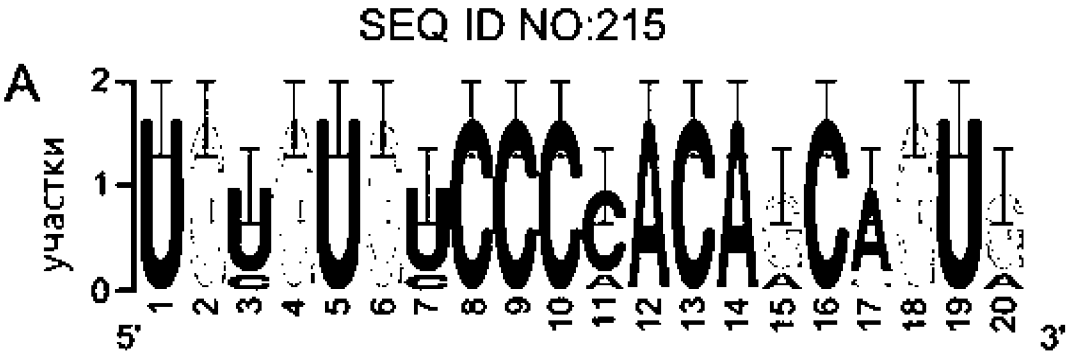
Фигура 1


ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
GGAG
GGAG
UUU
UUU
Экзосомы
Плазматическая мембрана
Цитоплазма
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код
GGAG
GGAG
UUU
A
B
C
D
E
F
MVB

Фигура 2

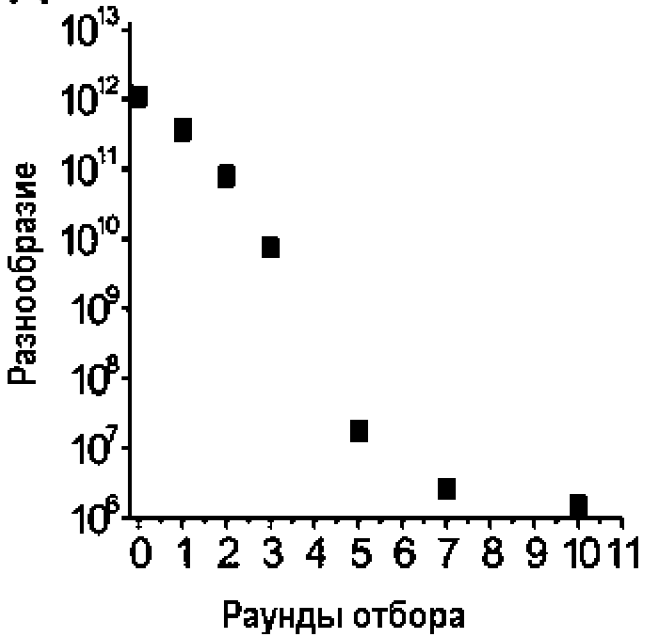

Анализы
● Секвенирование следующего поколения
● Анализ разнообразия
● Анализ экзосомального обогащения
Исходная библиотека РНК
Электропорация
в клетки
пул РНК
Промывка
Сбор экзосом
через 72 часа
Экстракция пула РНК
Амплификация
ОТ-ПЦР
Трансляция в РНК

Фигура 3


SEQ ID NO:215
A
участки
2
1
0
5'
3'
B
SEQ ID NO:215
ЭКЗО-код
UGUGUGUCCCCACAGCAGUG
Неспецифический контроль
ACAGUAGAGCCUUCACCGGC
SEQ ID NO:4
C
ЭКЗО-код
Неспецифический контроль
**
Кратность обогащения
(Экзосома/клетка)
100
50
30
20
10
5
3
2
1

Фигура 4

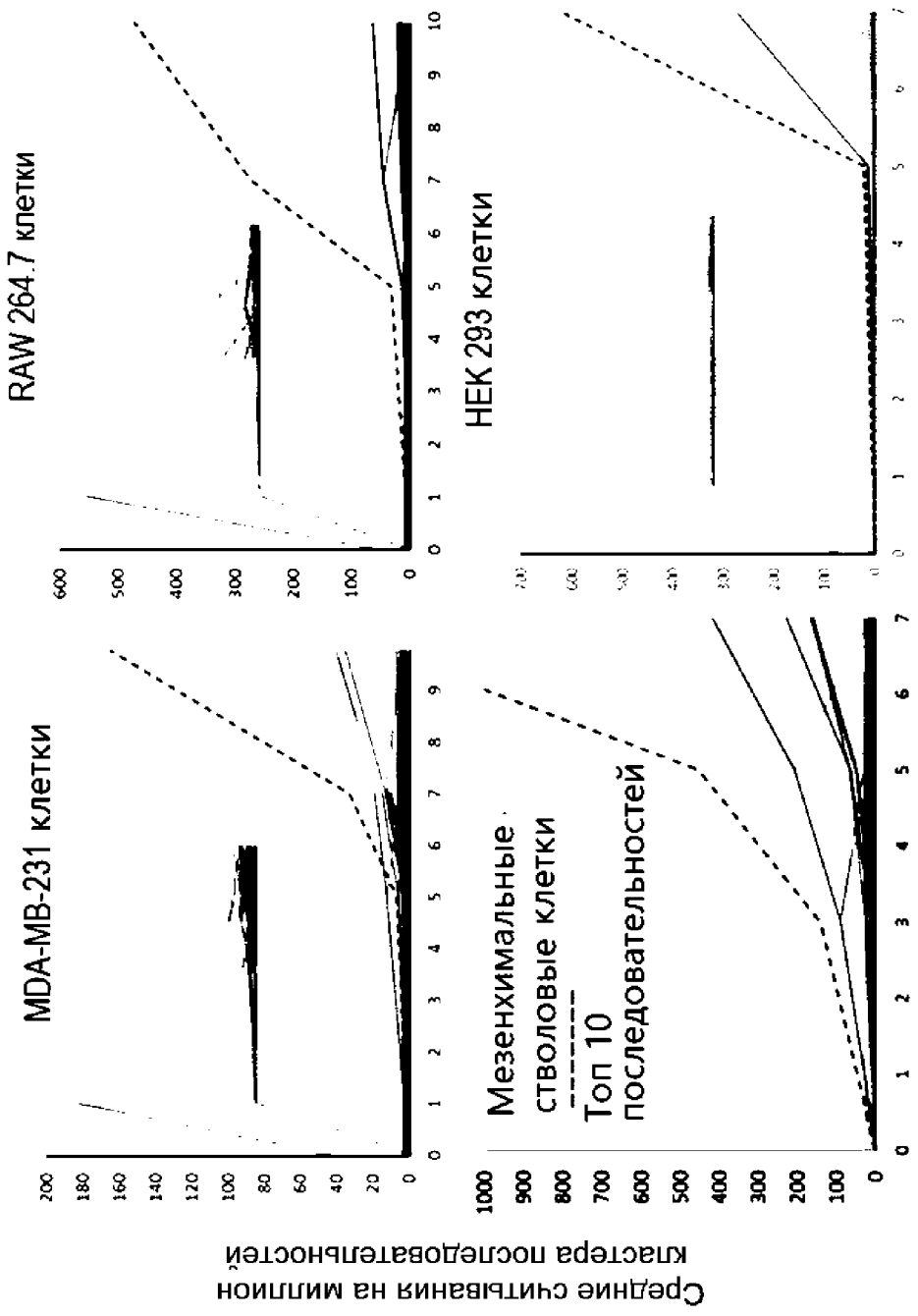
A



B

№	Последовательности (5'→3')	Кратность обогащения	
1	TCGTAGGTCAGGAAGCGGCG	806	SEQ ID NO:216
2	GCGATAGGCGGTCGTTGGTC	644	SEQ ID NO:217
3	CCCGCTTCTTCCTCGGGTGG	506	SEQ ID NO:218
4	GTCACTCGGCCTAGTGCGTC	406	SEQ ID NO:219
5	CCTGACCTTACTCGGGTGGC	309	SEQ ID NO:220
6	GTGGTCGATAAGCGTACGCG	239	SEQ ID NO:221
7	AGGGCGTTTGCTCGCGGGTC	235	SEQ ID NO:222
8	CCGGGCGTATCTTGTGGTCG	225	SEQ ID NO:223
9	CAGACGGTACTCAGGTGTGC	218	SEQ ID NO:224
10	GGCCTTGGTCGCGTGCTGGC	216	SEQ ID NO:225
11	CCATGCTCGCGCGGAGTGGC	213	SEQ ID NO:226
12	TGCGATGTTGTGAGTGGCCC	200	SEQ ID NO:227
13	GCGACGTCAGGTGGGCTTGG	198	SEQ ID NO:228
14	TAGCGGGTGCGATGTGGTGC	195	SEQ ID NO:229
15	AGCGATTTCGCAGGTGGTGC	185	SEQ ID NO:230

Фигура 5


RAW 264.7 клетки
HEK 293 клетки
MDA-MB-231 клетки
Мезенхимальные стволовые клетки
Топ 10 последовательностей
Раунд отбора
Раунд отбора
Среднее считывания на миллион кластера последовательностей

Фигура 6

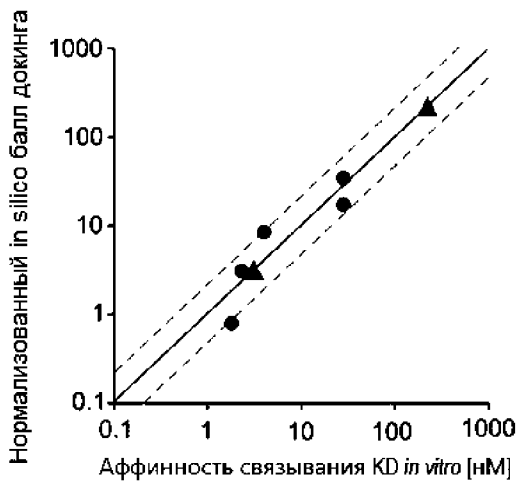
нуклеотидный код IUPAC
WWMGYGCWYMYW SEQ ID NO:231
CCYNKVRAHCC SEQ ID NO:232
CYGSRYUKRGRG SEQ ID NO:233

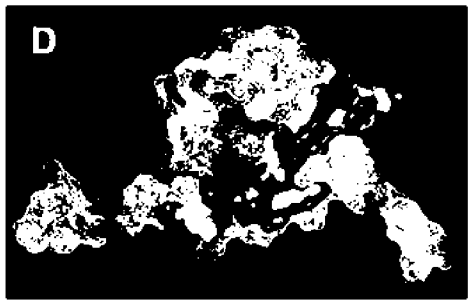
нуклеотидный код IUPAC	Основание
A	Аденин
C	Цитозин
G	Гуанин
T (или U)	Тимин (или урацил)
R	A или G
Y	C или T/U
S	G или C
W	A или T/U
K	G или T/U
M	A или C
B	C или G или T/U
D	A или G или T/U
H	A или C или T/U
V	A или C или G
N	любое основание

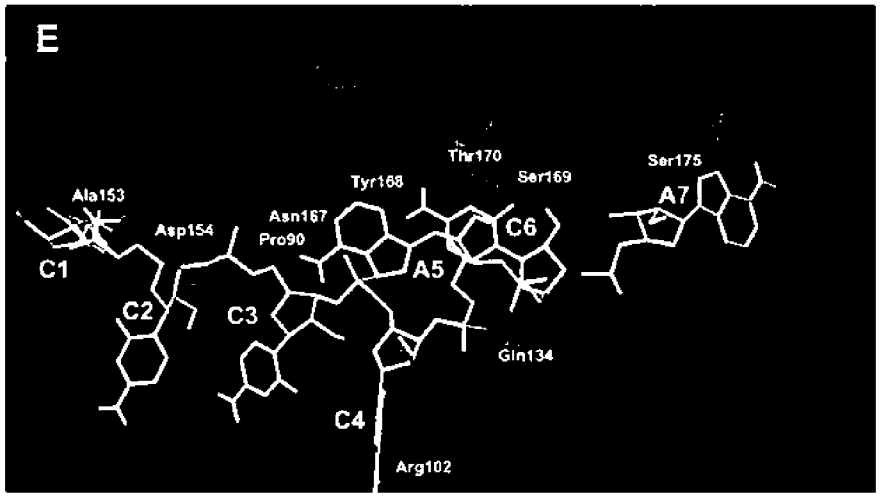
Фигура 7

A

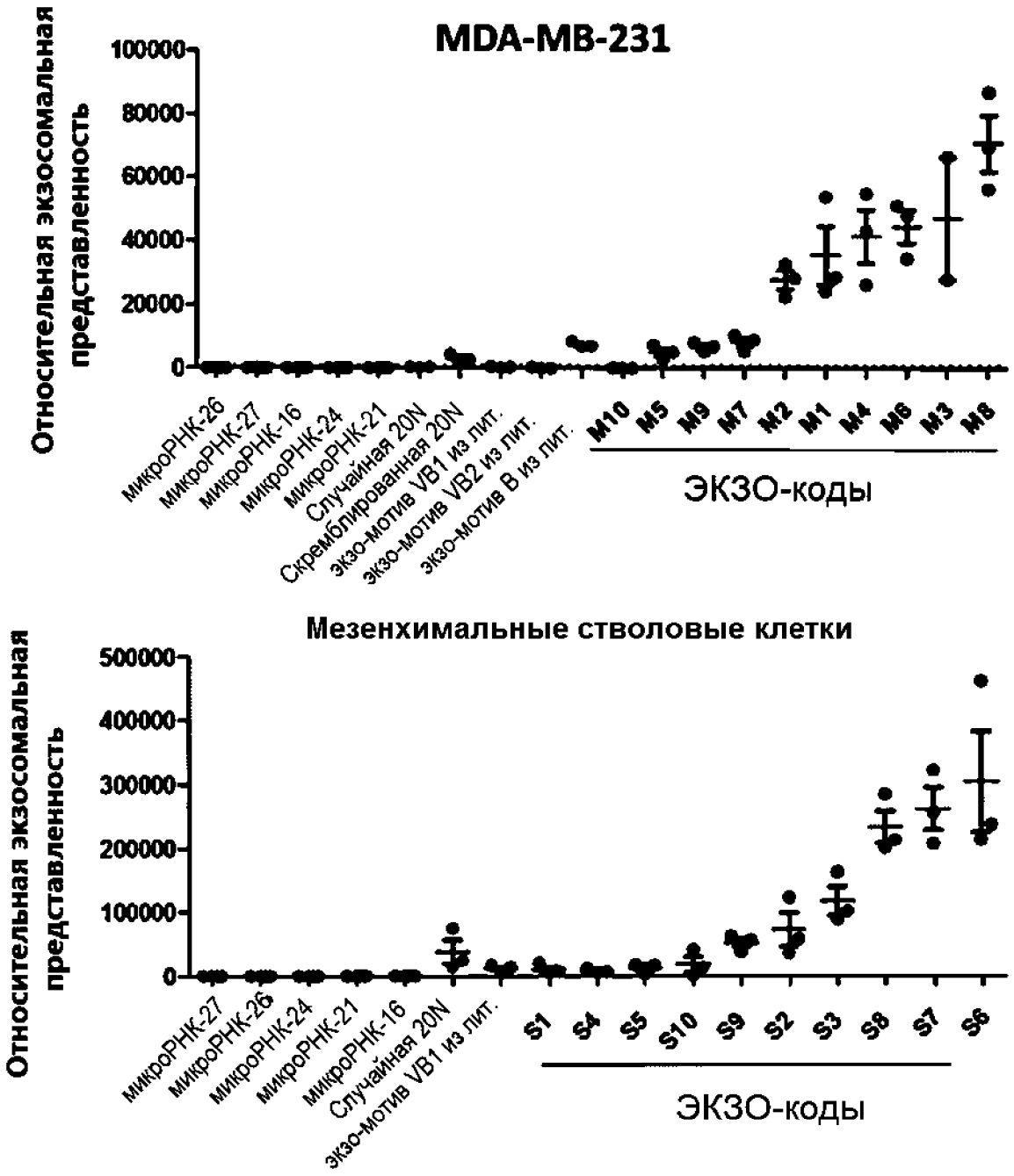
	Аффинность связывания KD *in vitro* [нМ]	Нормализованный in silico балл докинга
CACACA	1.8	0.77
CAUUACA	2.3	3.06
CCCCACA	-	3.23
CAUACA	4	8.48
CACCCA	28	17.37
CACCUU	28	34.58
CACAGCA	-	223.17
CAUUUACA	> 50	> 250



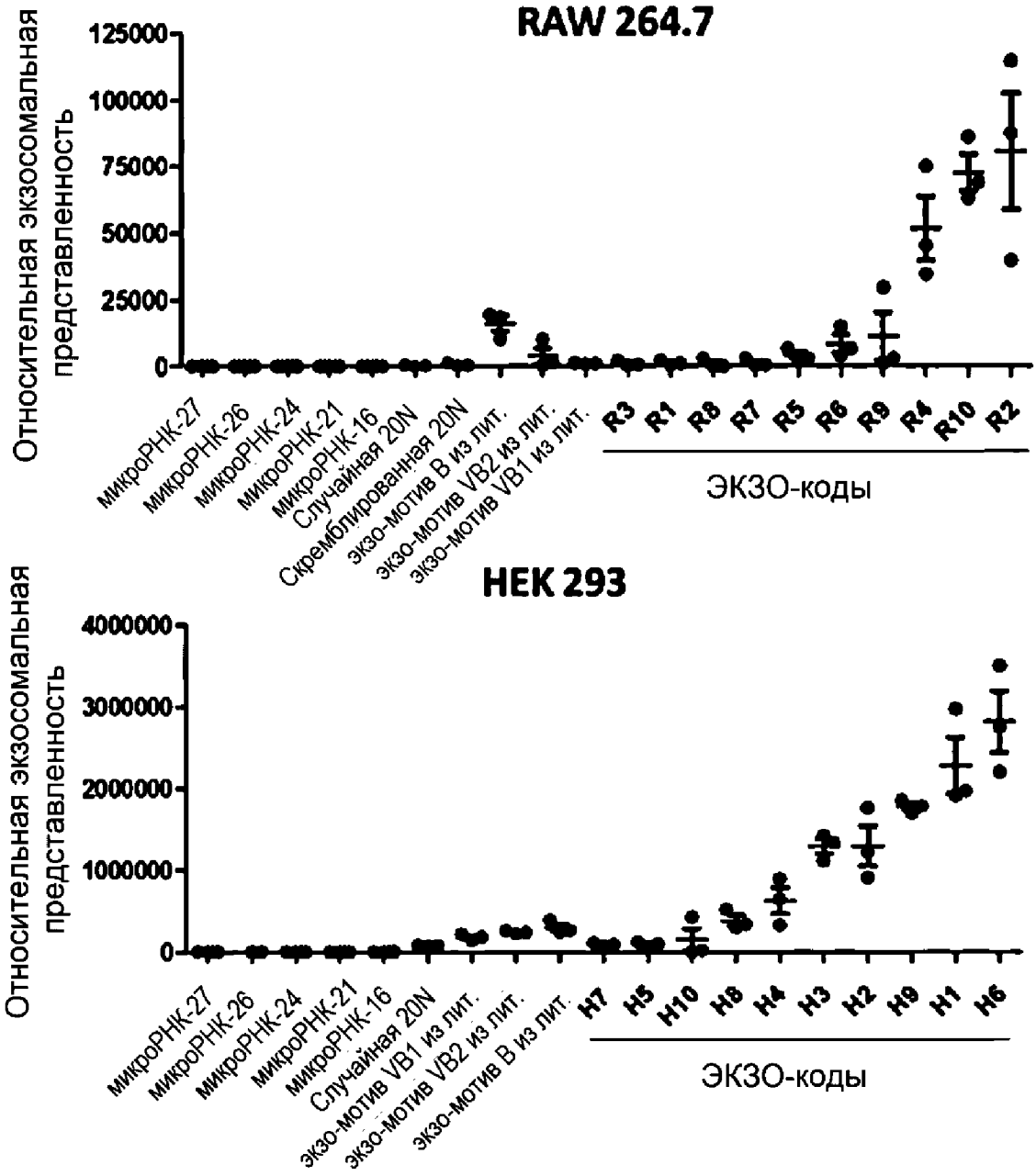




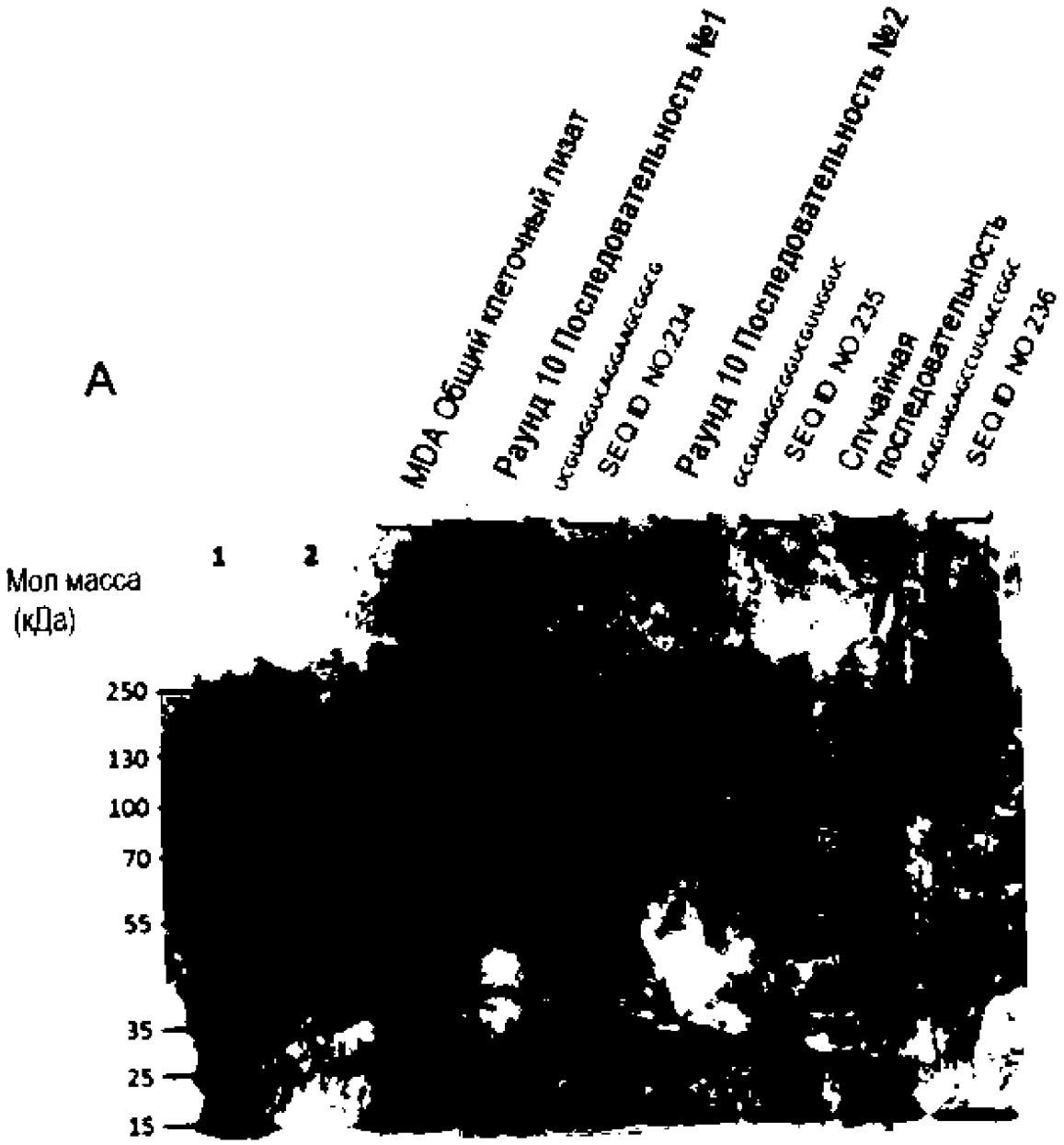
Фигура 8


MDA-MB-231
Относительная экзосомальная представленность
100000
80000
60000
40000
20000
0
микроРНК-26
микроРНК-27
микроРНК-16
микроРНК-24
микроРНК-21
Случайная 20N
Скремблированная 20N
экзо-мотив VB1 из лит.
экзо-мотив VB2 из лит.
экзо-мотив B из лит.
M10
M5
M9
M7
M2
M1
M4
M6
M3
M8
ЭКЗО-коды
Мезенхимальные стволовые клетки
Относительная экзосомальная представленность
500000
400000
300000
200000
100000
0
микроРНК-27
микроРНК-26
микроРНК-24
микроРНК-21
микроРНК-16
Случайная 20N
экзо-мотив VB1 из лит.
S1
S4
S5
S10
S9
S2
S3
S8
S7
S6
ЭКЗО-коды

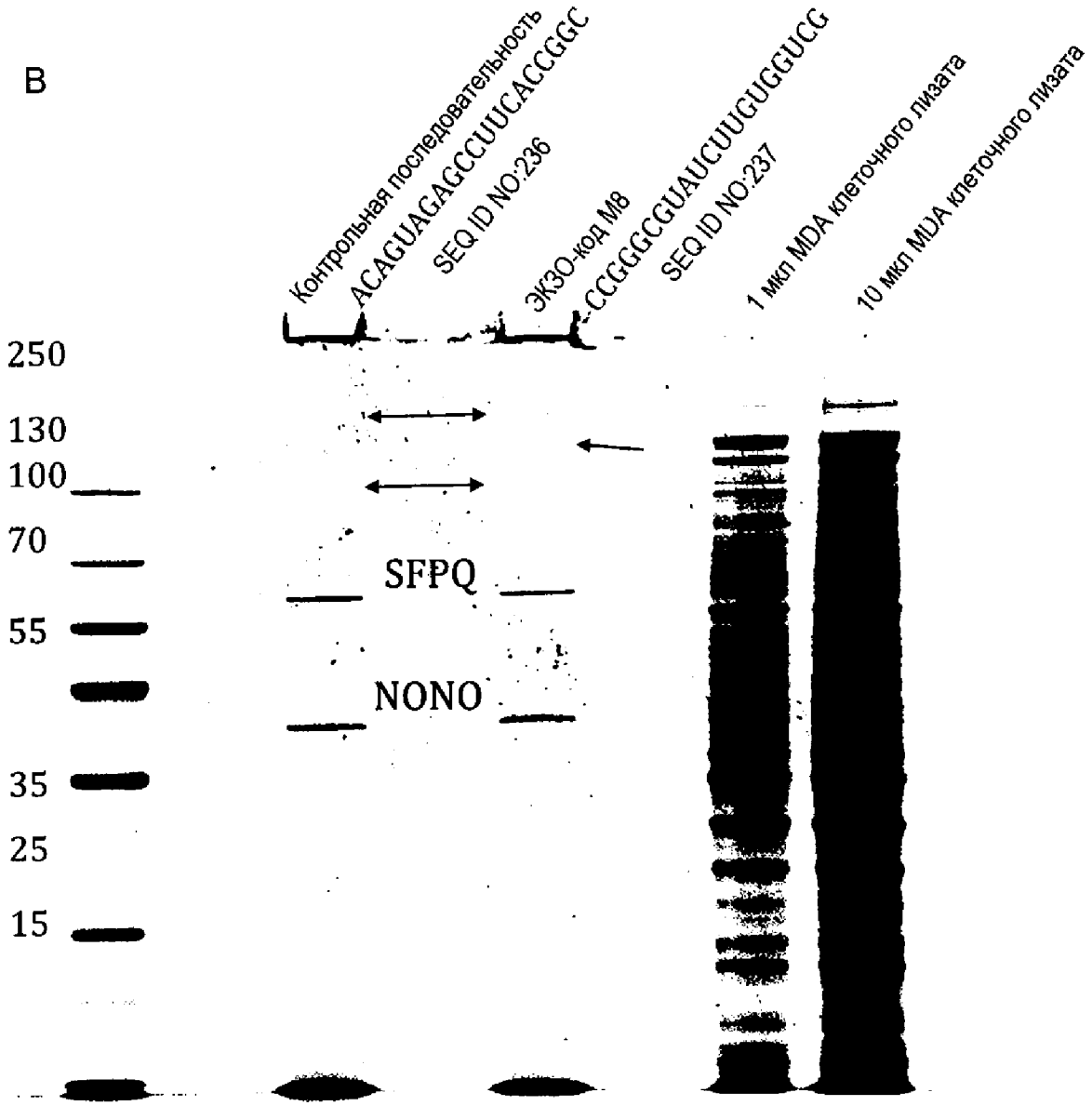
Фигура 9



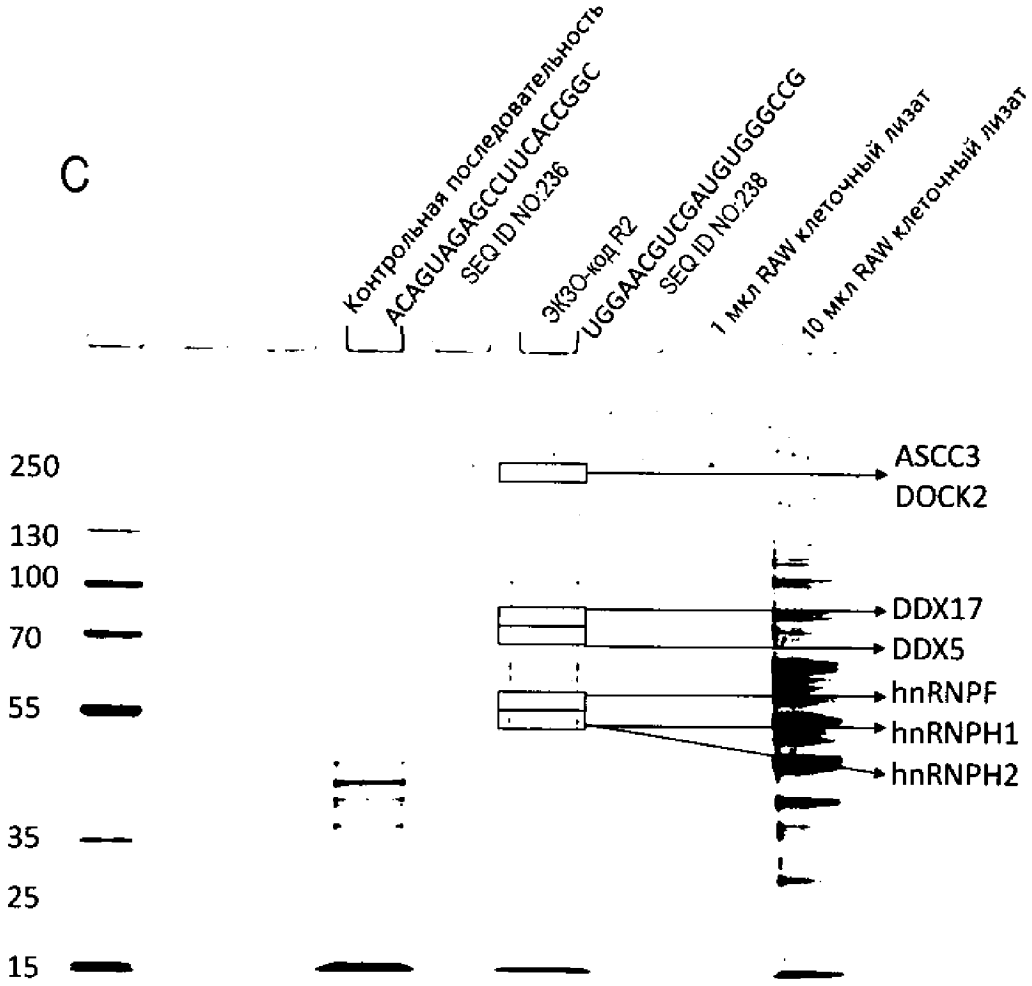
Фигура 9 (продолжение)


A
МДА Общий клеточный лизат
Раунд 10 Последовательность №1
SEQ ID NO:234
Раунд 10 Последовательность №2
SEQ ID NO:235
Случайная последовательность
SEQ ID NO:236
1
2
Мол масса (кДа)
250
130
100
70
55
35
25
15

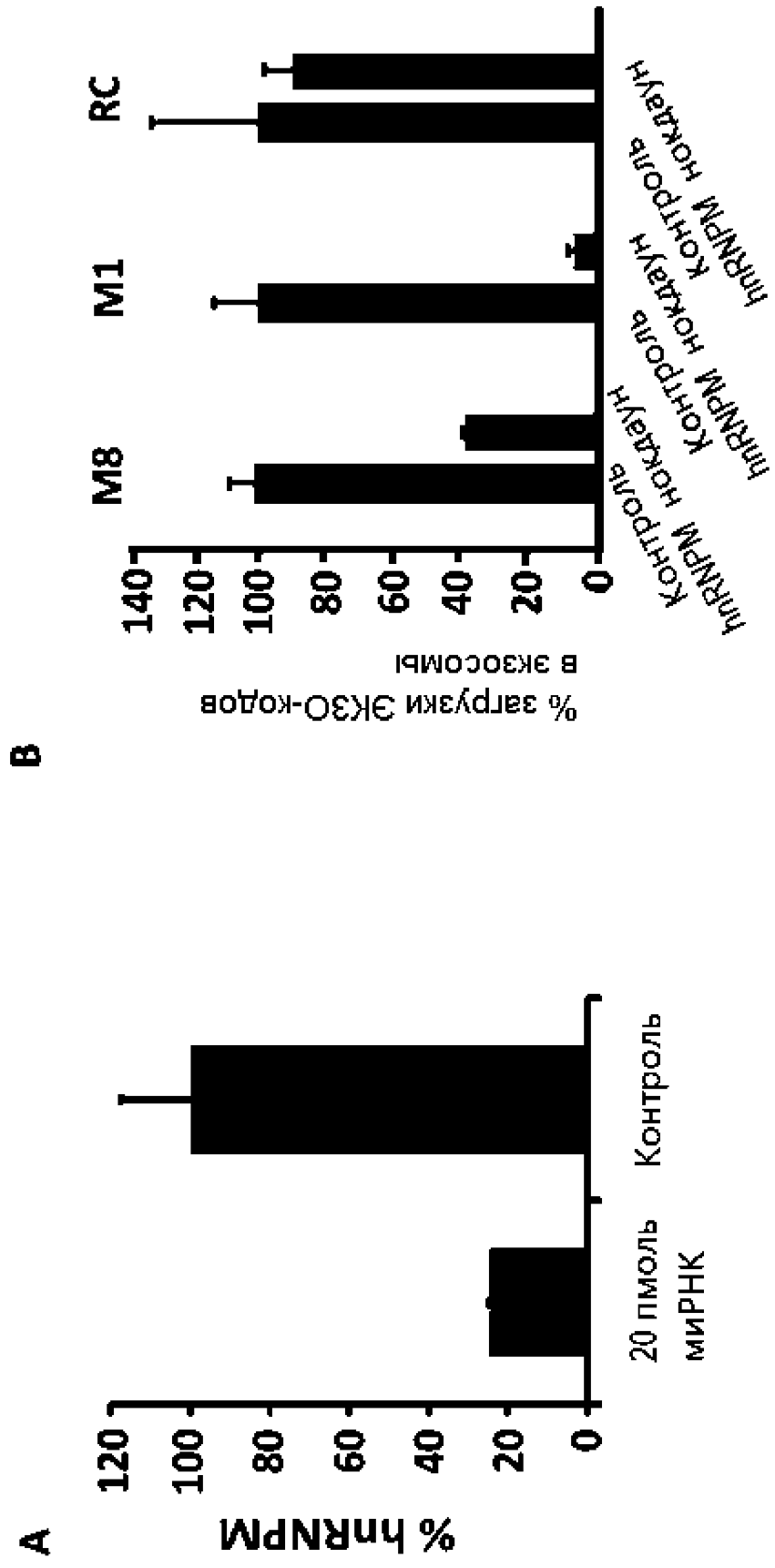
Фигура 10



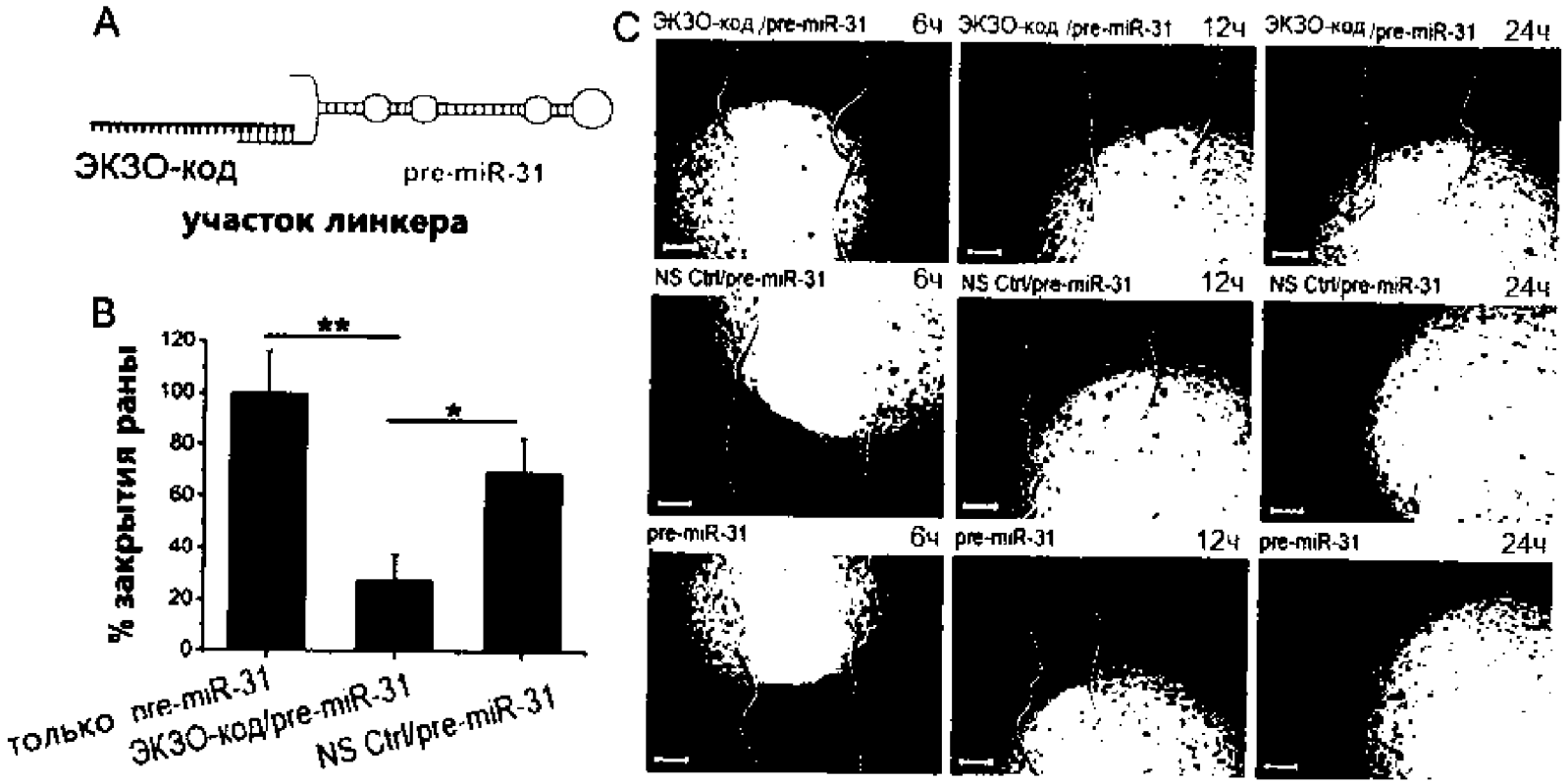
Фигура 10 (продолжение)



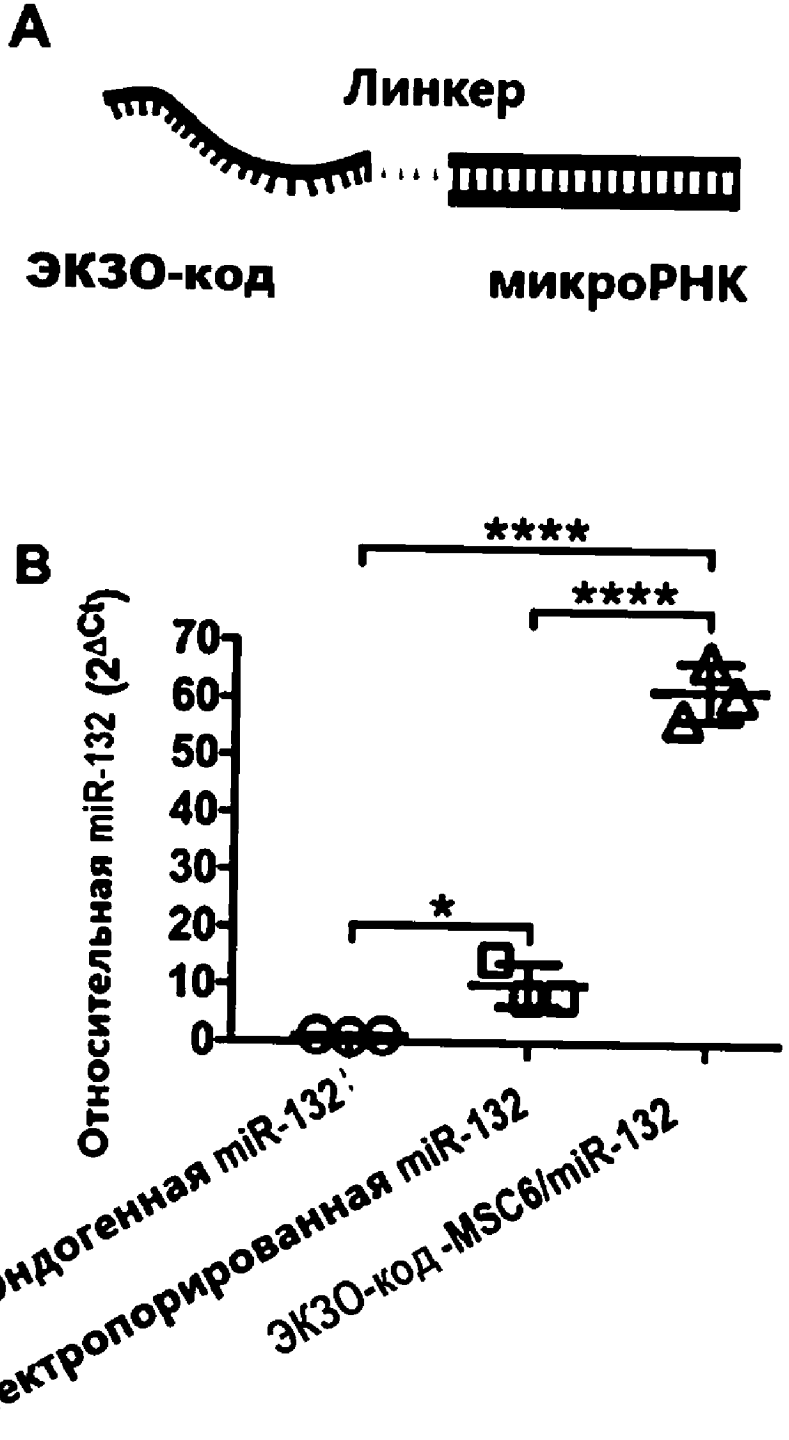
Фигура 10 (Продолжение)


A
% hnRNPM
120
100
80
60
40
20
0
20 пмоль миРНК
Контроль
B
% загрузки ЭКЗО-кодов в экзосомы
140
120
100
80
60
40
20
0
M8
M1
RC
hnRNPM нокдаун
Контроль нокдаун
hnRNPM нокдаун
Контроль нокдаун
hnRNPM нокдаун
Контроль нокдаун

Фигура 11

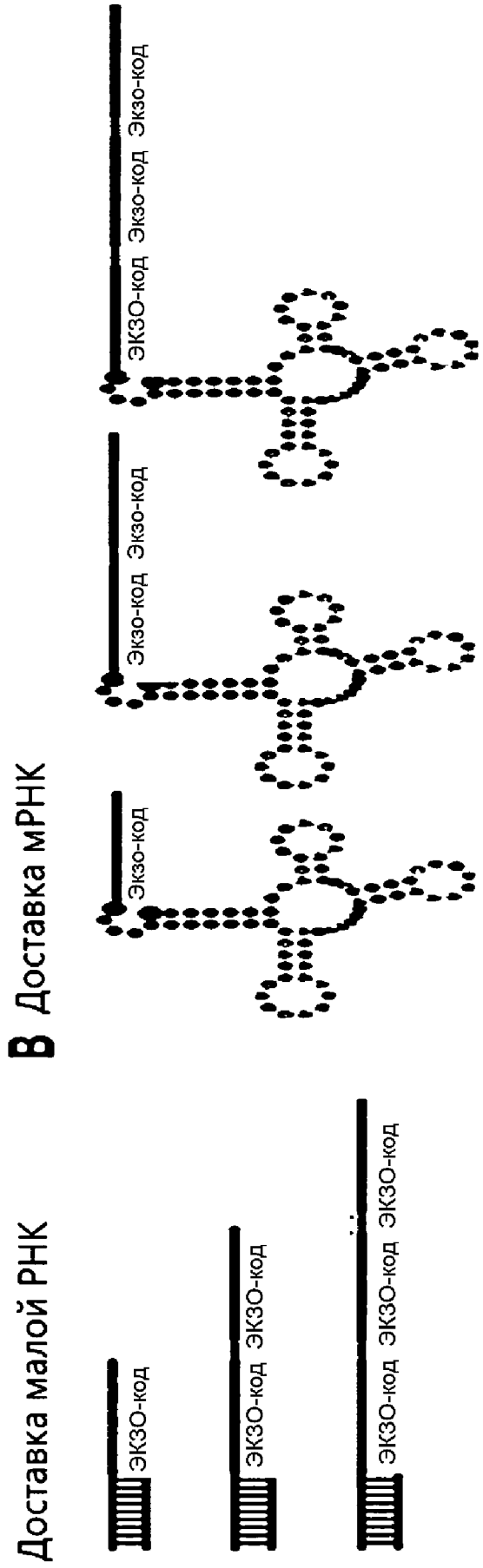

A
ЭКЗО-код
pre-miR-31
участок линкера
B
% закрытия раны
120
100
80
60
40
20
0
**
*
только pre-miR-31
ЭКЗО-код/pre-miR-31
NS Ctrl/pre-miR-31
C
ЭКЗО-код /pre-miR-31 6ч
ЭКЗО-код /pre-miR-31 12ч
ЭКЗО-код /pre-miR-31 24ч
NS Ctrl/pre-miR-31 6ч
NS Ctrl/pre-miR-31 12ч
NS Ctrl/pre-miR-31 24ч
pre-miR-31 6ч
pre-miR-31 12ч
pre-miR-31 24ч

Фигура 12

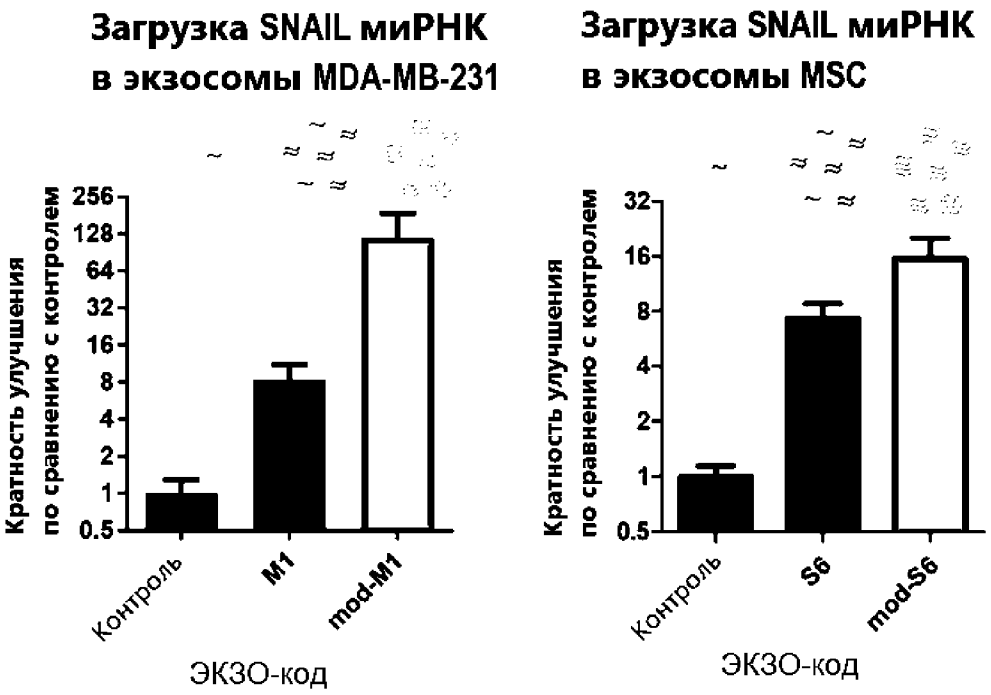

A
Линкер
ЭКЗО-код
микроРНК
B
Относительная miR-132 ($2^{\Delta Ct}$)
70
60
50
40
30
20
10
0
****
****
*
Эндогенная miR-132
Электропорированная miR-132
ЭКЗО-код-MSC6/miR-132

Фигура 13

Фигура 13 (продолжение)


A Доставка малой РНК
ЭКЗО-код
ЭКЗО-код ЭКЗО-код
ЭКЗО-код ЭКЗО-код ЭКЗО-код
B Доставка мРНК
Экзо-код
Экзо-код Экзо-код
ЭКЗО-код Экзо-код Экзо-код

Фигура 14



M1: UCGUAGGUCAGGAAGCGGCG SEQ ID NO:234
mM1: pUmCGpUAGGpUmCAGGAAGmCGGmCG

S6: GCUGGUCAGGAUGCGGGGGC SEQ ID NO:239
mS6: GmCpUGGpUmCAGGApUGmCGGGGGmC

RC: ACAGUAGAGCCUUCACCGGC SEQ ID NO:236

пассажирская цепь (смысловая)

Snail смысловая: GAUGCACAUCCGAAGCCACUU
SEQ ID NO:240

mod-M1 = mM1
mod-S6 = mS6

Фигура 15

A

PC-3 (DDRGKUAGGGK)

SEQ ID NO:241

Raw 264.7 (DVVRVNNVDNVDBDBBGUGG)

SEQ ID NO:242

Мезенхимальные стволовые клетки (NNVNDNNBBNNRYKK)

SEQ ID NO:243

Последовательности в скобках представляют нуклеотидный код IUPAC

MDA-MB-231 (DBDNNGKSKBBDBGB)

SEQ ID NO:244

HEK 293 (WRVUGURYYDGBDDDDYDVB)

SEQ ID NO:245

B

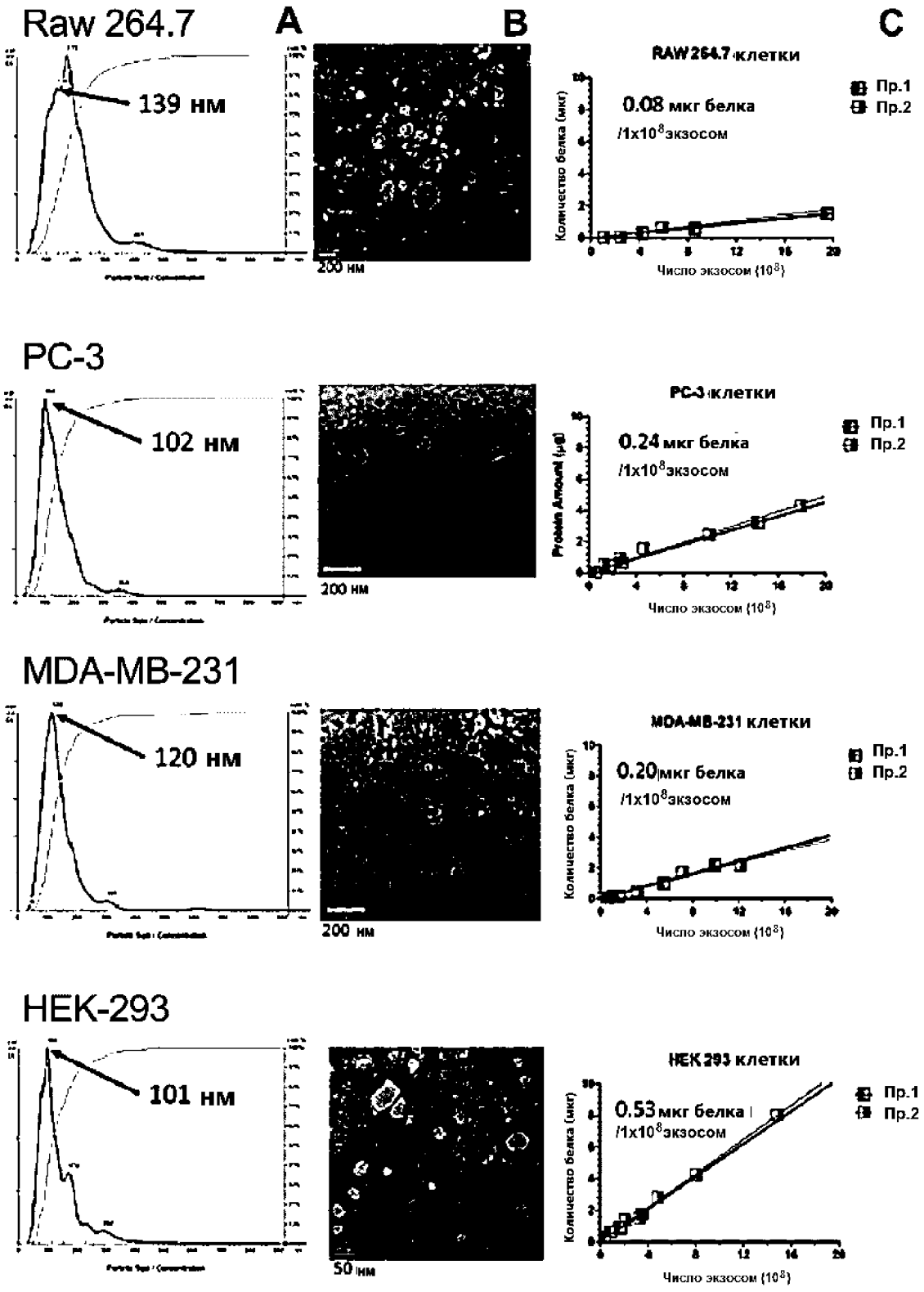
PC-3 (DWWNGUUGGRD)

SEQ ID NO:246

Raw 264.7 (KDDDNGUUGGRWHB)

SEQ ID NO:247

Фигура 16


Raw 264.7
A
B
C
139 нм
200 нм
RAW 264.7 клетки
0.08 мкг белка
/1x10⁸экзосом
Пр.1
Пр.2
Количество белка (мкг)
Число экзосом (10⁸)
PC-3
102 нм
200 нм
PC-3 клетки
0.24 мкг белка
/1x10⁸экзосом
Пр.1
Пр.2
Protein Amount (μg)
Число экзосом (10⁸)
MDA-MB-231
120 нм
200 нм
MDA-MB-231 клетки
0.20 мкг белка
/1x10⁸экзосом
Пр.1
Пр.2
Количество белка (мкг)
Число экзосом (10⁸)
HEK-293
101 нм
50 нм
HEK 293 клетки
0.53 мкг белка
/1x10⁸экзосом
Пр.1
Пр.2
Количество белка (мкг)
Число экзосом (10⁸)

Фигура 17

Мотив, спрогнозированный in silico

MDA топ 16σ

IUPAC	E-значение
SSSCAAGUGGC (SEQ ID NO:248)	3.3e-29
ACWCGAGWKGC (SEQ ID NO:249)	1.7e-03
UGGCKUGUGGCU (SEQ ID NO:250)	4.9e-02
AWCUUGUGGUC (SEQ ID NO:251)	2.3e-15
DDGUGGNYGUGC (SEQ ID NO:252)	7.7e-23
VGUGKGKUGUGC (SEQ ID NO:253)	1.6e-12
WGCGASGUSGYG (SEQ ID NO:254)	2.7e-06
CMYCACAKCMGY (SEQ ID NO:255)	3.8e-03

GUGGC

AGCGA

MSC топ 16σ

IUPAC	E-значение
RNRDGUGGCRUG (SEQ ID NO:256)	3.0e-52
SKMDRGUGGCY (SEQ ID NO:257)	3.7e-13
GSGCGKHGUGGY (SEQ ID NO:258)	8.9e-09
AGCGAYGKUGYG (SEQ ID NO:259)	2.5e-36
UAGCGRGUGCG (SEQ ID NO:260)	3.9e-05
AGMGRYGGUCGU (SEQ ID NO:261)	2.0e-03
GCGUADKKBGBG (SEQ ID NO:262)	4.7e-17
UASGUUGGRAMG (SEQ ID NO:263)	5.3e-17
AUGCGGGGGC (SEQ ID NO:264)	1.3e-05
ARABMDAGGYGC (SEQ ID NO:265)	2.0e-05

Фигура 18

Мотив, спрогнозированный in silico

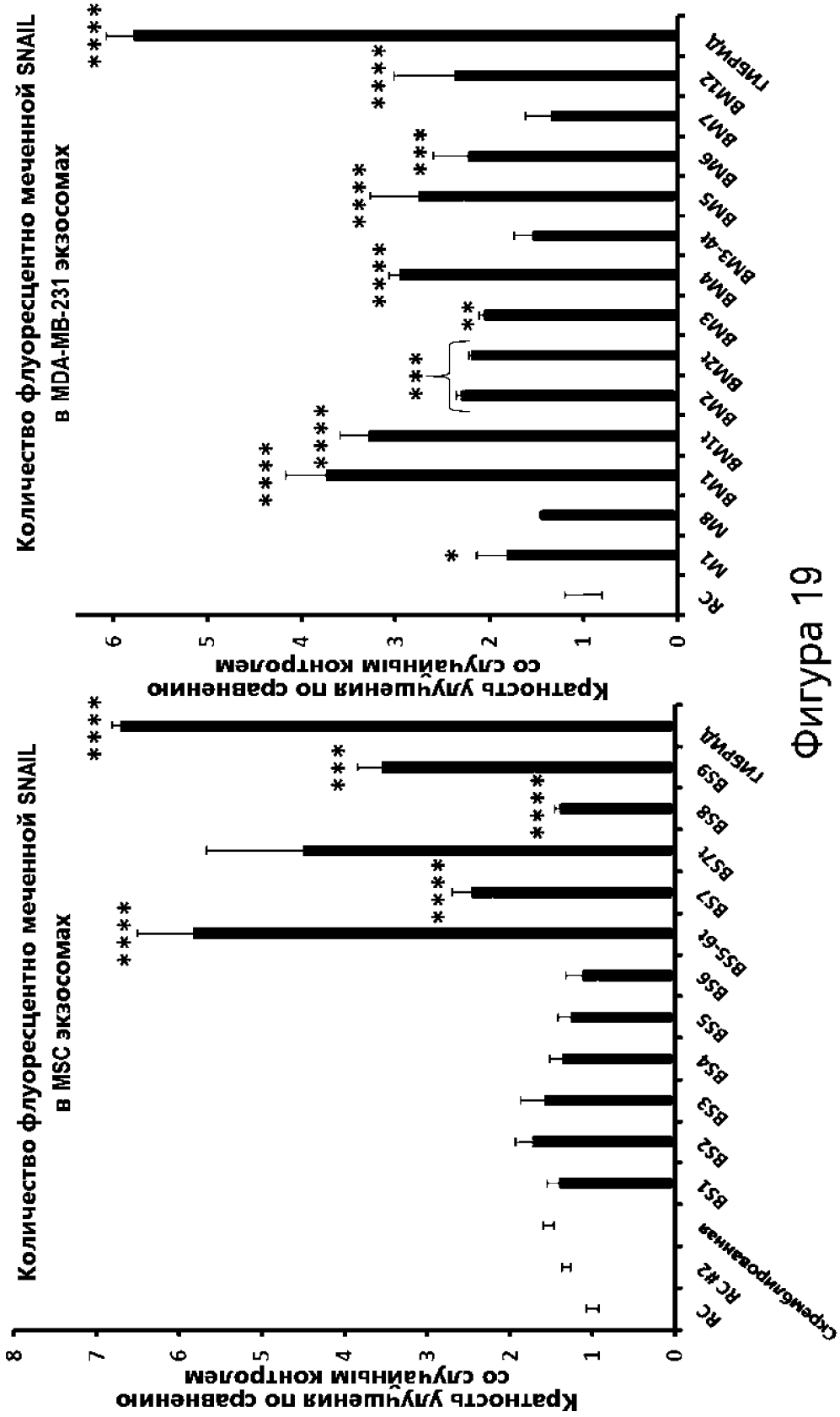
MSC топ 16σ

IUPAC	E-значение
RNRDGUGGCRUG (SEQ ID NO:256)	3.0e-52
SKMDRGUGGCY (SEQ ID NO:257)	3.7e-13
GSGCGKHGUGGY (SEQ ID NO:258)	8.9e-09
AGCGAYGKUGYG (SEQ ID NO:259)	2.5e-36
UAGCGRGUGCG (SEQ ID NO:260)	3.9e-05
AGMGRYGGUCGU (SEQ ID NO:261)	2.0e-03
GCGUADKKBGBG (SEQ ID NO:262)	4.7e-17
UASGUUGGRAMG (SEQ ID NO:263)	5.3e-17
AUGCGGGGGC (SEQ ID NO:264)	1.3e-05
ARABMDAGGYGC (SEQ ID NO:265)	2.0e-05

RAW топ 16σ

IUPAC	E-значение
AGUUGGAANGCG (SEQ ID NO:266)	2.0e-023
GNRWGCGGKGGC (SEQ ID NO:267)	3.5e-021
UGURCWNKNWW (SEQ ID NO:268)	6.6e-017
HGGRGSAGUGG (SEQ ID NO:269)	9.1e-008
RNNRRWGCGGGG (SEQ ID NO:270)	4.6e-007
KMGURWRUCNW (SEQ ID NO:271)	3.4e-006
KRDNWGGUGGCH (SEQ ID NO:272)	1.5e-005
GGGGGCRUAUG (SEQ ID NO:273)	6.7e-003

Фигура 18 (Продолжение)


Количество флуоресцентно меченной SNAIL
в MDA-MB-231 экзосомах
Кратность улучшения по сравнению
со случайным контролем
RC
M1
M8
BM1
BM1t
BM2
BM2t
BM3
BM4
BM3-4t
BM5
BM6
BM7
BM12
ГИБРИД
Количество флуоресцентно меченной SNAIL
в MSC экзосомах
Кратность улучшения по сравнению
со случайным контролем
RC
RC #2
Скрембилирование
BS1
BS2
BS3
BS4
BS5
BS6
BS5-6t
BS7
BS7t
BS8
BS9
ГИБРИД

Фигура 19

Контроли

RC	ACAGUAGAGCCUUGACCGGC	SEQ ID NO:236
RC #2	AUUCGUCGAGUACAGACCUG	SEQ ID NO:274
Скрембли-рованная	GCGCAGGGAGGGCUUGGGUC	SEQ ID NO:275

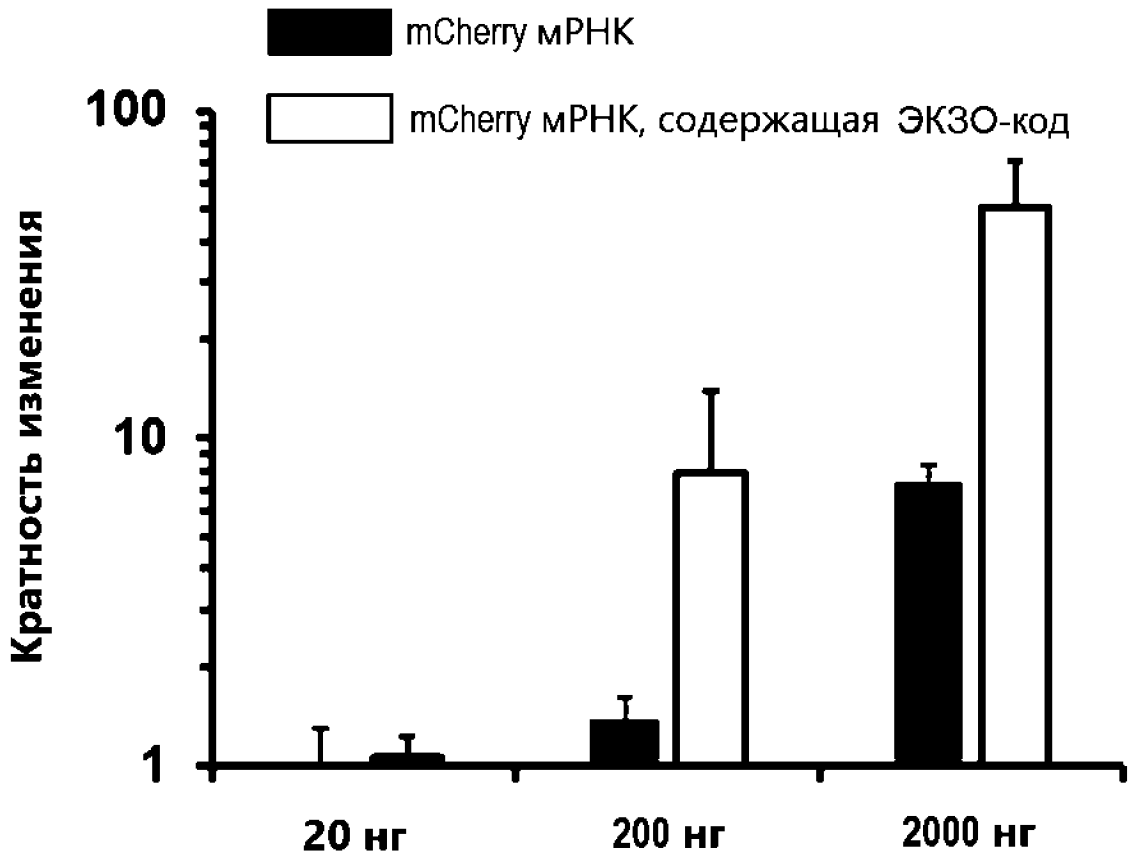
MSC мотивы in silico

BS1	GUGGCGUG	
BS2	AGCGACGUUGCG	SEQ ID NO:276
BS3	GCGUAUGGCGUG	SEQ ID NO:277
BS4	UAGGUUGGAAAG	SEQ ID NO:278
BS5	GUGGCU	
BS6	GGGCGUCGUGGC	SEQ ID NO:279
BS5-6t	GUGGC	
BS7	AUGCGGGGGC	SEQ ID NO:280
BS7t	GCGGGG	
ГИБРИД	AAGUGGCGUG	SEQ ID NO:281

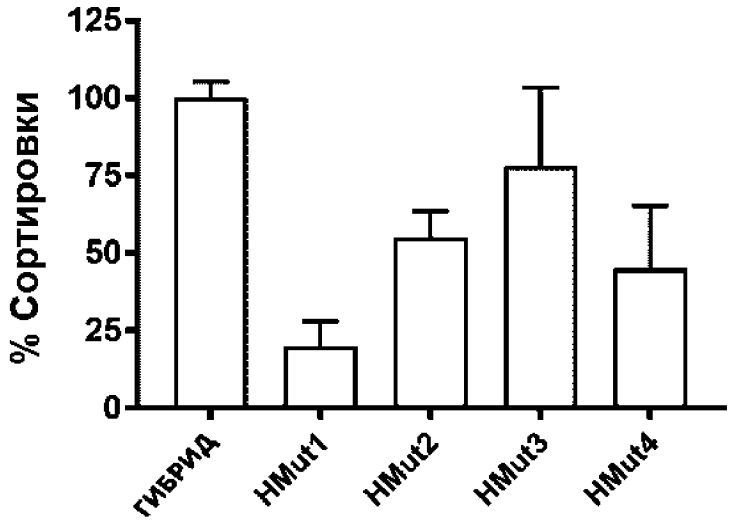
MDA-MB-231 мотивы in silico

BM1	CCGCAAGUGGC	SEQ ID NO:282
BM1t	AAGUGGC	
BM2	AUCUUGUGGUC	SEQ ID NO:283
BM2t	CUUGUGGU	
BM3	GUGGUUGUGC	SEQ ID NO:284
BM3-4t	UGUGC	
BM4	GUGUGGUGUGC	SEQ ID NO:285
BM5	GCGACGUGG	
BM6	ACUCGAGUGGC	SEQ ID NO:286
BM7	CCCCACAGCAGU	SEQ ID NO:287
BM12	UGGCGUGUGGCU	SEQ ID NO:288
ГИБРИД	AAGUGGCGUG	SEQ ID NO:289

Фигура 19 (продолжение)

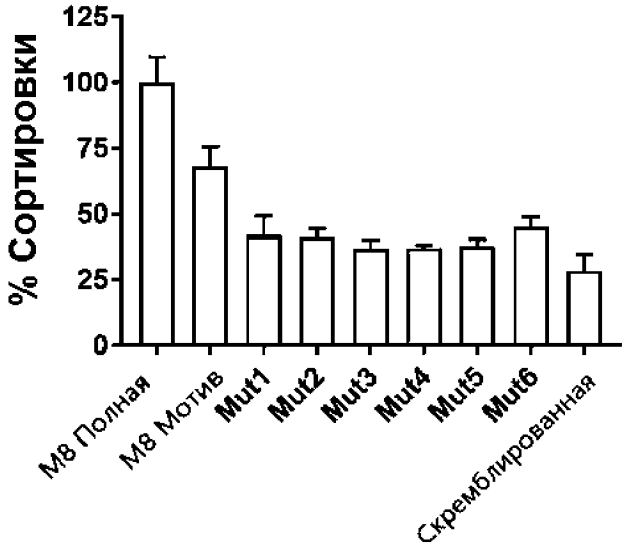

mCherry мРНК
mCherry мРНК, содержащая ЭКЗО-код
Кратность изменения
100
10
1
20 нг
200 нг
2000 нг

Фигура 20



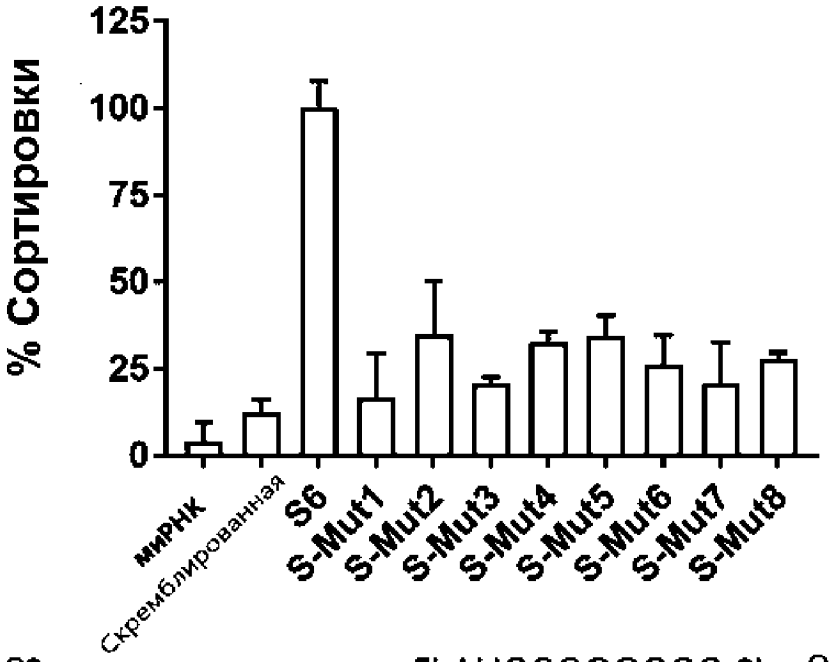
ГИБРИД	5'-AAGUGGCGUG-3'	SEQ ID NO:290
H-Mut1:	5'-AAG**A**GGCGUG-3'	SEQ ID NO:291
H-Mut2:	5'-AAGU**C**GCGUG-3'	SEQ ID NO:292
H-Mut3:	5'-AAGUG**C**CGUG-3'	SEQ ID NO:293
H-Mut4:	5'-AAGUGG**A**GUG-3'	SEQ ID NO:294

Фигура 21



M8 Полная	5'-CCGGGCGUAUCUUGUGGUCG-3'	SEQ ID NO:295
M8 Мотив:	5'-AUCUUGUGGUC-3'	SEQ ID NO:296
Скремблированная	5'-GUGCUUCUGUA-3'	SEQ ID NO:297
Mut1:	5'-AU**G**UUGUGGUC-3'	SEQ ID NO:298
Mut 2:	5'-AUCUU**C**UGGUC-3'	SEQ ID NO:299
Mut 3:	5'-AUCUUG**A**GGUC-3'	SEQ ID NO:300
Mut 4:	5'-AUCUUGU**C**GUC-3'	SEQ ID NO:301
Mut 5:	5'-AUCUUGUG**C**UC-3'	SEQ ID NO:302
Mut 6:	5'-AUCUUGUGG**A**C-3'	SEQ ID NO:303

Фигура 22



S6:	5'-AUGCGGGGGC-3'	SEQ ID NO:304
Скремблированная:	5'-GGUCGGACGG-3'	SEQ ID NO:305
S-Mut1:	5'-**U**UGCGGGGGC-3'	SEQ ID NO:306
S-Mut2:	5'-A**A**GCGGGGGC-3'	SEQ ID NO:307
S-Mut3:	5'-AU**C**CGGGGGC-3'	SEQ ID NO:308
S-Mut4:	5'-AUG**G**GGGGGC-3'	SEQ ID NO:309
S-Mut5:	5'-AUGC**C**GGGGC-3'	SEQ ID NO:310
S-Mut6:	5'-AUGCG**C**GGGC-3'	SEQ ID NO:311
S-Mut7:	5'-AUGCGG**C**GGC-3'	SEQ ID NO:312
S-Mut8:	5'-AUGCGGG**C**GC-3'	SEQ ID NO:313

Фигура 23