

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090474 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.11

(22) Дата подачи заявки
2018.08.24

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) ИЗГОТОВЛЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЭКЗОСОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ
МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/550,543; 62/656,956

(32) 2017.08.25; 2018.04.12

(33) US

(86) PCT/US2018/048026

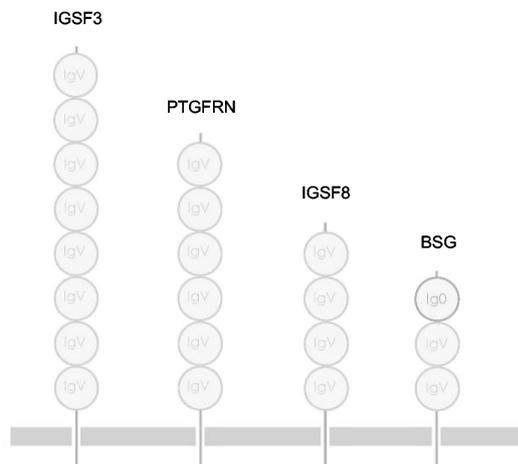
(87) WO 2019/040920 2019.02.28

(71) Заявитель:
КОДИАК БАЙОСАЙЕНСЕС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Дули Кевин П., Харрисон Рэйн А.,
Макконнелл Расселл Е., Сюй Кэ, Хоуд
Дэмиан, Росс Никки, Хаупт Соня,
Калмэн Джон Д., Уилльямс Дуглас Е.
(US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Глухарёва А.О., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев
В.В., Парамонова К.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения терапевтической экзосомы с использованием впервые идентифицированного белка, которым должна быть обогащена поверхность экзосом. В частности, настоящее изобретение предлагает способы использования белков для аффинной очистки экзосом. Изобретение также представляет способы локализации терапевтического пептида на экзосомах и нацеливания экзосом на конкретный орган, ткань или клетку с использованием белков. Способы включают создание экзосом со сконструированной поверхностью, которые включают один или несколько экзосомных белков с более высокой плотностью, или вариант, или фрагмент экзосомного белка.



202090474
A1

202090474
A1

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЭКЗОСОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

0. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0000] Рассматриваемая в настоящий момент заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 22 августа 2018 года, называется 40714PCT_CRF_sequencelisting.txt и имеет размер 175 092 байта.

1. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Экзосомы являются важными медиаторами межклеточной коммуникации. Они также являются важными биомаркерами в диагностике и прогнозе многих заболеваний, таких как рак. В качестве средств доставки лекарственных веществ экзосомы предлагают много преимуществ по сравнению с традиционными способами доставки лекарственных веществ, представляя новый способ лечения во многих терапевтических областях.

[0002] Использование экзосом в терапевтических целях требует, чтобы экзосомы не содержали или в основном не содержали примесей, включая, но не ограничиваясь ими, загрязняющие белки, ДНК, углеводы и липиды. Современные способы очистки не обеспечивают достаточной селективности для удаления значительных количеств этих примесей, поэтому для улучшения чистоты требуются дополнительные процессы.

[0003] Кроме того, поскольку экзосомы все чаще используются при лечении заболеваний человека, могут возникать трудности с удовлетворением клинических ожиданий из-за неоднородности их физико-химических параметров, которые обеспечивают молекулярное нацеливание, уклонение от иммунного надзора и контролируемое высвобождение лекарственного вещества. Это происходит главным образом из-за неоднородности и сложности свойств экзосом (*например*, состава, размера, формы, жесткости, поверхностного заряда, гидрофильности, стабильности, а также типа и плотности лиганда), свойств полезной нагрузки (*например*, типа лекарственного вещества, растворимости, загрузки, активности, дозировки, иммунного ответа и кинетики высвобождения) и физиологических барьеров *in vivo* для переноса экзосом (*например*, иммунного надзора, экстравазации частиц, нацеливания на ткани, проникновения в ткани и поглощения клеток). Были предприняты значительные усилия, однако эффективные способы получения отдельных субпопуляций терапевтических экзосом с желаемыми свойствами, *например*,

экзосом, содержащих терапевтическую нагрузку и имеющих подходящие нацеливающие фрагменты, пока еще не доступны.

[0004] Подходящие способы генерации, выделения и очистки отдельных субпопуляций экзосом необходимы для лучшего обеспечения терапевтического использования и других применений технологий на основе экзосом.

2. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Аспект настоящего изобретения относится к новым способам изготовления экзосом для терапевтического применения. В частности, в данных способах используется обогащение поверхности экзосомы впервые идентифицированными поверхностными маркерами. В частности, группа белков (*например*, отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN); базигин (BSG); член суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2); член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3); член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8); интегрин бета-1 (ITGB1), интегрин альфа-4 (ITGA4), тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2) и класс белков-переносчиков АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4)) была идентифицирована как белки, которые в больших количествах находятся на поверхности экзосом.

[0006] Впервые идентифицированные белки могут быть использованы в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. Один аспект настоящего изобретения относится к генерации гибридного белка путем конъюгирования впервые идентифицированного экзосомного белка и терапевтического белка, и получения сконструированной экзосомы, содержащей гибридный белок на поверхности. Нативный полноразмерный или биологически активный фрагмент терапевтического белка может быть перенесен на поверхность экзосом путем конъюгирования с белками, обогащенными экзосомами. Способ, использующий впервые идентифицированные экзосомные белки, как предоставлено в настоящем документе, показывает лучшие результаты при получении поверхностно сконструированных экзосом, чем способы, использующие некоторые другие экзосомные каркасные белки, известные в данной области (*например*, Lamp2B, PDGFR, лактадхерин CD9, CD63 и/или CD81, или их фрагменты). Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что впервые идентифицированные белки лучше, потому что некоторые из каркасных белков экзосом, известных в данной области техники, *то есть* тетраспаниновые белки, такие как CD9, CD63 и CD81, имеют оба конца, С- и N-, в просвете экзосомы.

[0007] Другой аспект настоящего изобретения относится к очистке экзосомы путем аффинной очистки из гетерогенного раствора, такого как среда для культивирования клеток или плазма, с использованием экзосомных белков, которые являются общими для всех экзосом или общими для всех экзосом, полученных из одного типа клеток. Некоторые варианты осуществления относятся к выделению субпопуляции экзосом из пула экзосом с использованием поверхностных маркеров, специфических для субпопуляции экзосом.

[0008] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам удаления экзосом из образца, когда экзосомы являются загрязняющим продуктом. Например, природные или сконструированные вирусы могут быть очищены от загрязняющих экзосом. Таким образом, описанные в данном документе экзосомные белки могут быть использованы для селективного удаления экзосом из биологических процессов, где другие частицы сходного размера, формы и/или заряда являются желательным продуктом.

[0009] Другой аспект настоящего изобретения относится к получению или применению поверхностно-сконструированной экзосомы, предназначенной для более эффективной аффинной очистки или для презентации нацеливающего фрагмента или терапевтически релевантного белка на поверхности. Например, поверхности экзосом могут быть модифицированы для удержания на поверхности нативных полноразмерных экзосомных белков и/или фрагментов или модифицированных белков нативного экзосомного белка с более высокой плотностью.

[0010] Настоящее изобретение, кроме того, относится к клетке-продуценту или способу генерации клетки-продуцента для выработки такой поверхностно-сконструированной экзосомы. Экзогенный полинуклеотид может быть временно или стабильно введен в клетку-продуцент, чтобы заставить клетку-продуцент вырабатывать поверхностно-сконструированную экзосому.

[0011] В частности, аспект настоящего изобретения относится к способу выделения экзосомы, содержащему стадии: (1) предоставление образца, содержащего экзосому; (2) приведение в контакт образца со связывающим агентом, обладающим аффинностью к целевому белку, где целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант; и (3) выделение экзосомы на основе связывания между целевым белком и связывающим агентом.

[0012] В некоторых вариантах осуществления образец получают из клетки, выращенной *in vitro*, клетка необязательно представляет собой клетку HEK293, клетку яичника китайского

хомячка (CHO) или мезенхимальную стволовую клетку (MSC). В некоторых вариантах осуществления образец получают из жидкости организма субъекта.

[0013] В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии целевого белка. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экспрессионную плазмиду, кодирующую целевой белок. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для включения экзогенной последовательности, экспрессирующей метку, имеющую аффинность к связывающему агенту, причем экзогенная последовательность встраивается в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце эндогенной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность не кодирует IGSF8. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный в эндогенной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.

[0014] В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий метку и транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит целевой белок. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не является IGSF8 или его фрагментом или модификацией. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для снижения экспрессии ADAM10.

[0015] В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит целевой белок. В некоторых вариантах осуществления целевой белок выбран из транспортера АТФ и PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит фрагмент или вариант транспортера АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант, и аффинную метку, где аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или модификации.

[0016] В некоторых вариантах осуществления связывающий агент включает иммуноглобулин, белок, пептид или небольшую молекулу. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент прикреплен к твердой подложке, причем необязательно твердая подложка содержит пористую агарозную гранулу, микротитровальный планшет, магнитную гранулу, или мембрану.

[0017] В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.

[0018] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно содержит стадии: (1) приведение в контакт подмножества образца с другим связывающим агентом, обладающим аффинностью к другому целевому белку; и (2) выделение экзосомы на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления другой целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8 или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления другой целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33.

[0019] Другой аспект настоящего изобретения относится к экзосоме, полученной способами, представленными в настоящем документе.

[0020] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей экзосому по настоящему изобретению и наполнитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более низкую концентрацию макромолекул, чем образец, содержащий источник экзосом, где макромолекулами являются нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит макромолекул.

[0021] Другой аспект настоящего изобретения относится к экзосоме, содержащей целевой белок, где по меньшей мере часть целевого белка экспрессируется из экзогенной последовательности, и целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33.

[0022] В некоторых вариантах осуществления экзосома выделяется на основе связывания между целевым белком и связывающим агентом.

[0023] В некоторых вариантах осуществления экзосому получают из клетки, генетически модифицированной для включения экзогенной последовательности, где клетка необязательно представляет собой клетку HEK293, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или мезенхимальную стволовую клетку (MSC). В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для снижения экспрессии ADAM10.

[0024] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.

[0025] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце геномной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность не кодирует IGSF8.

[0026] В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, или его фрагмент или вариант, и аффинную метку, где аффинная метка имеет аффинность связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

[0027] В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант, и терапевтический пептид. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

[0028] Терапевтический пептид может быть выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. Терапевтическое соединение может быть выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.

[0029] Терапевтический пептид может представлять собой антитело или его фрагмент или вариант. Терапевтический пептид может представлять собой фермент, лиганд, рецептор или его фрагмент или вариант. Терапевтический пептид может представлять собой антибактериальный пептид или его фрагмент или вариант.

[0030] В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант, и нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть специфичным для органа, ткани или клетки. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

[0031] В некоторых вариантах осуществления экзосома дополнительно содержит второй, другой целевой белок, где другой целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления экзосома выделяется на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

[0032] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей экзосому по настоящему изобретению и наполнитель.

[0033] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по существу не содержат макромолекул, где макромолекулы выбраны из нуклеиновых кислот, загрязняющих белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.

[0034] В одном аспекте настоящее изобретение направлено на клетку для выработки представленной в данном документе экзосомы.

[0035] В частности, некоторые варианты осуществления относятся к клетке для выработки экзосом, содержащей экзогенную последовательность, вставленную в геномную последовательность, кодирующую транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, где экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют гибридный белок. В некоторых вариантах геномная последовательность не кодирует IGSF8.

[0036] Экзогенная последовательность может кодировать аффинную метку.

[0037] Экзогенная последовательность может кодировать терапевтический пептид. Терапевтический пептид может быть выбран из группы, состоящей из природного пептида,

рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. Терапевтическое соединение может быть выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул. Терапевтический пептид может представлять собой антитело или его фрагмент или вариант. Терапевтический пептид может представлять собой фермент, лиганд, рецептор или его фрагмент или вариант. Терапевтический пептид может представлять собой антибактериальный пептид или его фрагмент или вариант.

[0038] Экзогенная последовательность может кодировать нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть специфичным для органа, ткани или клетки.

[0039] В некоторых вариантах осуществления клеточная линия генетически модифицирована для получения пониженной экспрессии ADAM10.

[0040] В одном аспекте настоящее изобретение относится к экзосоме, полученной из линии клеток по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления экзосома включает гибридный белок на поверхности с более высокой плотностью по сравнению с другим гибридным белком на поверхности другой экзосомы, где другая экзосома вырабатывается из другой клеточной линии, содержащей экзогенную последовательность, вставленную в другую геномную последовательность, кодирующую обычный экзосомный белок, где экзогенная последовательность и другая геномная последовательность кодируют другой гибридный белок. В некоторых вариантах осуществления обычный экзосомный белок выбран из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.

[0041] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу выделения неэкзосомного материала, включающему стадии: обеспечения образца, содержащего экзосому и неэкзосомный материал; приведения в контакт образца со связывающим агентом, обладающим аффинностью к целевому белку, где целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант, индуцируя тем самым связывание экзосомы со связывающим агентом ; и выделение неэкзосомного материала.

[0042] В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой вирус или белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой лентивирус, ретровирус, аденоассоциированный вирус или другой вирус с оболочкой или без оболочки. В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой

рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения изолированный неэкзосомный материал по существу не содержит экзосом.

[0043] В некоторых вариантах осуществления целевой белок дополнительно содержит аффинную метку, где аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент включает иммуноглобулин, белок, пептид или небольшую молекулу. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент прикреплен к твердой подложке, причем необязательно твердая подложка содержит пористую агарозную гранулу, микротитровальный планшет, магнитную гранулу, или мембрану. В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.

[0044] В некоторых вариантах осуществления способы очистки, описанные в настоящем документе, используются для очистки нановезикул. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, направлены на нановезикулы.

3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0045] Фигуры изображают различные варианты осуществления настоящего изобретения только в целях иллюстрации. Специалист в данной области техники легко поймет из последующего обсуждения, что альтернативные варианты осуществления структур и способов, проиллюстрированных в данном документе, могут использоваться без отступления от принципов изобретения, описанных в данном документе.

[0046] **На фигуре 1** представлено изображение градиента плотности Optiprep™, содержащего образец, после ультрацентрифугирования. Скобками помечены верхняя фракция, содержащая экзосомы («Top»), средняя фракция, содержащая клеточный дебрис («Middle») и нижняя фракция, содержащая агрегаты высокой плотности и клеточный дебрис («Bottom»).

[0047] **На фигуре 2** представлен точечный график, показывающий белки, идентифицированные в верхней фракции (ось Y), и белки, идентифицированные в нижней фракции (ось X) ультрацентрифугирования Optiprep™. Белки, нанесенные над пунктирной линией, представляют собой белки которыми обогащены экзосомы, тогда как белки,

расположенные ниже пунктирной линии, представляют белки, не специфичные для экзосом.

[0048] **На фигуре 3** представлена карта покрытия триптического пептида PTGFRN (SEQ ID NO: 1).

[0049] **На фигуре 4** представлена карта покрытия триптического пептида IGSF8 (SEQ ID NO: 14).

[0050] **На фигуре 5** представлена карта покрытия триптического пептида Basigin (BSG) (SEQ ID NO: 9).

[0051] **На фигуре 6А** показана картина белкового блоттинга общего клеточного лизата (слева) и очищенных экзосомных популяций (справа), собранных из клеток НЕК293. **На фигуре 6В** показан результат вестерн-блоттинга геля, представленного на фигуре 6А, с антителом к PTGFRN. Полоса, обнаруженная в правом столбце, соответствует полосе при ~ 110 кДа на фигуре 6А.

[0052] **На фигуре 7А** представлен блоттинг белка из двенадцати фракций, собранных после очистки с использованием самоформирующихся градиентов Optiprep™. **На фигуре 7В** представлен результат вестерн-блоттинга геля, представленного на фигуре 7А, с антителами к ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF3, IGSF8, Basigin, Alix или Syntenin. Каждый из новых белков поверхности экзосом (ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, Basigin) обнаруживается в тех же фракциях, что и известные белки-маркеры экзосом (Alix, Syntenin).

[0053] **На фигуре 8** представлены белки поверхности экзосом (ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, BSG), которые используются для различных вариантов осуществления настоящего изобретения, например, для нацеливания гибридного белка на поверхности экзосомы или в качестве мишени для аффинной очистки экзосомы.

[0054] **На фигуре 9А** представлена структура PTGFRN с идентификацией границ доменов IgV (стрелки) и GFP, гибридизированных с С-концом PTGFRN. **На фигуре 9В** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу экзосом, выделенных из клеточной культуры, сверхэкспрессирующей различные гибридные белки GFP-PTGFRN. Гибридные белки GFP-PTGFRN были обнаружены с использованием антитела к GFP.

[0055] **На фигуре 10** представлена гелевая картина, показывающая суммарные белки очищенных экзосом, выделенных из клеток, сверхэкспрессирующих различные гибридные белки GFP-PTGFRN.

[0056] **На фигуре 11А** представлена структура PTGFRN с идентификацией границ доменов IgV (стрелки) и FLAG, гибридных с N-концом PTGFRN. **На фигуре 11В** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу экзосом, выделенных из клеточной культуры, сверхэкспрессирующей различные гибридные белки FLAG-PTGFRN. Гибридные белки GFP-PTGFRN были обнаружены с использованием антитела к метке FLAG.

[0057] **На фигуре 12А** представлена гелевая картина, показывающая суммарные белки очищенных экзосом, выделенных из клеток дикого типа (ADAM10 +) или клеток, нокаутных по ADAM10 (ADAM10-), причем каждая клетка экспрессирует гибридный белок GFP, содержащий полноразмерный PTGFRN (PTGFRN-GFP) или усеченный PTGFRN (PTGFRN_IgV3-GFP). **На фигуре 12В** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу образцов с фигуры 12А с использованием антитела к ADAM10. **На фигуре 12С** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу образцов с фигуры 12А с использованием антитела к GFP.

[0058] **На фигуре 13** представлена структура гибридного белка, содержащего PTGFRN, в котором отсутствуют пять из шести доменов IgV (PTGFRN_IgV6), метка FLAG и белок-партнер слияния.

[0059] **На фигуре 14А** представлены последовательности PTGFRN_IgV6 (№ 451) (SEQ ID NO: 42) и серийные укороченные мутанты PTGFRN_IgV6, лишенные четырех (№ 452) (SEQ ID NO: 43), восьми (№ 453) (SEQ ID NO: 44) или двенадцати (№ 454) (SEQ ID NO: 45) дополнительных аминокислот. **На фигуре 14В** представлена гелевая картина, показывающая суммарные белки очищенных экзосом, выделенных из клеток, сверхэкспрессирующих гибридный белок № 451, 452, 453 или 454. **На фигуре 14С** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу образца, представленного на фигуре 14В, с использованием антитела к FLAG.

[0060] **На фигуре 15** представлены сигналы флуоресценции GFP, обнаруженные у экзосом, выделенных из клеток, сверхэкспрессирующих различные гибридные белки GFP — гибридные белки GFP содержат GFP, гибридный с люминальной стороной часто

используемого каркаса pDisplay (рецептор PDGF), PalmPalm (последовательность пальмитоилирования), CD81 или полноразмерного PTGFRN (FL) или PTGFRN_454 (sIgV).

[0061] **На фигуре 16А** представлена структура гибридного белка, содержащего IGSF8 и GFP, гибридизированного с С-концом IGSF8. **На фигуре 16В** представлена гелевая картина, показывающая суммарные белки экзосом, выделенных из нетрансфицированных клеток НЕК293 (нативных) или клеток НЕК, стабильно трансфицированных конструкцией, кодирующей гибридный белок IGFS8-GFP. **На фигуре 16В** в нижней части также представлена гелевая картина подвергнутого вестерн-блоттингу образца с антителом к GFP.

[0062] **На фигуре 17** представлены сигналы флуоресценции GFP, обнаруженные у экзосом, выделенных из клеток, сверхэкспрессирующих различные гибридные белки GFP — гибридные белки GFP содержат GFP, гибридизированный с люминальной стороной часто используемого каркаса pDisplay (рецептор PDGF), CD81, полноразмерного IGSF8 или полноразмерного PTGFRN (FL) или PTGFRN_454 (sIgV).

[0063] **На фигуре 18** представлена структура гибридного белка, содержащего внеклеточный домен (ECD) PTGFRN, эндогенный сигнальный пептид на N-конце (SP), сайт расщепления PAR1 и домен Fc на С-конце. На фигуре 18 представлена SEQ ID NO: 46.

[0064] **На фигуре 19А** представлен результат гель-фильтрационной хроматографии очищенного ECD PTGFRN в ФСБ с pH 7,4 с использованием колонки Superdex 200 (Millpore Sigma) при УФ-флуоресценции с длиной волны 280 нм. **На фигуре 19В** представлена гелевая картина SDS-PAGE с помощью гель-фильтрационной хроматографии элюата, содержащего очищенный ECD PTGFRN.

[0065] **На фигуре 20А** представлены результаты эксклюзионной хроматографии по размеру / многоугольного рассеяния света (SEC-MALS) для ECD PTGFRN, антитела к VLA4 и BSA. **На фигуре 20В** представлены результаты эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) ECD PTGFRN в отсутствие хлорида гуанидия (GuHCl) или в присутствии 1М или 2М хлорида гуанидиния (GuHCl). Указаны пики, представляющие мономер или димер PTGFRN.

[0066] **На фигуре 21** представлены три верхних пика, идентифицированных как партнеры по связыванию эктодомена PTGFRN в анализе связывания при pH 7,4 (вверху), и первые пять пиков, идентифицированных в анализе связывания при pH 5,6 (внизу).

[0067] **На фигуре 22** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между PTGFRN и LGALS1 в присутствии возрастающих концентраций LGALS1.

[0068] **На фигуре 23** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между PTGFRN и LGALS1 в присутствии возрастающих концентраций лактозы.

[0069] **На фигуре 24** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между PTGFRN и антителом к CD315 в присутствии возрастающих концентраций антитела к CD315.

[0070] **На фигуре 25** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между антителом к CD315 и нативными экзосомами в присутствии возрастающих концентраций нативных экзосом, выделенных из HEK293.

[0071] **На фигуре 26** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между антителом к CD315 и экзосомами, модифицированными для сверхэкспрессии PTGFRN (экзосомы PTGFRN ++) в присутствии возрастающих концентраций модифицированных экзосом.

[0072] **На фигуре 27** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для сравнения взаимодействия между антителом к CD315 и нативными экзосомами или между антителом к CD315 и модифицированными экзосомами, сверхэкспрессирующими PTGFRN (PTGFRN ++).

[0073] **На фигуре 28** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между антителом к CD315 и полноразмерным PTGFRN или между антителом к CD315 и серией усеченных мутантов PTGFRN.

[0074] **На фигуре 29А** представлена гелевая картина, показывающая биотинилированные белки *in vivo*, включая усеченные мутанты рекомбинантного PTGFRN, выделенного из трансфицированных клеток HEK, и очищенные экзосомы из клеток HEK293. **На фигуре 29В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга образца с фигуры 29А с использованием объединенных поликлональных антител к PTGFRN.

[0075] **На фигуре 30** представлены результаты биослойной интерферометрии (BLI) для изучения взаимодействия между поликлональными антителами к PTGFRN и различными укороченными мутантами PTGFRN.

[0076] **На фигуре 31** представлено количество совпадений спектра пептидов (PSM) поверхностных белков (PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 и CD9) у экзосом, очищенных от различных клеточных линий различного происхождения (HEK293SF, почка; HT1080, соединительная ткань; K562, костный мозг; MDA-MB-231, грудь; Raji, лимфоцит; мезенхимальная стволовая клетка (MSC), костный мозг).

[0077] **На фигуре 32А** представлена гелевая картина, показывающая экзосомы нативного и нокаутного (КО) PTGFRN. **На фигуре 32В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга образцов, представленных на фигуре 32А, с использованием объединенных поликлональных антител к PTGFRN.

[0078] **На фигуре 33** представлен график рассеяния совпадений спектра пептидов (PSM) из очищенных нативных (ось Y) и PTGFRN КО (ось X) экзосом.

[0079] **На фигуре 34** представлены результаты BLI для изучения взаимодействия между моноклональным антителом к CD315 и нативными, PTGFRN ++ и PTGFRN КО-экзосомами.

[0080] **На фигуре 35А** представлено изображение полиакриламидного геля из экзосомной очистки *in vitro* нативных и нокаутированных по PTGFRN (КО) экзосом с использованием иммобилизованного моноклонального антитела к PTGFRN. **На фигуре 35В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга образцов, представленных на фигуре 35А, с использованием антитела к PTGFRN.

[0081] **На фигуре 36А** представлена картина полиакриламидного геля с обработкой нативных экзосом или модифицированных экзосом, сконструированных для экспрессии PTGFRN-BDDFIII. **На фигуре 36В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга образцов, представленных на фигуре 36А, с использованием антител к CD81 (вверху) или антител к FVIII (внизу).

[0082] **На фигуре 37А** представлена фотография полиакриламидного геля с обработкой нативных экзосом или модифицированных экзосом, сконструированных для экспрессии XTEN-PTGFRN-GFP. **На фигуре 37В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга образцов, представленных на фигуре 37А, с использованием антител ALIX (вверху) или антител GFP (внизу).

[0083] **На фигуре 38** представлен график, показывающий процент GFP-положительных частиц (черные столбцы, левая ось y) и средней интенсивности флуоресценции (серые

столбцы, правая ось y) у четырех различных групп экзосом — модифицированных экзосом, сконструированных для экспрессии (i) CD9 -GFP, (ii) CD81-GFP или (iii) PTGFRN-GFP, или (iv) немодифицированных нативных экзосом.

[0084] **На фигуре 39** представлена интенсивность флуоресценции GFP (FU) модифицированных экзосом, экспрессирующих гибридный белок GFP, содержащий нативный PTGFRN (PTGFRN-GFP), усеченный PTGFRN (454-PTGFRN-GFP) с собственным сигнальным пептидом или усеченный PTGFRN (454-PTGFRN-GFP) с синтетическим сигнальным пептидом из DsbA11.

[0085] **На фигуре 40А** показана структура гибридного белка, состоящего из одноцепочечного Fab, распознающего лектин CLEC9A, полноразмерного PTGFRN, GFP и метки FLAG. **На фигуре 40В** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга экзосом, очищенных посредством Ортіргер™, с использованием антител к ALIX (вверху) или антител к GFP (внизу).

[0086] **На фигуре 41** представлены результаты BLI для изучения взаимодействия между CLEC9A-Fc и экзосомами, модифицированными для экспрессии гибридного белка, состоящего из одноцепочечного Fab, распознающего лектин CLEC9A, полноразмерного PTGFRN, GFP и метки FLAG («αCLEC9A-PTGFRN»).

[0087] **На фигуре 42** представлена гелевая картина вестерн-блоттинга экзосом, очищенных из клеток HEK293SF («HEK») или MSC («MSC») антителами к PTGFRN, ALIX, TSG101, CD63, CD9 или CD81.

[0088] **На фигуре 43А** представлена картина полиакриламидного геля с обработкой экзосом, очищенных от нетрансфицированных клеток HEK, клеток HEK, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей полноразмерный PTGFRN, гибридизированный с меткой FLAG («плазида PTGFRN-FLAG»), нетрансфицированных клеток CHO или клеток CHO, трансфицированных плазмидой PTGFRN-FLAG. **На фигуре 43В** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу образцов с фигуры 43А с использованием антитела к PTGRN. **На фигуре 43С** представлена гелевая картина подвергнутых вестерн-блоттингу образцов с фигуры 43А с использованием антитела к метке FLAG.

[0089] **На фигурах 44А-В** показана экспериментальная система для тестирования загрузки грузового белка в просвет экзосомы с использованием CD9 (фиг. 44А) или PTGFRN (фиг. 44В). **На фигуре 44А** показана клетка, экспрессирующая CD9, гибридизированный с

GFP, меткой FLAG и FKBP, который может взаимодействовать с mCherry, гибридным с меткой V5 и FKBP в присутствии рапамицина. **На фигуре 44B** показана клетка, экспрессирующая PTGFRN, гибридный с GFP, меткой FLAG и FKBP, который может взаимодействовать с mCherry, гибридным с меткой V5 и FKBP в присутствии рапамицина.

[0090] **На фигуре 45A** представлена картина полиакриламидного геля с обработкой экзосом, очищенных из образцов клеточной культуры, представленных на фигуре 44A (CD9) или фигуре 44B (PTGFRN) (вверху). На фигуре также представлены результаты вестерн-блоттинга с использованием антитела к FLAG (α Flag) или V5 (α V5) (внизу). **На фигуре 45B** представлены интенсивности полос для FLAG и V5 из вестерн-блоттинга на фигуре 45A, измеренные денситометрией и нормированные по количеству собранных экзосом.

4. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

4.1. Определения

[0091] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение изобретение. В контексте данного документа, следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже.

[0092] Используемый в данном документе термин «**внеклеточная везикула**» или «**EV**» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы включают все связанные с мембраной везикулы, которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. Обычно внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различные макромолекулярные грузы, которые могут находиться во внутреннем пространстве, располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. Указанный груз может содержать нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В качестве примера и без ограничения внеклеточные везикулы включают апоптотические тела, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым или косвенным воздействием (*например*, путем серийного выдавливания или обработки щелочными растворами), пузырьковые органеллы и везикулы, продуцируемые живыми клетками (*например*, прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной).

Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов и/или культивируемых клеток.

[0093] Используемый в данном документе термин «**экзосома**» относится к полученному из клетки небольшому (диаметром от 20 до 300 нм, более предпочтительно от 40 до 200 нм) пузырьку, содержащему мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая генерируется из указанной клетки прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной. Экзосома содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например*, терапевтический агент), приемник (*например*, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (*например*, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (*например*, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. Экзосома — это вид внеклеточного пузырька. Обычно производство/биогенез экзосом не приводит к разрушению клетки-продуцента.

[0094] Используемый в данном документе термин «**нановезикула**» относится к маленькому (диаметром от 20 до 250 нм, более предпочтительно от 30 до 150 нм) клеточному пузырьку, содержащему мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая генерируется из указанной клетки путем прямой или косвенной манипуляции, так что указанная нановезикула не будет произведена указанной клеткой-продуцентом без указанной манипуляции. Подходящие манипуляции с указанной клеткой-продуцентом включают, но не ограничиваются ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. Производство нановезикул в некоторых случаях может привести к разрушению указанной клетки-продуцента. Предпочтительно, популяции нановезикул по существу не содержат везикул, которые получены из клеток-продуцентов путем прямого отщепления от плазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с плазматической мембраной. Нановезикула содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например*, терапевтический агент), приемник (*например*, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (*например*, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (*например*, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Сразу после получения нановезикулы из клетки-продуцента в соответствии с указанными манипуляциями, она может быть выделена из клетки-продуцента на основе ее размера,

плотности, биохимических параметров или их комбинации. Нановезикула — это вид внеклеточного пузырька.

[0095] Используемый в данном документе термин «**поверхностно-сконструированная экзосома**» относится к экзосоме с мембраной с модифицированным составом. Например, мембрана имеет модифицированный по своему составу белок, липид, небольшую молекулу, углевод и *т. д.* Композиция может быть изменена химическим, физическим или биологическим способом или получена из клетки, предварительно или одновременно модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной генной инженерией.

[0096] Используемый в данном документе термин «**модификация**» белка относится к белку, имеющему по меньшей мере 15% идентичность с немутантной аминокислотной последовательностью белка. Модификация белка включает фрагмент или вариант белка. Модификация белка может дополнительно включать химическую или физическую модификацию фрагмента или варианта белка.

[0097] Используемый в данном документе термин «**фрагмент**» белка относится к белку с удалениями на N- и/или C-конце по сравнению с природным белком. Предпочтительно фрагмент транспортера АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 сохраняет способность специфически нацеливаться на экзосомы. Такой фрагмент также называют «**функциональным фрагментом**». Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом в данном смысле, можно выполнить любыми известными в данной области способами определения содержания белка в экзосомах, включая вестерн-блоты, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, *например*, такими как GFP. В конкретном варианте осуществления фрагмент транспортера АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% способностей встречающихся в природе транспортеров АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 для специфической нацеливания на экзосомы.

[0098] Используемый в данном документе термин «**вариант**» белка относится к белку, который разделяет определенную идентичность аминокислотной последовательности с другим белком при выравнивании способом, известным в данной области. Вариант белка может включать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или перестановку в другой белок. В конкретном варианте осуществления вариант представляет собой вариант, имеющий по

меньшей мере 70% идентичности с транспортером АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или фрагментом транспортера АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов PTGFRN имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с PTGFRN в соответствии с SEQ ID NO: 1 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов BSG имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с BSG в соответствии с SEQ ID NO: 9 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов IGSF2 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF2 в соответствии с SEQ ID NO: 34 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов IGSF3 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF3 в соответствии с SEQ ID NO: 20 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов IGSF8 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF8 в соответствии с SEQ ID NO: 14 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов ITGB1 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ITGB1 в соответствии с SEQ ID NO: 21 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов ITGA4 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ITGA4 в соответствии с SEQ ID NO: 22 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов SLC3A2 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SLC3A2 в соответствии с SEQ ID NO: 23 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов ATP1A1 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1A1 в соответствии с SEQ ID NO: 24 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов ATP1A2 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1A2 в соответствии с SEQ ID NO: 25 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов ATP1A3 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1A3 в соответствии с SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты

фрагментов АТР1А4 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР1А4 в соответствии с SEQ ID NO: 27 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов АТР1В3 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР1В3 в соответствии с SEQ ID NO: 28 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов АТР2В1 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР2В1 в соответствии с SEQ ID NO: 29 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов АТР2В2 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР2В2 в соответствии с SEQ ID NO: 30 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов АТР2В3 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР2В3 в соответствии с SEQ ID NO: 31 или ее функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях варианты или варианты фрагментов АТР2В4 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР2В4 в соответствии с SEQ ID NO: 32 или ее функциональным фрагментом. В каждом из вышеупомянутых случаев предпочтительно, чтобы вариант или вариант фрагмента сохранял способность специфически нацеливаться на экзосомы.

[0099] Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48: 443 (1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31 (1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73: 15 237-44 (1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5: 151-3 (1989) Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16: 10881-90 (1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8: 155-65 (1992); and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24: 307-31 (1994). The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Altschul 20 et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-10 (1990)] и доступны из нескольких источников, включая Национальный центр биологической информации (NCBI, Bethesda, Md.) и в Интернете, для использования в связи с программами анализа последовательностей blastp, blastm, blastx, tblastn и tblastx. BLAST и описание того, как определить идентичность последовательности с помощью программы, можно найти на официальном сайте NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) при NIH (Национальный институт здравоохранения).

[00100] Упоминание любого белка, представленного в настоящем документе, охватывает функциональный вариант белка. Термин «**функциональный вариант**» белка относится к варианту белка, который сохраняет способность специфически нацеливаться на экзосомы.

[00101] Используемый в данном документе термин «**клетка-продуцент**» относится к клетке, используемой для создания экзосомы. Клетка-продуцент может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro*, или клетку *in vivo*. Клетка-продуцент включает, но не ограничивается этим, клетку, о которой известно, что она эффективна в создании экзосом, *например* клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) и мезенхимальные стволовые клетки (MSC).

[00102] Используемый в данном документе термин «**целевой белок**» относится к белку, который может быть нацелен на поверхность экзосомы. Целевой белок может быть немутантным белком, который естественным образом нацелен на экзосомную мембрану, или фрагментом или вариантом немутантного белка. Целевой белок может представлять собой гибридный белок, содержащий FLAG-метку, терапевтический пептид, нацеливающий фрагмент или другой пептид, присоединенный к немутантному белку или варианту или фрагменту немутантного белка. Целевой белок может содержать трансмембранный белок, цельный белок, периферический белок или растворимый белок, присоединенный к мембране с помощью линкера.

[00103] Используемый в данном документе термин «**загрязняющий белок**» относится к белку, который не связан с экзосомой. Например, загрязняющий белок включает белок, не заключенный в экзосому и не прикрепленный к мембране экзосомы или не встроенный в нее.

[00104] Используемые в данном документе термины «**выделить**», «**выделенный**» и «**выделение**» или «**очищать**», «**очищенный**» и «**очищение**», а также «**извлеченный**» и «**извлекать**» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию приготовления (*например*, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных EV, которые прошли один или несколько процессов очистки, *например*, отбор или обогащение желаемого препарата экзосомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выделение или очистка, используемые в настоящем документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) экзосом из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления выделенная экзосомальная композиция не имеет обнаруживаемой нежелательной

активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других вариантах осуществления выделенная экзосомная композиция имеет количество и/или концентрацию желаемых экзосом в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других вариантах осуществления выделенная экзосомная композиция обогащена по сравнению с исходным материалом (*например*, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых вариантах осуществления выделенные экзосомные препараты по существу не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых вариантах осуществления выделенные экзосомные препараты являются на 100% свободными, на 99% свободными, на 98% свободными, на 97% свободными, на 96% свободными, на 95% свободными, на 94% свободными, на 93% свободными, на 92% свободными, на 91% свободными или 90% свободными от каких-либо загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. «По существу свободный от остаточных биологических продуктов» может также означать, что композиция экзосом не содержит обнаружимых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только экзосомы.

[00105] Термин «**наполнитель**» или «**носитель**» относится к инертному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Термин «**фармацевтически приемлемый носитель**» или «**фармацевтически приемлемый наполнитель**» охватывает все вещества, одобренные регулирующим органом федерального правительства США или перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, включая людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены наполнители и носители, которые являются применимыми при приготовлении фармацевтической композиции и, как правило, безопасными, нетоксичными и желательными.

[00106] Используемый в данном документе термин «**полезная нагрузка**» относится к терапевтическому агенту, который действует на цель (*например*, клетку-мишень), которая контактирует с EV. Полезные нагрузки, которые могут быть введены в экзосому и/или клетку-продуцент, включают терапевтические агенты, такие как

нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие обнаружимый фрагмент или токсин, которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые имеют регуляторную функцию, такую как микроРНК, дцРНК, днкРНК и miRNA), аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие обнаружимый фрагмент или токсин, которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарства и токсины).

[00107] Используемый в данном документе термин «**субъект-млекопитающее**» включает всех млекопитающих, включая людей, домашних животных (*например*, собак, кошек и тому подобное), сельскохозяйственных животных (*например*, коров, овец, свиней, лошадей и тому подобное) и лабораторных животных (*например*, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и тому подобное).

[00108] Термины «**индивидуум**», «**субъект**», «**хозяин**» и «**пациент**» используются здесь взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого требуется диагностика, лечение или терапия, в особенности люди. Способы, описанные в настоящем документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, а в других вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[00109] Используемый в данном документе термин «**по существу свободный**» означает, что образец, содержащий экзосомы, содержит менее 10% макромолекул в процентных концентрациях масса/объем (мас./об.). Некоторые фракции могут содержать менее 0,001%, менее 0,01%, менее 0,05%, менее 0,1%, менее 0,2%, менее 0,3%, менее 0,4%, менее 0,5%, менее 0,6%, менее 0,7%, менее 0,8%, менее 0,9%, менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9% или менее 10% (мас./об.) макромолекул.

[00110] Используемый в данном документе термин «**макромолекула**» означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

[00111] Используемый в данном документе термин «**обычный экзосомный белок**» означает белок, ранее известный как обогащенный экзосомами, включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадхерин LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним.

4.2. Другие толковательные соглашения

[00112] Считается, что диапазоны, указанные в данном документе, являются сокращением для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, под диапазоном «от 1 до 50» понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50.

4.3. Экзосомные белки

[00113] Аспект настоящего изобретения относится к идентификации, применению и модификации экзосомных белков, которые в больших количествах находятся на экзосомных мембранах. Такие экзосомные белки могут быть идентифицированы путем анализа высокоочищенных экзосом с помощью масс-спектрометрии или других методов, известных в данной области.

[00114] Экзосомные белки включают различные мембранные белки, такие как трансмембранные белки, цельные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах экзосом. Они включают различные белки CD, транспортеры, интегрины, лектины и кадгеринины. В частности, белки включают, но не ограничиваются ими, (1) отрицательный регулятор рецептора F2 простагландина (PTGFRN), (2) базигин (BSG), (3) член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3), (4) член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8), (5) интегрин бета-1 (ITGB1), (6) интегрин альфа-4 (ITGA4), (7) тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2), (8) класс белков-переносчиков АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4) и (9) член суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2).

[00115] Один или несколько экзосомных белков, идентифицированных в данном документе, могут быть селективно использованы в зависимости от клетки-производителя, условий производства, способов очистки или предполагаемого применения экзосом. Например, экзосомные белки, обогащенные определенной популяцией экзосом, могут быть использованы для очистки конкретной популяции экзосом. Экзосомные белки, в большом количестве находящиеся на поверхности определенных экзосом, с определенным диапазоном размеров, нацеливающей частью, плотностью заряда, полезной нагрузкой и *т. д.*, могут быть идентифицированы и использованы в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления более

одного экзосомного белка можно использовать одновременно или последовательно для получения, очистки и выделения терапевтических экзосом.

4.4. Поверхностно-сконструированные экзосомы

[00116] Другой аспект настоящего изобретения относится к получению и использованию поверхностно-сконструированных экзосом. Поверхностно-сконструированные экзосомы имеют в своем составе модифицированную мембрану. Например, их мембранные композиции могут быть изменены путем изменения содержания белка, липидов или гликанов в мембране.

[00117] В некоторых вариантах воплощения изобретения поверхностно-сконструированные экзосомы генерируются химическими и/или физическими методами, такими как индуцированное PEG слияние и/или ультразвуковое слияние.

[00118] В других вариантах осуществления поверхностно-сконструированные экзосомы создаются с помощью способов генной инженерии. Экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать модифицированные мембранные композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированные экзосомы имеют экзосомный белок с более высокой или более низкой плотностью или включают вариант или фрагмент экзосомного белка.

[00119] Например, поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы. Экзосомы, включая белки, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать модифицированные композиции мембранных белков.

[00120] Различные модификации или фрагменты экзосомного белка могут быть использованы для вариантов осуществления настоящего изобретения. Например, белки, модифицированные с целью повышения аффинности к связывающему агенту, могут быть использованы для создания поверхностно-сконструированных экзосом, которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать белки, модифицированные для более эффективного нацеливания на экзосомы и/или мембраны. Также можно использовать белки, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на экзосомные мембраны.

[00121] Также можно использовать гибридные белки, например, экзосомные белки или их фрагменты, гибридизированные с аффинной меткой (*например*, His-меткой, GST-меткой, глутатион-S-трансферазой, S-пептидом, HA, Мус, FLAG™ (Sigma-Aldrich Co.), MBP, SUMO и белком А) могут быть использованы для очистки или удаления поверхностно-сконструированных экзосом со связывающим агентом, специфичным для аффинной метки.

[00122] Гибридные белки, обладающие терапевтической активностью, также могут быть использованы для создания поверхностно-сконструированных экзосом. Например, гибридный белок может содержать транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант, и терапевтический пептид. Терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. Терапевтические соединения могут представлять собой нуклеотиды, аминокислоты, липиды, углеводы или малые молекулы. Терапевтический пептид может представлять собой антитело, фермент, лиганд, рецептор, антимикробный пептид или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой белок, связывающий нуклеиновую кислоту. Связывающий нуклеиновую кислоту белок может представлять собой Dicer, белок Argonaute, TRBP или белок оболочки бактериофага MS2. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий нуклеиновую кислоту, дополнительно содержит одну или несколько молекул РНК или ДНК. Одна или несколько РНК могут представлять собой микроРНК, миРНК, направляющую РНК, линкРНК, мРНК, антисмысловую РНК, дцРНК или их комбинации.

[00123] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид является частью системы межбелкового взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления система межбелкового взаимодействия включает систему взаимодействия FRB-FKBP, *например* систему взаимодействия FRB-FKBP, как описано в Banaszynski *et al.*, J Am Chem Soc. 2005 Apr 6;127(13):4715-21.

[00124] Гибридные белки могут быть нацелены на поверхность экзосом и обеспечивать терапевтическую активность для экзосомы. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или модификации.

[00125] В некоторых вариантах осуществления используются гибридные белки, имеющие нацеливающий фрагмент. Например, гибридные белки могут содержать транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть

использован для нацеливания экзосомы на конкретный орган, ткань или клетку для лечения с использованием экзосомы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и далее включают одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например*, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₁, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты также включают биспецифичные антитела и мультиспецифичные антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию.

[00126] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или модификации.

[00127] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе поверхностно-сконструированные экзосомы демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с поверхностно-сконструированными экзосомами, известными в данной области. Например, поверхностно-сконструированные экзосомы, полученные с использованием впервые идентифицированных экзосомных белков, представленных в данном документе, содержат на поверхности большее количество модифицированных белков, чем экзосомы в предшествующем уровне техники, *например*, те, которые получены с использованием обычных экзосомных белков. Кроме того, поверхностно-сконструированные экзосомы по настоящему изобретению могут иметь более высокую, более специфическую или более контролируемую биологическую активность по сравнению с поверхностно-сконструированными экзосомами, известными в данной области. Например, поверхностно-сконструированная экзосома, содержащая терапевтически или биологически релевантную экзогенную последовательность, гибридную с поверхностным белком экзосомы или его фрагментом, описанным в настоящем документе (*например*, RTGFRN или его фрагмент), может иметь больше желаемых сконструированных характеристик, чем слияние с каркасами, известными в данной области. Каркасные белки, известные в данной области, включают молекулы тетраспанина (*например*, CD63, CD81, CD9 и др.), мембранный белок 2, связанный с лизосомой (LAMP2 и LAMP2B), рецептор фактора роста, полученный из тромбоцитов (PDGFR), якорные белки GPI, лактадхерин и его фрагменты и пептиды, которые имеют

аффинность к любому из этих белков или их фрагментов. Ранее избыточная экспрессия экзогенных белков основывалась на стохастическом или случайном расположении экзогенных белков на экзосоме для выработки поверхностно-сконструированных экзосом. Это привело к низкой и непредсказуемой плотности экзогенных белков на экзосомах. Таким образом, белки поверхности экзосом и их фрагменты, описанные в данном документе, обеспечивают важные достижения в новых композициях экзосом и способах их получения.

[00128] В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированная экзосома содержит гибридный белок, содержащий экзогенную последовательность, и впервые идентифицированный в данном документе белок поверхности экзосомы имеет более высокую плотность гибридного белка, чем у аналогично сконструированных экзосом, содержащих экзогенную последовательность, конъюгированную с обычным экзосомным белком, известным в данной области (*например*, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорным белком, лактадеринном LAMP2 и LAMP2B, их фрагментом или связанным с ними пептидом). В некоторых вариантах осуществления указанный гибридный белок, содержащий экзосомный белок, впервые идентифицированный в настоящем документе, присутствует на поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других экзосом, аналогично модифицированных с использованием варианта обычного экзосомного белка. В некоторых вариантах осуществления указанный гибридный белок, содержащий экзосомный белок, впервые идентифицированный в настоящем документе, присутствует на поверхности экзосомы с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на других экзосом поверхностях, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка.

[00129] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок PTGFRN, вариант, фрагмент, вариант фрагмента или его модификация присутствует на поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD9. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок PTGFRN, вариант, фрагмент, вариант фрагмента или его модификация присутствует на поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях

поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других экзосом, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка (*например*, молекула тетраспанина, например, CD63). В определенных вариантах осуществления гибридный белок SLC3A2, вариант, фрагмент, вариант фрагмента или его модификация присутствует на поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других экзосом, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка (*например*, молекула тетраспанина, например, CD63). В определенных вариантах осуществления гибридный белок АТФ-транспортера, вариант, фрагмент, вариант фрагмента или его модификация присутствует на поверхности экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других экзосом, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка (*например*, молекула тетраспанина, например, CD63). В некоторых вариантах осуществления указанный гибридный белок, содержащий экзосомный белок, впервые идентифицированный в настоящем документе, присутствует на поверхности экзосомы с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на других экзосомных поверхностях, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка.

[00131] Гибридные белки, представленные в настоящем документе, могут включать транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант и дополнительный пептид. Дополнительный пептид может быть присоединен либо к N-концу, либо к C-концу экзосомного белка или его фрагмента или варианта. Дополнительный пептид может быть расположен внутри (на люминальной стороне) или снаружи экзосомы, прикрепленным к экзосомному белку.

[00132] В некоторых вариантах осуществления гибридные белки, представленные в настоящем документе, включают транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант и два дополнительных пептида. Оба из двух дополнительных пептидов могут быть присоединены либо к N-концу, либо к C-концу экзосомного белка его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления один из двух дополнительных пептидов присоединен к N-концу, а другой из двух дополнительных пептидов присоединен к C-концу экзосомного белка или его фрагмента или варианта. Дополнительные пептиды могут быть расположены внутри (на

люминальной стороне) или снаружи экзосомы, присоединенными к экзосомному белку, или и то, и другое.

4.5. Клетка-продуцент для производства поверхностно-сконструированных экзосом

[00133] Экзосомы по настоящему изобретению могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro*, или взятой из жидкости организма субъекта. Когда экзосомы получают из культуры клеток *in vitro*, для настоящего изобретения можно использовать различные клетки-продуценты, *например* клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или мезенхимальные стволовые клетки (MSC).

[00134] Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения одной или нескольких экзогенных последовательностей для получения поверхностно-сконструированных экзосом. Генетически модифицированная клетка-продуцент может содержать экзогенную последовательность, введенную путем временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть введена в клетку-продуцент в виде плазмиды. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-продуцента, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых вариантах осуществления создается стабильная клеточная линия для получения поверхностно-сконструированных экзосом.

[00135] Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-продуцента, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-продуцент можно использовать различные способы, известные в данной области. Например, клетки, модифицированные с использованием различных способов редактирования генов (*например*, способы, использующие гомологичную рекомбинацию, систему, опосредованную транспозоном, систему loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN), входят в объем настоящего изобретения.

[00136] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую экзосомный белок или вариант или фрагмент экзосомного белка. Может быть введена дополнительная копия последовательности, кодирующей экзосомный белок, для получения поверхностно-сконструированной экзосомы, имеющей более высокую плотность экзосомного белка. Экзогенная последовательность, кодирующая вариант или фрагмент экзосомного белка, может быть введена для получения поверхностно-сконструированной экзосомы, содержащей модификацию или фрагмент экзосомного

белка. Экзогенная последовательность, кодирующая аффинную метку, может быть введена для получения поверхностно-сконструированной экзосомы, содержащей гибридный белок, содержащий аффинную метку, присоединенную к экзосомному белку.

[00137] В некоторых вариантах осуществления поверхностно-сконструированная экзосома имеет более высокую плотность белка экзосомы, чем нативные экзосомы, выделенные из клеток того же или аналогичного типа клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления указанный экзосомный белок присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления указанный экзосомный белок присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий экзосомный белок присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном экзосомном белке на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления фрагмент или вариант экзосомного белка присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном экзосомном белке на указанной нативной экзосоме.

[00138] В конкретных вариантах осуществления PTGFRN, фрагмент или вариант PTGFRN или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном PTGFRN на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления BSG, фрагмент или вариант BSG или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном BSG на

указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления IGSF2, фрагмент или вариант IGSF2 или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном IGSF2 на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления IGSF3, фрагмент или вариант IGSF3 или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном IGSF3 на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления ITGB1, фрагмент или вариант ITGB1 или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном ITGB1 на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления ITGA4, фрагмент или вариант ITGA4 или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном ITGA4 на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления SLC3A2, фрагмент или вариант SLC3A2 или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном SLC3A2 на указанной нативной экзосоме. В конкретных вариантах осуществления АТФ-транспортер, фрагмент или вариант АТФ-транспортера или его модификация присутствует на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме с плотностью, которая в 2–4-, 4–8, 8–16, 16–32, 32–64, 64–100, 100–200, 200–400, 400–800, 800–1000 раз или более превышает плотность на указанной поверхностно-сконструированной экзосоме, чем на немодифицированном АТФ-транспортер на указанной нативной экзосоме.

[00139] В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель дополнительно модифицируется для включения дополнительной экзогенной последовательности. Например, дополнительная экзогенная последовательность может быть введена для модуляции экспрессии эндогенного гена или для получения экзосомы, включающей

определенный полипептид в качестве полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы, а другая кодирует полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель может быть дополнительно модифицирована для включения дополнительной экзогенной последовательности, придающей экзосомам дополнительные функциональные возможности, например, специфические способности к нацеливанию, функции доставки, ферментативные функции, увеличение или уменьшение периода полувыведения *in vivo* и т. д. В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель модифицирована для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы, а другая кодирует белок, придающий экзосомам дополнительные функциональные возможности.

[00140] В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, каждая из двух экзогенных последовательностей кодирует гибридный белок на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-сконструированная экзосома клетки-производителя имеет более высокую плотность белка экзосомы по сравнению с нативными экзосомами, выделенными из немодифицированной клетки того же или подобного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированные экзосомы содержат экзосомный белок с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более выше, чем у нативной экзосомы, выделенной из немодифицированной клетки того же или подобного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель дополнительно модифицируется для включения одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более дополнительных экзогенных последовательностей.

[00141] Более конкретно, поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей один или несколько белков поверхности экзосомы или их вариант, включая, но не ограничиваясь ими, (1) отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN), (2) базигин (BSG), (3) член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3), (4) член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8), (5) интегрин бета-1 (ITGB1), (6) интегрин альфа-4 (ITGA4), (7) тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2), (8) класс белков-транспортеров АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4) и (9) член суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2). Любой из

одного или нескольких экзосомных поверхностных белков, описанных в данном документе, может быть экспрессирован в клетке-производителе из плазмиды, экзогенной последовательности, встроенной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая мессенджер-РНК (мРНК).

[00142] В некоторых вариантах осуществления один или несколько белков поверхности экзосом экспрессируются в клетке, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей ее полноразмерную эндогенную форму. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок PTGFRN последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок BSG последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок IGSF8 последовательности SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок IGSF3 последовательности SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ITGB1 последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ITGA4 последовательности SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок SLC3A2 последовательности SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP1A1 последовательности SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP1A2 последовательности SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP1A3 последовательности SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP1A4 последовательности SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP1B3 последовательности SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP2B1 последовательности SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP2B2 последовательности SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP2B3 последовательности SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ATP2B4 с последовательностью SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок IGSF2 последовательности SEQ ID NO: 34

[00143] Поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент одного или нескольких белков поверхности экзосомы, включая, но не ограничиваясь ими, (1) отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN), (2) базигин (BSG), (3) член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3), (4) член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8), (5) интегрин бета-1 (ITGB1), (6) интегрин альфа-4 (ITGA4), (7)тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2), (8) класс белков-транспортеров АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4) и (9) член суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2). В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент поверхностного белка экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца нативного белка, В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент поверхностного белка экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с C-конца нативного белка, В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент поверхностного белка экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца и с C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент поверхностного белка экзосомы, в котором отсутствует один или несколько функциональных или структурных доменов нативного белка.

[00144] В некоторых вариантах осуществления фрагмент поверхностного белка экзосомы гибридизирован с одним или несколькими гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с C-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и C-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков представляют собой белки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков представляют собой белки человека.

[00145] Поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагменты PTGFRN. В некоторых вариантах осуществления фрагменты PTGFRN лишены одного или нескольких

функциональных или структурных доменов, таких как IgV. Например, фрагмент PTGFRN может содержать полипептид SEQ ID NO: 2–7 или 33. В некоторых вариантах осуществления фрагменты PTGFRN гибридизированы с одним или несколькими гетерологичными белками. Один или несколько гетерологичных белков могут быть гибридизированы с N-концом указанных фрагментов PTGFRN. Один или несколько гетерологичных белков могут быть гибридизированы с C-концом указанных фрагментов PTGFRN. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и с C-концом указанных фрагментов PTGFRN. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека. В некоторых вариантах осуществления указанный гетерологичный белок, гибридизированный с указанным фрагментом PTGFRN, дополнительно содержит пептид сигнальной последовательности. Пептид сигнальной последовательности может представлять собой полипептид SEQ ID NO: 8.

[00146] Поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагменты Basigin. В некоторых вариантах осуществления фрагменты Basigin лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV. Например, фрагменты Basigin могут содержать полипептид SEQ ID NO: 10-12. В некоторых вариантах осуществления фрагменты Basigin гибридизированы с одним или несколькими гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом указанных фрагментов Basigin. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с C-концом указанных фрагментов Basigin. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и с C-концом указанных фрагментов Basigin. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека. В некоторых вариантах осуществления указанный гетерологичный белок, гибридизированный с указанным фрагментом Basigin, дополнительно содержит пептид сигнальной последовательности. Пептид сигнальной последовательности может представлять собой полипептид SEQ ID NO: 13.

[00147] Поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагменты IGSF8. В некоторых вариантах осуществления фрагменты IGSF8 лишены одного или нескольких

функциональных или структурных доменов, таких как IgV. Например, фрагменты IGSF8 могут содержать полипептид SEQ ID NO: 15-18. В некоторых вариантах осуществления фрагменты IGSF8 гибридизированы с одним или несколькими гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом указанных фрагментов IGSF8. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с C-концом указанных фрагментов IGSF8. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и с C-концом указанных фрагментов IGSF8. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека. В некоторых вариантах осуществления указанный гетерологичный белок, гибридизированный с указанным фрагментом IGSF8, дополнительно содержит пептид сигнальной последовательности. Пептид сигнальной последовательности может представлять собой полипептид SEQ ID NO: 19.

[00148] Поверхностно-сконструированные экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагменты IGSF2. В некоторых вариантах осуществления фрагменты IGSF2 лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV. В некоторых вариантах осуществления фрагменты IGSF2 гибридизированы с одним или несколькими гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом указанных фрагментов IGSF2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с C-концом указанных фрагментов IGSF2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и с C-концом указанных фрагментов IGSF2. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека. В некоторых вариантах осуществления указанный гетерологичный белок, гибридизированный с указанным фрагментом IGSF2, дополнительно содержит пептид сигнальной последовательности. Пептид сигнальной последовательности может представлять собой полипептид SEQ ID NO: 35.

[00149] В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированные экзосомы содержат полипептид последовательности, идентичной или подобной полноразмерному белку поверхности нативной экзосомы или его фрагменту,

включая, но не ограничиваясь ими, (1) отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN), (2) базигин (BSG), (3) член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3), (4) член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8), (5) интегрин бета-1 (ITGB1), (6) интегрин альфа-4 (ITGA4), (7)тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2), (8) класс белков-транспортёров АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4) и (9) член суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2). В некоторых вариантах осуществления указанный пептид на 50% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 50% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 60% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 60% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 70% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 70% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 80% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 80% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 90% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 90% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 95% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 95% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 99% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 99% идентичен SEQ ID NO: 1-34. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 99,9% идентичен полноразмерному нативному белку поверхности экзосомы или его фрагменту, *например*, на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1-34.

4.6. Аффинная очистка

[00150] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к выделению, очистке и субфракционированию экзосом с использованием специфического связывающего взаимодействия между белком, в большом количестве находящемся на мембране экзосомы, и иммобилизованным связывающим агентом. Такие способы обычно включают в себя стадии (1) нанесения или загрузки образца, содержащего экзосомы, (2) необязательно вымывания несвязанных компонентов образца с использованием соответствующих буферов, которые поддерживают взаимодействие связывания между целевыми белками экзосом и связывающими агентами, и (3) элюирования (диссоциации и

восстановления) экзосом из иммобилизованных связывающих агентов путем изменения условий буфера таким образом, что взаимодействие связывания больше не происходит.

[00151] Некоторые варианты осуществления относятся к способу удаления экзосом из образца с использованием специфического связывающего взаимодействия между белком, в большом количестве находящемся на мембране экзосомы, и иммобилизованным связывающим агентом. В этих случаях экзосомы, связанные со связывающим агентом, не элюируются из связывающего агента, и может быть собрана фракция, которая не связывается со связывающим агентом. Способ может быть использован для очистки образца, содержащего экзосомы и неэкзосомный материал, такой как вирусы (например, лентивирус, ретровирус, аденоассоциированный вирус или любой другой вирус с оболочкой или без оболочки) или рекомбинантный белок (например, антитела, ферменты или другие полипептиды), где экзосомы являются загрязняющими частицами. Связанные экзосомы могут оставаться связанными со связывающим агентом, и неэкзосомный материал собирается по существу без экзосом.

[00152] Целевой белок, используемый для этого процесса выделения, очистки, субфракционирования или удаления, может представлять собой эндогенный белок, вырабатываемый из генома клетки-производителя, белок, введенный в клетку-производитель генетической модификацией, или белок, модифицированный химическим, физическим или другим биологическим способом. В некоторых случаях белок представляет собой немутантный белок или мутантный белок, *например*, вариант или фрагмент эндогенного белка. В некоторых случаях белок представляет собой гибридный белок.

[00153] Для вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть использованы различные связывающие агенты, имеющие аффинность к целевому белку. Например, белки, пептиды и малые молекулы со специфической аффинностью к целевому белку могут быть использованы в качестве связывающего агента. В некоторых вариантах связывающие агенты получают из органических или неорганических источников. Примеры связывающих агентов из органических источников включают сывороточные белки, лектины или антитела. Примеры связывающих агентов из неорганических источников включают бороновые кислоты, хелаты металлов и триазиновые красители.

[00154] Связывающие агенты могут быть химически иммобилизованы или связаны с твердой подложкой, так что экзосомы, имеющие специфическую аффинность со связывающим агентом, оказываются связанными. Могут быть использованы различные формы твердой подложки, *например* пористая агарозная гранула, микротитровальный

планшет, магнитная гранула, или мембрана. В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку и может быть использован для аффинной хроматографии экзосом.

[00155] В некоторых случаях выделение, очистка, субфракционирование и удаление экзосом осуществляются с помощью колоночной хроматографии с использованием колонки, в которой загружаются связывающие агенты и твердая подложка. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий экзосомы, проходит через колонку для обеспечения возможности оседания, потом содержимое колонки промывают промывочным буфером, после чего в колонку вводят и собирают элюирующий буфер. Эти стадии могут быть выполнены при атмосферном давлении или с применением дополнительного давления.

[00156] В некоторых случаях выделение, очистка, субфракционирование и удаление экзосом выполняются с использованием обработки партий. Например, образец добавляют к связывающему агенту, прикрепленному к твердой подложке в сосуде, перемешивают, отделяя твердую подложку, удаляют жидкую фазу, промывают, центрифугируют, добавляют элюирующий буфер, повторно центрифугируют и удаляют элюат.

[00157] В некоторых случаях может быть использован гибридный метод. Например, образец добавляют к связывающему агенту, прикрепленному к твердой подложке в сосуде, твердую подложку, связанную с экзосомами, впоследствии упаковывают в колонку и промывают и элюируют на колонке.

[00158] В некоторых случаях выделение, очистка, субфракционирование и удаление экзосом осуществляются с использованием связывающего агента, прикрепленного к планшетам для микротитрования, магнитным гранулам, или мембранам. В этих случаях образец добавляют к связывающему агенту, прикрепленному к твердой подложке, после чего следуют стадии смешивания, отделения твердой подложки, удаления жидкой фазы, промывания, удаления промывочного буфера, добавления буфера для элюирования и удаления элюата.

[00159] Связывание между связывающим агентом и целевым белком на экзосоме осуществляется в различных физиологических условиях, оптимальных для специфических взаимодействий между связывающим агентом и целевым белком на экзосоме. Элюирование связанных экзосом может быть достигнуто путем изменения концентрации соли, pH, pI, заряда и ионной силы напрямую или через градиент.

[00160] В некоторых вариантах осуществления образец, выделенный, очищенный или субфракционированный одним связывающим агентом, впоследствии обрабатывают другим связывающим агентом.

[00161] В некоторых вариантах осуществления последовательно используют более одной колонки, где каждая из множества колонок содержит различный связывающий агент, специфичный для различных целевых белков.

[00162] В некоторых вариантах осуществления одна колонка содержит несколько связывающих агентов, каждый из которых специфичен для отдельного целевого белка.

[00163] В некоторых случаях связывающий агент и твердая подложка используют повторно путем введения стадии периодической дезинфекции. Например, их можно дезинфицировать с помощью комбинации пропиленгликоля, изопропанола, раствора с высокой ионной силой и/или гидроксида натрия.

4.6.1. Подготовка образца

[00164] Способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для очистки, выделения, субфракционирования или удаления экзосом из различных образцов, содержащих экзосомы. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой материал очищенного от примесей сбора, содержащий экзосомы. В некоторых случаях образец содержит экзосомы, частично очищенные способом очистки, хорошо известным в данной области. Например, ультрафильтрация/диафильтрация, гидроксилпатитная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, глубокая фильтрация или ионообменная хроматография связывания/элюирования могут использоваться для частичной очистки экзосом перед взаимодействием со связывающим агентом для аффинной очистки.

[00165] В некоторых случаях частично очищенный материал дополнительно обрабатывают для достижения определенных физиологических условий (*например*, pH, температуры, концентрации соли, типа соли, полярности) для желаемого взаимодействия со связывающим агентом. Образец может быть приготовлен путем разбавления или концентрации для получения определенных концентраций экзосом или путем добавления наполнителей для изменения структуры экзосом. В некоторых случаях частично очищенный материал наносится на связывающий агент без каких-либо манипуляций.

4.6.2. Связывание

[00166] Способы, описанные в данном документе, требуют специфического взаимодействия между целевым белком экзосомы и связывающим агентом. Высокопроизводительный скрининг может быть выполнен для определения условий буфера, идеальных для конкретного связывания — путем изменения концентрации соли, рН и/или снижения полярности с помощью органического модификатора, этиленгликоля, пропиленгликоля или мочевины. Взаимодействие между целевым белком и связывающим агентом также может изменяться в зависимости от условий образца (*например*, количества образца, загруженного на объем хроматографической смолы, концентрации экзосом, концентрации примесей), загрузочных буферов (*например*, рН, концентрации соли, типа соли полярность) и других физических условия (*например*, температура). Кроме того, добавление наполнителей, которые изменяют структуру экзосом, также может изменить их взаимодействие. Кроме того, время нахождения может быть отрегулировано на основе разной скорости адсорбции у примесей и экзосом. Таким образом, могут быть проверены различные условия очистки, описанные в данном документе, для определения идеальных условий для стадии.

[00167] Подобные подходы могут быть использованы для улучшения чистоты и выхода, а также для помощи в обогащении, истощении или выделении субпопуляций экзосом. Эти свойства, наряду с максимизацией нагрузки и применением более строгих условий элюирования, могут быть использованы для дальнейшего повышения концентрации экзосом.

4.6.2.1. Элюирование

[00168] Элюирование экзосом может быть достигнуто путем изменения концентрации соли, рН и/или полярности с помощью органического модификатора, этиленгликоля, пропиленгликоля или мочевины.

[00169] Селективное элюирование экзосом может быть достигнуто путем увеличения концентрации одновалентной катионной галогенидной соли (*например*, хлорида натрия, хлорида калия, бромида натрия, хлорида лития, йодида натрия, бромида калия, бромида лития, фторида натрия, фторида калия, фторида лития, йодида лития, ацетата натрия, ацетата калия, ацетат лития и йодида калия), двухвалентной или трехвалентной соли (*например*, хлорида кальция, хлорида магния, сульфата кальция, сульфата натрия, сульфата магния, трихлорида хрома, сульфата хрома, цитрат натрия, хлорида железа (III), хлорида иттрия (III), фосфата калия, сульфата калия, фосфата натрия,

хлорида железа, цитрата кальция, фосфата магния и хлорида железа) или их комбинации в буфере для элюирования с использованием увеличения градиента (ступенчатого или линейного) одновалентной катионной галогенидной соли (*например*, хлорида натрия, хлорида калия, бромида натрия, хлорида лития, йодида натрия, бромида калия, бромида лития, фторида натрия, фторида калия, фторида лития, йодида лития, ацетата натрия, ацетата калия, ацетата лития и йодида калия), двухвалентной или трехвалентной соли (*например*, хлорида кальция, хлорида магния, сульфата кальция, сульфата натрия, сульфата магния, трихлорида хрома, сульфата хрома, цитрата натрия, хлорида железа (III), хлорида иттрия (III), фосфата калия, сульфата калия, фосфата натрия, хлорида железа, цитрата кальция, фосфата магния и хлорида железа), или их комбинации при фиксированном pH.

[00170] Существенной чистоты экзосом можно достичь, пропуская примеси сквозь колонку во время фазы загрузки колонки, элюируя примеси во время селективных промывок наполнителем и избирательно элюируя продукт во время элюирования, оставляя дополнительные примеси связанными с колонкой. Абсорбция, измеренная по колоночным элюатам, может указывать на очистку экзосом, полученных данными способами.

[00171] Элюирование также может быть достигнуто путем модулирования диапазона pH, содержания солей, органических растворителей, малых молекул, моющих детергентов, цвиттерионов, аминокислот, полимеров, температуры и любой комбинации вышеперечисленного. Подобные элюирующие агенты могут быть использованы для улучшения чистоты, улучшения выхода и выделения субпопуляций экзосом.

[00172] Элюирование также можно проводить с помощью нескольких буферов для элюирования, имеющих различные свойства, такие как pH, содержание солей, органических растворителей, малых молекул, детергентов, цвиттерионов, аминокислот, полимеров, температуры и любой комбинации вышеперечисленного. Может быть собрано множество элюированных фракций, при этом экзосомы, собранные в каждой фракции, имеют различные свойства. Например, экзосомы, собранные в одну фракцию, имеют более высокую чистоту, меньший или больший средний размер, предпочтительную композицию и *т. д.* по сравнению с экзосомами в других фракциях.

[00173] Элюирующие буферы с различными свойствами могут применяться в виде непрерывного потока во время сбора множества элюированных фракций. Элюированные фракции могут быть собраны во время изократического элюирования или градиентного элюирования. Как только по меньшей мере одна элюированная фракция собрана, состав элюированной фракции может быть проанализирован. Например, в каждой элюированной

фракции может быть измерена концентрация экзосом, белка клетки-хозяина, загрязняющего белка, ДНК, углеводов или липидов. Также могут быть измерены другие свойства экзосом в каждой элюированной фракции. Свойства включают в себя средний размер, среднюю плотность заряда и другие физиологические свойства, связанные с биораспределением, клеточным поглощением, периодом полураспада, фармакодинамикой, активностью, дозировкой, иммунным ответом, эффективностью нагрузки, стабильностью или реакционной способностью в отношении других соединений.

4.6.2.2.Промывание

[00174] Необязательно, чистота экзосом может быть дополнительно улучшена путем промывания образцов перед элюированием. В некоторых вариантах наполнитель может представлять собой промывочный буфер. Наполнитель может представлять собой раствор, имеющий определенные диапазоны pH, содержание соли, органических растворителей, малых молекул, детергентов, цвиттерионов, аминокислот, полимеров и любую комбинацию вышеперечисленного.

[00175] Более конкретно, наполнитель может включать аргинин, лизин, глицин, гистидин, кальций, натрий, литий, калий, йодид, магний, железо, цинк, марганец, мочевины, пропиленгликоль, алюминий, аммоний, гуанидиния полиэтиленгликоль, ЭДТА, EGTA, детергент, хлорид, сульфат, карбоновые кислоты, сиаловые кислоты, фосфат, ацетат, глицин, борат, формиат, перхлорат, бром, нитрат, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол или три-н-бутилфосфат.

[00176] Наполнитель также может содержать детергент, выбранный из группы, состоящей из хлорида цетилтриметиламмония, октоксанола-9, TRITON™ X-100 (*m. e.*, полиэтиленгликоль п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилового эфира) и TRITON™ CG-110, доступного от Sigma-Aldrich; додецилсульфата натрия; лаурилсульфата натрия; дезоксихолевой кислоты; полисорбата 80 (*m. e.*, полиоксиэтилена (20) сорбитанмоноолеата); полисорбата 20 (*m. e.*, полиоксиэтилена (20) сорбитанмонолаурата); этоксилата спирта; эфира алкилполиэтиленгликоля; децил глюкозида, октоглюкозидов; SafeCare; ECOSURF™ EH9, ECOSURF™ EH6, ECOSURF™ EH3, ECOSURF™ SA7, и ECOSURF™ SA9, доступных от DOW Chemical; LUTENSOL™ M5, LUTENSOL™ XL, LUTENSOL™ XP and APG™ 325N, доступных от BASF; TOMADOL™ 900, доступного от AIR PRODUCTS; NATSURF™ 265, доступного от CRODA; SAFECARE™1000, доступного от Bestchem, TERGITOL™ L64, доступного от DOW; каприловой кислоты; CHEMBETAIN™ LEC, доступного от Lubrizol; и Mackol DG.

4.6.3. Другие способы улучшения результата

[00177] Количество экзосом, которое может быть загружено в объем хроматографической смолы, может быть улучшено путем модуляции исходного материала, например, путем увеличения концентрации экзосом, уменьшения концентрации примесей, изменения pH, уменьшения концентрации соли, уменьшения ионной силы или изменение конкретных субпопуляций экзосом. Вследствие ограничений массопереноса и медленной адсорбции и десорбции экзосом на смоле количество экзосом, которое может быть загружено в объем хроматографической смолы, может быть увеличено путем замедления скорости потока во время загрузки колонки путем использования более длинных колонок для увеличения времени нахождения.

4.7. Заявки

4.7.1. Очистка экзосом

[00178] Использование экзосом в медицинских целях требует, чтобы экзосомы не содержали или в основном не содержали примесей, включая, но не ограничиваясь ими, макромолекулы, такие как нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты, малые молекулы, металлы или их комбинации. Настоящее изобретение предлагает способ очистки экзосом от загрязняющих макромолекул. В некоторых вариантах осуществления очищенные экзосомы по существу не содержат загрязняющих макромолекул.

4.7.2. Субфракционирование экзосом

[00179] Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно обеспечивают способы субфракционирования популяций экзосом на основе их мембранного белка, размера, плотности заряда, типа лиганда (*например*, тетраспанинов) и гепарина или других сайтов связывания сульфатированных углеводов. Выбор аффинной метки, композиций и протоколов буфера загрузки и элюирования может привести к элюированию различных субпопуляций экзосом.

[00180] Например, варианты осуществления настоящего изобретения предоставляют способы очистки популяции экзосом с меньшим или большим размером. Размер экзосом может быть определен способами, доступными в данной области. Например, размер может быть измерен с помощью анализа отслеживания наночастиц, многоугольного рассеяния света, одноугольного рассеяния света, эксклюзионной хроматографии, аналитического ультрацентрифугирования, поточного фракционирования

в поле, лазерной дифракции, анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор или динамического рассеяния света.

[00181] Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно относятся к способам субфракционирования экзосом на основе их плотности заряда. Плотность заряда экзосом может быть определена путем потенциометрического титрования, анионного обмена, катионного обмена, изоэлектрического фокусирования, дзета-потенциала, капиллярного электрофореза, электрофореза в капиллярной зоне, гель-электрофореза.

[00182] Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к субфракционированию экзосом на основе других физиологических свойств, таких как биораспределение, клеточное поглощение, период полураспада, фармакодинамика, активность, дозирование, иммунный ответ, эффективность нагрузки, стабильность или реакционная способность по отношению к другим соединениям. Способ позволяет выделить популяцию экзосом, подходящую для конкретного применения.

4.8. Характеристика экзосом

[00183] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают стадию характеристики экзосом, содержащихся в каждой собранной фракции. В некоторых вариантах осуществления содержимое экзосом может быть извлечено для изучения и характеристики. В некоторых вариантах осуществления экзосомы выделяются и характеризуются определенными показателями, включая, но не ограничиваясь ими, размер, форму, морфологию или молекулярные композиции, такие как нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты и липиды.

4.8.1. Измерение содержания экзосом

[00184] Экзосомы могут включать белки, пептиды, РНК, ДНК и липиды. Общая РНК может быть экстрагирована с использованием экстракции кислота-фенол: хлороформ. Затем РНК может быть очищена с использованием стекловолоконного фильтра в условиях, которые восстанавливают малую РНК, содержащую общую РНК, или которые отделяют малые виды РНК длиной менее 200 нуклеотидов от более длинных видов РНК, таких как мРНК. Поскольку РНК элюируется в небольшом объеме, для выделения РНК может не потребоваться стадия осаждения спиртом.

[00185] Композиции экзосом могут оцениваться способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, транскриптомику, секвенирование, протеомику, масс-спектрометрию или ВЭЖХ.

[00186] Композиция нуклеотидов, связанных с выделенными экзосомами (включая РНК и ДНК), может быть измерена с использованием различных способов, которые хорошо известны специалистам в данной области (*например*, количественная или полуколичественная ОТ-ПЦР, нозерн-блот-анализ, обнаружение способом гибридизации в растворе). В конкретном варианте осуществления уровень по меньшей мере одной РНК измеряют путем обратной транскрипции РНК из экзосомной композиции для обеспечения набора целевых олигодезоксинуклеотидов, гибридизации целевых олигодезоксинуклеотидов с одним или несколькими РНК-специфичными олигонуклеотидными зондами (*например*, микрочипом, который содержит РНК-специфичные олигонуклеотидные зонды) для обеспечения профиля гибридизации экзосомной композиции и сравнения профиля гибридизации экзосомной композиции с профилем гибридизации, полученным у контрольного образца. Изменение сигнала по меньшей мере одной РНК в тестируемом образце относительно контрольного образца указывает на состав РНК.

[00187] Также из ген-специфических олигонуклеотидных зондов, полученных из известных последовательностей РНК, может быть изготовлена микроматрица. Массив может содержать два разных олигонуклеотидных зонда для каждой РНК, один из которых содержит активную зрелую последовательность, а другой является специфичным для предшественника РНК (*например*, микроРНК и пре-микро RNA). Массив также может содержать контроли, такие как одна или несколько мышинных последовательностей, отличающихся от человеческих ортологов только несколькими основаниями, которые могут служить в качестве контролей для условий жесткости гибридизации. Также тРНК и другие РНК (*например*, рРНК, мРНК) обоих видов могут быть напечатаны на микрочипе, обеспечивая внутренний относительно стабильный положительный контроль для специфической гибридизации. Один или несколько подходящих контролей для неспецифической гибридизации также могут быть включены в микрочип. Для этой цели последовательности отбирают на основании отсутствия какой-либо гомологии с какими-либо известными РНК.

[00188] Микроматрицы могут быть созданы с помощью техник, известных в данной области техники. Например, олигонуклеотидные зонды соответствующей длины, *например*, 40 нуклеотидов, 5'-аминомодифицированы в положении С6 и напечатаны на активированных слайдах с использованием коммерчески доступных систем микрочипов, *например* GeneMachine OmniGrid™100 Microarrayer и Amersham CodeLink™. Меченый кДНК-олигомер, соответствующий РНК-мишени, получают путем обратной транскрипции

РНК-мишени с помощью меченого праймера. После синтеза первой цепи гибриды РНК/ДНК денатурируют для разрушения матриц РНК. Полученные таким образом меченые кДНК-мишени затем гибридизуют с микроматричным чипом в условиях гибридизации, *например*, 6 раз. SSPE/30% формамид при 25 °С в течение 18 часов с последующей промывкой в 0,75 раза. ТНТ при 37 °С в течение 40 минут. В положениях на матрице, где ДНК иммобилизованного зонда распознает комплементарную кДНК-мишень в образце, происходит гибридизация. Помеченная кДНК-мишень отмечает точное положение места связывания в массиве, что позволяет автоматическое обнаружение и количественное определение. Выходные данные состоят из списка событий гибридизации, указывающих на относительное содержание специфических последовательностей кДНК и, следовательно, относительное количество соответствующих комплементарных РНК в препарате экзосомы. Согласно одному варианту осуществления меченый кДНК-олигомер представляет собой меченую биотином кДНК, полученную из меченого биотином праймера. Затем микроматрица подвергается процедуре прямого обнаружения биотинсодержащих транскриптов с использованием, *например*, конъюгата стрептавидин-Alexa647, и сканируется с использованием традиционных методов сканирования. Интенсивность изображения каждого пятна на матрице пропорциональна содержанию соответствующей РНК в экзосоме.

[00189] Работа по извлечению данных завершается с использованием биоинформатики, включая сканирование чипов, сбор сигналов, обработку изображений, нормализацию, статистическую обработку и сравнение данных, а также анализ путей. Таким образом, микрочип может профилировать сотни и тысячи полинуклеотидов одновременно с высокой пропускной способностью. Анализ профиля экспрессии мРНК с помощью микрочипов позволил получить ценные данные для изучения экспрессии генов в фундаментальных исследованиях. И эта методика получила дальнейшее применение на практике в фармацевтической промышленности и в клинической диагностике. С увеличением количества данных о микроРНК и с накоплением доказательств важности микроРНК в регуляции генов, микроматрица становится полезным методом исследований микроРНК с высокой пропускной способностью. Анализ уровней микроРНК с использованием полинуклеотидных зондов также может быть выполнен в различных физических форматах. Например, для облегчения обработки большого количества тестируемых образцов могут быть использованы микротитровальные планшеты или автоматизация.

4.8.2. Измерение размера экзосом

[00190] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают измерение размера экзосом и/или популяций экзосом, включенных в очищенные фракции. В некоторых вариантах осуществления размер экзосомы определяется как наибольший измеримый размер. Как правило, самый наибольший общий размер экзосомы также называют ее диаметром.

[00191] Размер экзосом может быть измерен с использованием различных способов, известных в данной области техники, например, анализа отслеживания наночастиц, многоугольного рассеяния света, одноугольного рассеяния света, эксклюзионной хроматографии, аналитического ультрацентрифугирования, поточного фракционирования в поле, лазерной дифракции, анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор или динамического рассеяния света.

[00192] Размер экзосом может быть измерен с использованием динамического рассеяния света (DLS) и/или многоугольного рассеяния света (MALS). Методы использования DLS и/или MALS для измерения размера экзосом известны специалистам в данной области и включают анализ отслеживания наночастиц (NTA, *например*, с использованием устройства отслеживания наночастиц Malvern Nanosight NS300). В конкретном варианте осуществления размер экзосомы определяют с использованием Malvern NanoSight NS300. В некоторых вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер, измеренный с помощью NTA, приблизительно 20–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Malvern

Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Malvern Nanosight NS300).

[00193] Размер экзосом можно измерить с помощью анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор (TRPS). В конкретном варианте осуществления размер экзосомы, измеренный с помощью TRPS, определяют с использованием iZON qNANO Gold. В некоторых вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В некоторых вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных

экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40–1000 нм (*например*, с использованием iZON qNano Gold).

[00194] Размер экзосом можно измерить с помощью электронной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления метод электронной микроскопии, используемый для измерения размера экзосом, представляет собой просвечивающую электронную микроскопию. В конкретном варианте осуществления для измерения размера экзосом используется просвечивающий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN. Способы измерения размера экзосом с использованием электронного микроскопа хорошо известны специалистам в данной области техники, и любой такой способ может быть подходящим для измерения размера экзосом. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе экзосомы имеют наибольший размер, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 20–1000 нм (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления описанные в данном документе экзосомы имеют наибольший размер, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 40–1000 нм (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 20–1000 нм (*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 20–1000 нм (*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 20–1000 нм (*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 40–1000 нм

(*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 40-1000 нм (*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления популяции экзосом, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% указанных экзосом имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом, около 40–1000 нм (*например*, сканирующий электронный микроскоп Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN).

4.8.3. Измерение плотности заряда экзосом

[00195] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают измерение плотности заряда экзосом и/или популяций экзосом, включенных в очищенные фракции. В некоторых вариантах осуществления плотность заряда измеряют посредством потенциометрического титрования, анионного обмена, катионного обмена, изоэлектрического фокусирования, оценки дзета-потенциала, капиллярного электрофореза, электрофореза в капиллярной зоне или гель-электрофореза.

4.8.4. Измерение плотности экзосомных белков

[00196] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают измерение плотности экзосомных белков на поверхности экзосом. Плотность на поверхности может быть рассчитана или представлена как масса на единицу площади, количество белков на площадь, количество молекул или интенсивность сигнала молекулы на экзосому, молярное количество белка и *т. д.* Плотность на поверхности может быть измерена экспериментальными способами, известными в данной области техники, например, с использованием биослойной интерферометрии (BLI), FACS, вестерн-блоттинга, флуоресцентного обнаружения (*например*, GFP-гибридного белка), нано-проточной цитометрии, ИФА, альфа-ИФА и/или денситометрии путем измерения полос на белковом геле.

4.9. Примеры

[00197] Следующие примеры приводятся с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, однако они не претендуют ни на ограничение объема того, что авторы рассматривают как свое изобретение, ни на то, что нижеприведенные эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (*например*,

количеств, значений температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части означают массовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление представляет атмосферное давление или давление, близкое к атмосферному. Могут употребляться стандартные сокращения, например, п. о., пара(-ы) оснований; т. п. н., тысяча(-и) пар нуклеотидов; пл, пиколитр(-ы); с или сек, секунда(-ы); мин, минута(-ы); ч или час, час(-ы); ак, аминокислота(-ы); нт, нуклеотид(-ы); и т. п.

[00198] В практике по настоящему изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методов химии, биохимии белков, рекомбинантных ДНК и фармакологии в пределах квалификации в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. *См, например*, Т.Е. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992).

4.9.1. Пример 1. Идентификация экзосомных белков

4.9.1.1. Сбор экзосом

[00199] Экзосомы собирали из супернатанта суспензионных культур клеток НЕК293 SF высокой плотности через 9 дней. Супернатант фильтровали и фракционировали с помощью анионообменной хроматографии и элюировали в ступенчатом градиенте хлорида натрия. Пиковая фракция с самой высокой концентрацией белка содержала экзосомы и загрязняющие клеточные компоненты. Фракцию пика выделяли и дополнительно фракционировали на градиенте плотности Optiprep™ (60% йодиксанол мас./об.) ультрацентрифугированием.

[00200] Фракцию экзосом концентрировали ультрацентрифугированием в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл для ротора SW 32 Ti при 133 900 g в течение 3 часов при 4 °C. Осажденный материал ресуспендировали в 1 мл ФСБ и 3 мл Optiprep™, доводя конечную концентрацию йодиксанола до 45%. Для градиента Optiprep™ готовили 4-уровневый стерильный градиент с 4 мл 45% йодиксанола, содержащего ресуспендированный материал, 3 мл 30% йодиксанола, 2 мл 22,5% йодиксанола, 2 мл 17,5% йодиксанола и 1 мл ФСБ в 12 мл пробирке Ultra-Clear (344059) для ротора SW 41 Ti.

Градиент Optiprep™ ультрацентрифугировали при 150 000 g в течение 16 часов при 4 °C для отделения фракции экзосом. Ультрацентрифугирование привело к получению верхней фракции, как было известно, содержащей экзосомы, средней фракции, содержащей клеточный дебрис средней плотности, и нижней фракции, содержащей агрегаты высокой плотности и клеточный дебрис (фиг. 1). Экзосомный слой затем осторожно собирали из верхних ~ 3 мл из пробирки.

[00201] Фракцию экзосом разводили в ~32 мл ФСБ в 38,5 мл пробирке Ultra-Clear (344058) и подвергали ультрацентрифугированию при 133 900 g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем ресуспендировали в минимальном объеме ФСБ (~ 200 мкл) и хранили при 4 °C.

4.9.1.2. Подготовка проб для анализа ЖХ-МС/МС

[00202] Для определения белков, специфичных для экзосом, верхнюю фракцию и нижнюю фракцию градиента Optiprep™ анализировали методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Все образцы были получены либо в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), либо в ФСБ и 5% сахарозе. Перед анализом концентрацию общего белка в каждом образце определяли анализом на бициньониновую кислоту (BCA), после чего каждый образец соответствующим образом разбавляли до 125 мкг/мл в буфере ФСБ. Затем 50,0 мкл каждого образца добавляли в отдельную микроцентрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую равный объем буфера для лизиса экзосом (60 mM Трис, 400 mM GdmCl, 100 mM ЭДТА, 20 mM ТСЕР, 1,0% Triton X-100), а затем вносили 2,0 мкл 1,0% раствора Triton X-100. Все образцы инкубировали при 55 °C в течение 60 минут.

[00203] Осаждение белка проводили добавлением 1250 мкл этанола при -20 °C. Для повышения эффективности образцы энергично встряхивали в течение приблизительно 10 минут и затем инкубировали при -20 °C в течение 60 минут. После инкубации образцы обрабатывали ультразвуком на водяной бане в течение 5 минут. Осажденный материал осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 15 000 g при 4 °C. Надосадочную жидкость декантировали, и гранулированный материал тщательно высушивали с использованием газообразного азота. Гранулы ресуспендировали в 30,0 мкл буфера для расщепления (30 mM Трис, 1,0 M GdmCl, 100 mM ЭДТА, 50 mM ТСЕР, pH 8,5), что также ослабляло дисульфидные связи. Свободные остатки цистеина алкилировали путем добавления 5,0 мкл раствора для алкилирования (375 mM йодацетамида, 50 mM Трис, pH 8,5) и инкубирования полученного раствора при комнатной температуре в темноте в течение по меньшей мере 30 минут.

[00204] После инкубации каждый образец разбавляли, используя 30,0 мкл 50 мМ Трис, рН 8,5, и начинали протеолитическое расщепление, добавляя 2,0 мкг трипсина. Все образцы смешивали и затем инкубировали в течение ночи при 37 °С. После инкубации активность трипсина прекращали добавлением 5,0 мкл 10% муравьиной кислоты. Перед анализом методом ЖХ-МС/МС каждый образец обессоливали с использованием спин-колонок Pierce C18. В конце этого процесса каждый образец высушивали и восстанавливали в 50,0 мкл воды с 0,1% муравьиной кислотой и переносили во флакон ВЭЖХ для анализа.

4.9.1.3. Анализ ЖХ-МС/МС

[00205] Образцы впрыскивали в систему для низкоскоростной хроматографии UltiMate 3000 RSCLnano (Thermo Fisher Scientific), и триптические пептиды загружали в улавливающую колонку Acclaim PepMap 100 C18 (75 мкм x 2 см, размер частиц 3 мкм, размер пор 100 Å, Thermo Fisher Scientific) с использованием загрузки подвижной фазы (MPL: вода, 0,1% муравьиной кислоты) при скорости потока 1000 мкл/мин. Пептиды элюировали и отделяли с градиентом подвижной фазы А (MPA :вода, 0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазы В (MPB: ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты) при скорости потока 300 нл/мин через аналитическую колонку EASY-Spray C18 (75 мкм x 25 см, размер частиц 2 мкм, размер пор 100 Å, Thermo Fisher Scientific). Ступенчатый градиент, используемый для элюирования, начинался при 2% MPB, где он выдерживался в течение 8 минут во время загрузки. Процент MPB затем увеличился с 2 до 17% за 35 минут, снова с 17 до 25% за 45 минут и, наконец, с 25 до 40% за 10 минут. Наиболее гидрофобные виды были удалены путем увеличения MPB до 98% в течение 5 минут и последующего выдерживания в течение 10 минут. Общее время выполнения способа составляло 135 минут и оставалось достаточно времени для повторного уравнивания колонки. Промывочные циклы выполнялись между неидентичными аналитическими инъекциями для минимизации переноса.

[00206] Масс-анализ проводили с помощью масс-спектрометра Q Exactive Basic (Thermo Fisher Scientific). Масс-спектры ионов-предшественников были измерены в диапазоне m/z 400–1600 Да с разрешением 70 000. 10 наиболее интенсивных ионов-предшественников были отобраны и фрагментированы в ячейке HCD с использованием энергии столкновения 27, и спектры МС/МС были измерены в диапазоне m/z 200–2000 Да с разрешением 35 000. Для фрагментирования были выбраны ионы с состояниями заряда от 2 до 4 и время динамического исключения было установлено равным 30 секундам. Список

исключений, содержащий 14 распространенных полисилоксанов, был использован для минимизации ошибочной идентификации известных загрязняющих веществ.

4.9.1.4. Обработка данных

[00207] Сначала белки сначала идентифицированы и определены количественно (без меток) с использованием программного обеспечения Proteome Discoverer (версия 2.1.1.21, Thermo Fisher Scientific) и алгоритма Sequest HT в сочетании с валидатором Target Decoy PSM. Поиски проводились относительно полной справочной базы данных Swiss-Prot Homo sapiens (таксономия 9606, версия 2017-05-10: 42 153 записи), а также пользовательской базы данных Uniprot, содержащей белки E1a (7 записей). Были использованы следующие параметры поиска: фермент, трипсин; максимум 2 пропущенных расщепления; минимальная длина пептида 6 остатков; допуск массы предшественника 10 ч./млн; и допуск массы фрагмента 0,02 Да. Поиск также включал специфические динамические модификации (окисление M; деамидирование N или Q; фосфорилирование S, T или Y; пироглутаминация пептид-концевой E и ацетилирование N-конца белка) и статические модификации (карбамидометилирование C).

[00208] В Tidd Decoy PSM Validator максимальная дельта C_n, а также строгие и ослабленные целевые частоты ложных обнаружений (FDR) были установлены на 1, потому что данные снова подвергались поиску с использованием программного обеспечения Scaffold (версия 4.8.2, Proteome Software Inc.). В Scaffold данные также были найдены с помощью алгоритма идентификации белков с открытым исходным кодом X!Tandem с использованием белкового порога 99,0%, минимума в 2 пептида и пептидного порога 95%.

[00209] Чтобы определить идентичность новых экзосом-специфических белков, сравнивали общие спектральные совпадения пептидов (PSM) для белков, обнаруженных в верхней фракции экзосом градиента Optiprep™, по сравнению с белками в нижней фракции. Как показано на фигуре 2, была обнаружена слабая корреляция между белками верхней фракции (ось Y) и белками нижней фракции (ось X). Белки, нанесенные над пунктирной линией, представляют собой белки, обогащенные экзосомами, а белки, расположенные ниже пунктирной линии, представляют собой белки, обогащенные загрязнителями. Важно отметить, что было выявлено несколько мембранно-ассоциированных белков, которые в большом количестве находились во фракции экзосом, включая (1) отрицательный регулятор рецептора F2 простагландина (PTGFRN), (2) базигин (BSG), (3) член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3), (4) член суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8), (5) интегрин бета-1 (ITGB1), (6) интегрин альфа-4 (ITGA4), (7) тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2) и (8) класс белков-переносчиков АТФ

(АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4). Как показано на картах покрытия триптическим пептидом на фигурах 3–5, масс-спектрометрическое исследование привело к широкому охвату РТGFRN (рисунок 3), IGSF8 (рисунок 4) и Basigin (рисунок 5). Вместе эти результаты демонстрируют, что существует множество трансмембранных белков, обогащенных очищенными экзосомными популяциями, которые могут быть полезны для очистки экзосом от гетерогенных популяций или для использования в качестве каркасов при создании инженерных экзосом.

4.9.2. Пример 2. Проверка экспрессии поверхностного белка

[00210] Чтобы подтвердить, что специфичные для экзосом белки, идентифицированные в масс-спектрометрических исследованиях, находились на поверхности экзосом в большом количестве, проводили белковый блоттинг в общем лизате клеток и очищенных популяциях экзосом из клеток НЕК293. Как показано на фигуре 6А, картина общего белка существенно различалась между общим клеточным лизатом (слева) и экзосомным лизатом (справа). В частности, в экзосомном лизате была сильная полоса при ~ 110 кДа, которая отсутствовала в общем клеточном лизате. Вестерн-блоттинг для РТGFRN выявил полосу с ожидаемым размером ~ 110 кДа в лизате экзосом, но не в лизате клеток (фиг. 6В), что указывает на то, что РТGFRN в большом количестве находится в экзосомах и может быть визуально обнаружен в общем лизате экзосом.

[00211] Масс-спектрометрические исследования показали наличие нескольких новых мембранных белков, связанных с экзосомой. Чтобы дополнительно подтвердить эту связь, экзосомные фракции очищали на самоформирующихся градиентах Optiprep™ и анализировали вестерн-блоттингом. Как показано на фиг. 7А, общий белок обнаружен во всех фракциях градиента, а маркерные белки экзосомы аликс и синтенин в значительном количестве находились во фракциях 2–6. Важно, что каждый из проанализированных новых белков поверхностных маркеров показал наличие значительного количества этих же фракций, что указывает на сильную и специфическую связь с экзосомами (фиг. 7В). Демонстрация того, что эти трансмембранные белки высоко экспрессируются и в значительном количестве находятся на экзосомах, дает возможность очищать экзосомы с помощью связывающего агента, направленного на любой из этих белков, а также генерировать поверхностно-модифицированные экзосомы с высокой экспрессией, содержащие гетерологичные белки, гибридизированные с любым из этих новых белков (фиг. 8).

4.9.3. Пример 3. Доменная характеристика PTGFRN

[00212] PTGFRN, BSG, IGSF3 и IGSF8 представляют собой однопроходные трансмембранные белки типа I с N-концом, обращенным к внеклеточной/внеэзолюлярной среде, и С-концом, расположенным в просвете цитоплазмы/экзосомы, которые содержат по меньшей мере два повторяющихся иммуноглобулина V (IgV), как показано на фиг. 8. PTGFRN был поверхностным белком, в наибольшем количестве обнаруженным в масс-спектрометрическом анализе, показанном на фиг. 2. Экспрессионные конструкции, кодирующие гибридные белки между GFP и полноразмерным PTGFRN или различными укороченными на IgV мутантами PTGFRN, описанными на фиг. 9А и В, стабильно экспрессируются в клетках HEK293. Экзосомы выделяли из культуры клеток HEK293 с использованием способа, описанного в примере 1, и анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела к GFP. Как показано на фиг. 9В, экспрессия гибридных белков между GFP и полноразмерным или усеченным PTGFRN была обнаружена в очищенных экзосомах. Интересно, что делеция первого домена IgV приводила к полосе с более низкой молекулярной массой (отмеченной как «расщепленный продукт»), которая не обнаруживалась при сверхэкспрессии белка полной длины. Этот меньший продукт был последовательно обнаружен у всех усеченных мутантов, что позволяет предположить, что он был получен в результате расщепления протеазой. Экзосомы, содержащие различные гибридные белки GFP-PTGFRN, анализировали на SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad, Inc.) для измерения общего количества экзосомного белка. Результаты предоставлены на фиг. 10. Экспрессия гибридного белка GFP и полноразмерного PTGFRN была легко обнаруживаемой и очень распространенной на уровне ~ 50% от общего количества белков в очищенных экзосомах (дорожка 2). Продукт расщепления с более низкой молекулярной массой (обозначенный как «расщепленный продукт») не был четко виден и, таким образом, отсутствовал в нативных экзосомах или экзосомах со сверхэкспрессией полноразмерного PTGFRN (дорожки 1 и 2), что указывает на то, что первый домен IgV (IgV 1) на N-конце белка может предотвращать расщепление PTGFRN.

[00213] Затем полноразмерные PTGFRN и различные укороченные мутанты PTGFRN стабильно экспрессировались с завлечением N-концевой метки FLAG в клетках HEK293 (фиг. 11А). Экзосомы из клеточной культуры собирали и анализировали вестерн-блоттингом с антителом к FLAG. Результаты предоставлены на фиг. 11В. В отличие от гибридных белков, содержащих GFP на С-конце (фиг. 9 и 10), гибридные белки, содержащие метку FLAG на N-конце, не дают полосы с низкой молекулярной массой (помеченной как «не продукт расщепления» на фиг. 11В) и более короткие усечения были

обнаружены на низком уровне. Этот результат предполагает, что событие расщепления, вероятно, приводит к удалению N-конца белка, связанного с эпитопом FLAG, используемого для вестерн-блоттинга (фиг. 11B).

[00214] PTGFRN плохо обнаруживается в клеточном лизате, а смесь интактного и расщепленного PTGFRN обнаруживается в очищенных экзосомах, как это следует из результатов вестерн-блоттинга, представленных на фиг. 6A и B. Это указывает на то, что PTGFRN расщепляется при локализации и интеграции в экзосомную мембрану или во время образования экзосом. ADAM10 (домен 10 дезинтегрина и металлопротеиназы) представляет собой обычный экзосомный белок и мембраносвязанную металлопротеазу. Клетки HEK293 трансфицировали Cas9 и четырьмя направляющими РНК, нацеленными на locus ADAM10 (CRISPR32174_SG, CRISPR726928_SG, CRISPR726931_SG и CRISPR726933_SG, Thermo Fisher Scientific) для создания клеток, нокаутных по ADAM10. Нокаутные по ADAM10 клетки (ADAM 10-) или клетки дикого типа (ADAM10 +) затем стабильно трансфицировали либо конструкцией, кодирующей гибридный белок, содержащий полноразмерный PTGFRN, гибридизированный с GFP, либо другим гибридным белком, содержащим усеченный PTGFRN, в котором отсутствуют первые три домена IgV, гибридизированные с GFP (PTGFRN_IgV3-GFP). Экзосомы выделяли из этих клеток и экспрессию гибридных белков измеряли с помощью PAGE общего белка и вестерн-блоттинга с использованием антитела к GFP. На фиг. 12A показано, что на каждую дорожку были загружены сопоставимые количества общих белков. Вестерн-блоттинг с использованием антитела к ADAM10 (ab124695; Abcam) показал эффективное удаление ADAM 10 в нокаутированных клетках (фиг. 12B). Вестерн-блоттинг с использованием антитела к GFP показал высокий уровень экспрессии гибридных белков, содержащих полноразмерные PTGFRN и GFP в клетках дикого типа (ADAM10 +) и в клетках, нокаутированных по ADAM10 (ADAM10 -), как показано на фиг. 12C (дорожки 1 и 2). Этот результат согласуется с результатом на фиг. 9B, где не было обнаружено расщепления гибридных белков, содержащих полноразмерный PTGFRN. Интересно, что продукт расщепления, ранее обнаруженный для PTGFRN_IgV3-GFP, был обнаружен в клетках дикого типа, но отсутствовал в клетках, нокаутированных по ADAM10 (фиг. 12C, дорожки 3 и 4). Это говорит о том, что ADAM10 опосредует расщепление экзосомных фрагментов PTGFRN. Этот результат также предполагает, что гибридный белок, содержащий усеченные фрагменты PTGFRN, будет более успешно экспрессироваться на экзосомах из клеток, в которых отсутствует ADAM10 (ADAM10 -).

[00215] PTGFRN можно использовать в качестве привлекательного партнера для конденсации для прикрепления/загрузки экзосом с высокой плотностью, но из-за его размера (~100 кДа) предпочтительной будет меньшая усеченная версия, позволяющая коэкспрессию больших биологически активных молекул. ADAM10-зависимое расщепление, обнаруженное у каждого из усеченных мутантов IgV, представляет проблему для загрузки с высокой плотностью, поскольку определенный процент любого гибридного белка будет отщепляться от поверхности экзосомы, уменьшая степень загрузки/отображения. Чтобы идентифицировать минимальный фрагмент PTGFRN, который облегчает отображение экзосомной поверхности высокой плотности без проблем с протеазным расщеплением, PTGFRN, в котором отсутствуют пять из шести доменов IgV (PTGFRN_IgV6), экспрессировали в виде конденсата с меткой FLAG и белком-партнером конденсации (фиг. 13). Экспрессия гибридных белков, содержащих PTGFRN_IgV6, дала прогнозированный продукт расщепления, идентифицированный ранее (фиг. 14B, №451). Также были протестированы мутанты серийного укорочения PTGFRN_IgV6, в которых одновременно отсутствовали четыре дополнительные аминокислоты, и удаление 12 аминокислот привело к получению экзосом, которые не подвергались расщеплению PTGFRN (фиг. 14A,, фиг 14B, №454). PTGFRN №454 представляет собой полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 33. Кроме того, поскольку метка FLAG является N-концевой по отношению к сайту расщепления, более короткие усечения PTGFRN_IgV6 приводили к более высокой экспрессии гибридного белка, что позволяет предположить, что расщепление не происходит при этих усечениях (фиг. 14C).

[00216] Результаты, представленные на фиг. 15, также позволяют предположить, что полноразмерные PTGFRN (FL) и PTGFRN_454 (sIgV) были бы идеальными партнерами по конденсации для экспрессии высокой плотности люминального (С-терминального слияния) или поверхностного (N-терминального) белка на и/или в экзосомах. Чтобы проверить эту гипотезу, несколько каркасных белков были протестированы на их способность продуцировать экзосомы высокой плотности. Гибридные белки, содержащие каркасный белок и GFP, были экспрессированы в клеточной культуре, в частности, гибридные белки, содержащие GFP, гибридный с люминальной стороной часто используемого каркаса pDisplay (рецептор PDGF), PalmPalm (последовательность пальмитоилирования), CD81 или полноразмерного PTGFRN (FL) или PTGFRN_454 (sIgV). Титрование дозы экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих каждый гибридный белок, продемонстрировало, что гибридные белки PTGFRN приводят к гораздо большей флуоресценции GFP, чем любой другой каркас, включая хорошо известный белок

экзосомы CD81. По сравнению с каркасом pDisplay, полноразмерные PTGFRN и sIgV привели к более чем 25-кратному повышению эффективности загрузки (фиг. 15). Эти результаты предполагают, что использование полноразмерного PTGFRN или усеченного PTGFRN (sIgV), который является достаточно коротким для удаления сайта расщепления, в качестве партнера конденсации допускает загрузку или отображение экзосом с высокой плотностью.

4.9.4. Пример 4. Сверхэкспрессия IGSF8 не приводит к отображению экзосом с высокой плотностью

[00217] Уровень экспрессии PTGFRN предполагает, что он был бы идеальным партнером по гибридизации для получения сконструированных экзосом. Чтобы определить, подходят ли другие члены семейства иммуноглобулинсодержащих белков для конструирования экзосом, клетки HEK293 стабильно трансфицировали гибридным белком IGFS8-GFP и полученные в результате экзосомы очищали (фиг. 16A). Нативные экзосомы и экзосомы IGSF8-GFP анализировали на SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad, Inc.), который использует триптофан-связывающий краситель для обнаружения белков, как показано на фиг. 16B. IGSF8 содержит 10 остатков триптофана, что позволяет легко его обнаружить. Вестерн-блоттинг с использованием антитела к GFP подтвердил экспрессию IGSF8-GFP на сверхэкспрессирующих экзосомах (фиг. 16B, внизу). Интересно, что когда экзосомы IGSF8-GFP тестировали на флуоресценцию GFP по сравнению с GFP-гибридными с каркасом pDisplay (рецептор PDGF), CD81 или полноразмерными PTGFRN (FL) или PTGFRN_454 (sIgV), IGSF8 (FL IGSF8) не показывал большее количество GFP по сравнению с низкоуровневым стохастическим отображением, которое наблюдается с помощью pDisplay (фиг. 17). Этот результат свидетельствует о том, что не каждый член семейства IgV можно использовать в качестве гибридного белка для конструирования экзосомной поверхности высокой плотности/люминальной нагрузки, и что PTGFRN и другие члены семейства превосходят IGSF8 в этом отношении. Однако экспрессия IGSF8 была обнаружена на высоких уровнях на поверхности немодифицированных экзосом, что позволило бы использовать IGSF8 в качестве мишени для аффинной очистки экзосом.

4.9.5. Пример 5. Экспрессия и характеристика внеклеточного домена PTGFRN в клетках млекопитающих

[00218] Внеклеточный домен (ECD) PTGFRN имеет массу 98 кДа и содержит шесть tandemных повторов IgV. ECD PTGFRN может быть желательной мишенью для реагентов для аффинной очистки экзосом из-за его размера и высоких уровней экспрессии. Чтобы

охарактеризовать этот сегмент PTGFRN, ECD PTGFRN экспрессировали в виде гибридного белка с эндогенным сигнальным пептидом на N-конце (SP) и сайтом расщепления PAR1 и доменом Fc на C-конце (фиг. 18). PAR1 является субстратом для тромбина и может быть использован для элюирования гибридных белков Fc с использованием смолы с протеином А. PTGFRN имеет девять прогнозируемых N-связанных сайтов гликозилирования и 6 прогнозируемых дисульфидных связей, которые исключают использование бактериальных систем экспрессии для производства эндогенных гликопротеинов. ECD PTGFRN сверхэкспрессировали с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific), которая используется для получения рекомбинантных белков млекопитающих с высоким выходом. Кондиционированные среды для культивирования клеток из трансфицированных клеток Expi293 фильтровали по размеру 0,2 мкм и очищали на протеине А с последующим элюированием глицином с низким рН и немедленной нейтрализацией. Метку Fc удаляли обработкой тромбином и пул расщепленного белка повторно обрабатывали протеином А. Проточный поток собирали, концентрировали и полировали с использованием препаративной эксклюзионной хроматографии. Очищенный ECD PTGFRN анализировали гель-фильтрационной хроматографией в ФСБ рН 7,4 с использованием колонки Superdex 200 (GE Healthcare) и определяли при 280 нм УФ-флуоресценции. На фигуре 19А показан единственный пик элюирования при ~55 мл, а на фигуре 19В показан продукт с одним белком с прогнозируемым размером ECD PTGFRN при анализе пика элюата на денатурирующем SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad), Inc.), что указывает на то, что ECD PTGFRN может быть очищен из клеток млекопитающих.

[00219] Для подтверждения надлежащей экспрессии ECD PTGFRN, очищенный белок анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии/многоугольного рассеяния света (SEC-MALS), используя BSA и антитело к VLA4 в качестве стандартов для сравнения. Рекомбинантный ECD PTGFRN элюировали с приблизительно 2-кратной прогнозируемой молекулярной массой (198 кДа в отличие от прогнозируемой молекулярной массы, 98 кДа; фиг. 20А). Чтобы определить, образует ли PTGFRN ECD гомодимер в растворе, рекомбинантный PTGFRN ECD пропускали через аналитическую колонку SEC (Tosoh, 7,8 × 30 см, G3000SW xl) в ФСБ в отсутствие хлорида гуанидия (GuHCl) или в присутствии 1М или 2М хлорида гуанидия (GuHCl). На фиг. 20В показан профиль элюирования ECD PTGFRN при повышении GuHCl (без GuHCl (кривая, обозначенная «PTGFRN»), 1М GuHCl (кривая, обозначенная «PTGFRN + 1М GuHCl»), или 2М GuHCl (кривая, обозначенная «PTGFRN + 2М GuHCl»)) и превращение прогнозируемого димерного пика в мономерный пик. Эти результаты позволяют

предположить, что ECD PTGFRN образует гомодимер и что димеризация PTGFRN может происходить естественным образом на поверхности экзосомы.

4.9.6. Пример 6. Матрица белка PTGFRN

[00220] PTGFRN плохо описан в литературе, и его роль как экзосомного белка в значительной степени не изучена. PTGFRN также известен как CD9 Partner 1 (CD9P-1) из-за его взаимодействия с CD9, который также обнаружен на поверхности экзосом. Для дальнейшего понимания того, с какими белками связывается PTGFRN, рекомбинантный монобиотинилированный ECD PTGFRN человека был создан и зондирован на микромассиве белков, содержащем более 20 000 белков, охватывающих 81% человеческого протеома (CDI Laboratories). Анализ связывания проводили при pH 5,6 и 7,4, чтобы представить pH подкисляющей эндосомы и цитозоля соответственно. Девять положительных совпадений были идентифицированы при pH 7,4 и 16 — при pH 5,6. Три белка (LGALS1, галектин-1; FCN1, фиколин-1; MGAT4B, альфа-1,3-маннозилгликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза В) были идентифицированы как при pH 5,6, так и при pH 7,4 (фиг. 21). Известно, что LGALS1 связывается с мономерными углеводами и комплексными гликанами, но не участвует в качестве партнера по связыванию PTGFRN. Для подтверждения взаимодействия между PTGFRN и LGALS1 биотинилированный рекомбинантный ECD PTGFRN связывали со оптическим зондом стрептавидина и анализировали с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием Octet® RED96 (Pall). Дозозависимое связывание галектина-1 с PTGFRN было подтверждено BLI (фиг. 22). Взаимодействие между LGALS1 и PTGFRN было обратимым и конкурировало с лактозой в дозозависимой манере (фиг. 23), демонстрируя специфичность этого взаимодействия. Такие результаты также предполагают, что экзосомы могут быть очищены с использованием партнеров по связыванию PTGFRN в качестве аффинных реагентов.

4.9.7. Пример 7. Связывание антитела к PTGFRN с PTGFRN или экзосомами

[00221] Биотинилированный PTGFRN связывали со стрептавидиновым зондом Octet® RED96 (Pall) и инкубировали в ФСБ + 0,1% Твин 20 с увеличивающимися концентрациями моноклонального крысиного антитела к CD315, что является другим названием PTGFRN (MABT883, Millipore Sigma). Было обнаружено дозозависимое связывание, что свидетельствует о специфическом распознавании PTGFRN антителом (фиг. 24). Чтобы определить, может ли антитело к CD315 связываться с экзосомами, антитело к CD315 связывали с зондом протеина L и инкубировалось с увеличивающимися

количествами очищенных Ортіреп™ экзосом НЕК293 (фиг. 25). Как показано на фиг.25, дозозависимое отклонение после инкубации с очищенными экзосомами показывает, что антитело к CD315 может распознавать эндогенный PTGFRN на поверхности экзосомы. Аналогичный эксперимент был выполнен с клетками НЕК293, стабильно трансфицированными полноразмерным PTGFRN для генерации сверхэкспрессирующих PTGFRN экзосом (экзосомы PTGFRN ++). Сверхэкспрессирующие экзосомы инкубировали с иммобилизованным антителом к CD315, что приводило к дозозависимому отклонению, указывающему на специфическое связывание между антителом и экзосомами (фиг. 26). Чтобы сравнить степень связывания антител с нативными или сверхэкспрессирующими PTGFRN экзосомами, экзосомы 1.1E11 каждого сорта инкубировали в присутствии антитела к CD315 и измеряли с помощью BLI. Как показано на фиг. 27, экзосомы со сверхэкспрессией PTGFRN приводили к гораздо большему отклонению, чем нативные экзосомы, что указывает на то, что повышенные уровни PTGFRN приводят к большему связыванию, и что связывание PTGFRN может поэтому использоваться для очистки экзосом.

4.9.8. Пример 8. Распознавание доменов антителами к PTGFRN

[00222] Результаты примеров 6 и 7 показывают, что экзосомы могут быть очищены на основе аффинных взаимодействий с PTGFRN. Полноразмерный PTGFRN и ряд усеченных мутантов были экспрессированы в виде монобиотинилированных рекомбинантных белков с использованием системы Expi293, описанной выше (фиг. 28, слева). Каждое из усечений инкубировали с антителом к CD315 и связывание измеряли с помощью BLI. Только полноразмерный PTGFRN связывал антитело против CD315, указывая на то, что эпитоп находится на N-конце белка в первом домене IgV.

[00223] Пулы поликлональных антител были получены путем инъекции кроликам рекомбинантного полноразмерного эктодомена PTGFRN, подобного конструкции 1 на фиг. 28, но без последовательности биотинилирования. Пулы поликлональных антител очищали от терминальной крови с помощью белка А и тестировали на реакционную способность в отношении фрагментов усечения PTGFRN. Каждый из фрагментов анализировали на денатурирующем SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad, Inc.), подтверждающем экспрессию белков корректной длины (фиг. 29А). Затем проводили вестерн-блоттинг образцов с использованием объединенных поликлональных антител кролика, и в каждой полосе обнаруживали полосы надлежащего размера, а также полосы контрольных нативных экзосом, подтверждая специфическую реактивность с

поликлональными антителами к PTGFRN (фиг. 29B). Чтобы подтвердить этот результат, каждый из биотинилированных фрагментов PTGFRN был проанализирован с помощью BLI, и результаты представлены на фиг. 30. Инкубация с пулами поликлональных антител показала связывание при всех условиях, демонстрируя широкую реактивность с антителами для каждого домена IgV PTGFRN.

4.9.9. Пример 9. Экзосомы из различных клеточных линий экспрессируют членов семейства IgV и другие новые поверхностные белки

[00224] Клеточные линии различных тканей (HEK293SF, почка; HT1080, соединительная ткань; K562, костный мозг; MDA-MB-231, грудь; Raji, лимфобласт) выращивали до логарифмической фазы и переносили в среды с добавлением обедненной экзосомами сывороткой на ~6 дней. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC), полученные из костного мозга, выращивали на 3-х мерных микроносителях в течение пяти дней и добавляли в бессывороточные среды в течение трех дней. Супернатант выделяли и экзосомы очищали с использованием способа ультрацентрифугирования с градиентом плотности Optiprep™, описанным выше. Каждую из очищенных экзосом анализировали с помощью ЖХ-МС/МС, как описано выше, количественно определяли количество совпадений спектра пептидов (PSM) для нескольких белков поверхности экзосом (PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 и CD9), а результаты представлены на фиг. 31. Тетраспанины CD81 и CD9 обнаруживались в большинстве очищенных экзосомных популяций, но в некоторых случаях были такими же или ниже, чем у других поверхностных маркеров (*например*, по сравнению с CD9 с PTGFRN, BSG и SLC3A2 во всех клеточных линиях). Это открытие указывает на то, что впервые идентифицированные поверхностные маркеры, в том числе члены семейства белков IgV, являются подходящими мишенями для разработки методов аффинной очистки экзосом для нескольких неродственных клеточных линий, полученных из разных тканей.

4.9.10. Пример 10. Генерация клеток, нокаутных по PTGFRN и экзосом

[00225] Для генерирования клеток, нокаутных по PTGFRN, клетки HEK293SF трансфицировали рекомбинантным Cas9 и направляющими РНК, нацеленными на экзон 2 и трансмембранную область PTGFRN. Руководящие РНК, нацеленные на экзон 2, сгенерированные ThermoFisher, включали: (1) CGTTGGCAGTCCGCCTTAAC, CRISPR926045_CR (SEQ ID NO: 36); (2) CATAGTCACTGACGTTGCAG, CRISPR926054_CR (SEQ ID NO: 37); (3) TTGTGGAGCTTGCAAGCACC,

CRISPR926055_CR (SEQ ID NO: 38) и (4) GTTCTTTATGTGGAGCTCCA, CRISPR926071_CR (SEQ ID NO: 39). Направляющие РНК, нацеленные на трансмембранную область, генерируемую ThermoFisher, включали (1) TATCCCTTGCTGATCGGCGT, TMgRNA5.1.97 (SEQ ID NO: 40); (2) GCTGCAGTACCCGATGAGAC, TMgRNA3.7.87 (SEQ ID NO:41).

[00226] Целевое редактирование гена и делеция экзона 2 и трансмембранной области PTGFRN были подтверждены с помощью ПЦР и секвенирования. Экзосомы из пяти клональных линий клеток, нокаутированных по PTGFRN (PTGFRN KO), очищали, как описано выше, и анализировали с помощью PAGE и вестерн-блоттинга с использованием пулов поликлональных антител кролика, описанных в примере 8. Как показано на фиг. 32B, полосы, соответствующие PTGFRN, не были обнаружены ни в одном из пяти нокаутных клонов, что демонстрирует целевую делецию PTGFRN в клетках-продуцентах и очищенных экзосомах. Важно, что выход продукции экзосом и общие закономерности белковых полос (фиг. 32A) не были затронуты делецией PTGFRN, что указывает на то, что экзосомы PTGFRN KO можно использовать в экспериментальных целях.

[00227] Чтобы определить, изменила ли делеция PTGFRN протеомный профиль очищенных экзосом, нативные экзосомы и экзосомы PTGFRN KO были проанализированы сравнительной масс-спектрометрией. Как показано на фиг. 33, содержание белка в нативных экзосомах и PTGFRN KO было очень сходным, за исключением PTGFRN, который не обнаруживался в экзосомах PTGFRN KO. Не было значительного различия в экзосомных маркерах аликс, CD81, TSG101 и CD9 между группами. Эти данные показывают, что PTGFRN может быть удален из экзосом без изменения протеомного профиля экзосом.

[00228] Чтобы убедиться, что делеция PTGFRN привела к полному функциональному удалению PTGFRN, и продемонстрировать, что антитело к PTGFRN (анти-CD315), описанное в Примере 7, специфично к PTGFRN, были проведены эксперименты по связыванию экзосом с использованием ВЛ с нативными экзосомами, экзосомами, сверхэкспрессирующими PTGFRN. (PTGFRN ++)) и экзосомами PTGFRN KO. Аналогично экспериментальным результатам, описанным на фиг. 27 и в примере 7, экзосомы PTGFRN ++ связывались с иммобилизованным антителом к CD315 с большей аффинностью чем нативные экзосомы (фиг. 34). Напротив, равное количество экзосом PTGFRN KO не связывалось с иммобилизованным антителом (фиг. 34), демонстрируя, что делеция PTGFRN устраняет взаимодействие экзосом PTGFRN KO с анти-PTGFRN аффинными реагентами.

4.9.11. Пример 11. Экзосомы могут быть очищены с помощью аффинных реагентов, распознающих PTGFRN.

[00229] Собственные моноклональные антитела к PTGFRN были получены у иммунизированных кроликов, как описано в Примере 8. Для определения того, могут ли экзосомы быть выделены путем вытягивания PTGFRN, 5×10^{10} нативных или PTGFRN КО экзосом было добавлено или к магнитным микроносителям с протеином А (№ по каталогу 10001D; Invitrogen) или к микроносителям с протеином А, функционализированным 10мкг пользовательских моноклональных антител к PTGFRN. Каждую смесь из экзосом и гранул инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и трижды промывали ФСБ + 0,1% по объему TWEEN® 20. Промытые микроносители элюировали путем инкубации в элюирующем буфере (20 mM глицин, pH 3,6, 2x буфера для образцов Laemmli (№ по каталогу 1610737, Bio-Rad, Inc.), 10% β-меркаптоэтанол) при 95 °C в течение 10 минут и кипящий супернатант анализировали с помощью PAGE и анти-PTGFRN вестерн-блоттинга с использованием другого специального моноклонального антитела к PTGFRN. Общий белок, проанализированный с помощью PAGE, показал полосу, соответствующую молекулярной массе PTGFRN, только в нативном экзосомном состоянии в присутствии антитела к PTGFRN (фиг. 35А). Эта полоса была подтверждена как PTGFRN с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 35В). HC и LC соответствуют тяжелой цепи и легкой цепи соответственно антитела к PTGFRN, используемого для очистки. Эти данные показывают, что экзосомы, содержащие PTGFRN, могут быть очищены из раствора путем вытягивания PTGFRN на поверхности экзосомы.

4.9.12. Пример 12. Разнообразные гетерологичные белки могут быть гибридизованы с PTGFRN для облегчения сверхэкспрессии на экзосомах

[00230] Экспериментальные данные, представленные на фиг. 11, 13, 14 и 15, демонстрируют, что некоторые белки могут быть значительно сверхэкспрессированы с использованием PTGFRN в качестве каркаса сверхэкспрессии. Сверхэкспрессия с использованием PTGFRN была значительно лучше, чем экспрессия с использованием других каркасов сверхэкспрессии экзосом. Чтобы определить ширину белков, которые могут быть успешно сверхэкспрессированы путем слияния с PTGFRN, было создано несколько сконструированных экзосом. Фактор VIII (FVIII) является крупным ферментом, вовлеченным в каскад коагуляции. Фрагмент FVIII, лишенный В-домена (BDDFVIII), был гибридизован с N-концом (внешней стороной) PTGFRN и экспрессирован в клетках

HEK293SF. Очищенные экзосомы анализировали с помощью PAGE (фиг. 36А) и вестерн-блоттинга (фиг. 36В). Легкая цепь FVIII, созданная путем обработки полноразмерного FVIII в клеточной культуре, была легко обнаружима в сконструированных экзосомах, но не в нативных экзосомах, с использованием антител к FVIII (фиг.36В; № по каталогу GMA-8025, Green Mountain Antibodies). FVIII полной длины имеет молекулярную массу 165 кДа, что значительно больше молекулярной массы PTGFRN (~120 кДа), демонстрируя, что очень большие белки, включая ферменты, могут успешно экспрессироваться в конденсации с PTGFRN на поверхности экзосом.

[00231] Все описанные выше партнеры по конденсации PTGFRN представляют собой белки с упорядоченной трехмерной структурой. Пептиды XTEN® (Amunix; Mountain View, CA) имеют длинные неупорядоченные повторяющиеся последовательности с резко увеличенной кажущейся молекулярной массой по сравнению с их первичной последовательностью. Гибридная конструкция, кодирующая XTEN (белок, содержащий рандомизированные 288 аминокислот, которые включают 8% Ala, 12% Glu, 18% Gly, 17% Pro, 28% Ser и 17% Thr), фрагмент PTGFRN (SEQ ID NO: 33) и GFP стабильно экспрессируется в клетках HEK293SF. Очищенные экзосомы выделяли и анализировали с помощью PAGE (фиг. 37А) и вестерн-блоттинга (фиг. 37В). Как показано на фиг. 37В, GFP на С-конце гибридного белка детектировали вестерн-блоттингом, демонстрируя трансляцию гибридного белка внутри рамки на очищенных экзосомах. Эти результаты демонстрируют, что неструктурированные белки также могут стабильно экспрессироваться в конденсации с PTGFRN. Кроме того, эти результаты показывают, что гетерологичные белки могут быть одновременно гибридизированы с N- и С-концами PTGFRN, что приводит к появлению интактных белков поверхности экзосомы и в просвете соответственно. Таким образом, PTGFRN представляет собой прочный каркас, который поддается конденсации белков размером от нескольких аминокислот (*например*, метка FLAG) до более 150 кДа (BDDFVIII) различных структур и классов на одном из N- или С-концов или на обоих концах.

4.9.13. Пример 13. Последовательности PTGFRN лучше экспрессируют гетерологичные белки на экзосомах, чем другие системы экзосомной сверхэкспрессии

[00232] Данные в примере 3 и на фиг. 15 демонстрируют, что PTGFRN превосходит другие каркасы экзосом по экспрессии гетерологичных белков в основной массе популяции экзосом. Эти результаты, однако, не могут дать четкой дифференциации между повышенной экспрессией в подгруппе экзосом и равномерно повышенной экспрессией во

всех экзосомах в очищенной популяции. Для целей разработки единого экзосомного терапевтического средства предпочтительно иметь гомогенную популяцию экзосом с равномерно повышенной экспрессией, а не гетерогенную популяцию экзосом, включающую экзосомы с высокой сверхэкспрессией и немодифицированные экзосомы. Чтобы решить эту проблему, мы охарактеризовали отдельные экзосомы в популяциях экзосом на основании принципа *particle-by-particle* с помощью нано-проточной цитометрии с использованием Flow NanoAnalyzer (NanoFCM, Inc.; Xiamen, China). Flow NanoAnalyzer может измерять светорассеяние и флуоресцентное излучение отдельных наночастиц диаметром до 10 нм. Нативные экзосомы и модифицированные экзосомы, кодирующие люминальные конденсации GFP с CD9, CD81 или PTGFRN, выделяли из стабильно трансфицированных клеток HEK293SF и очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности Optiprep®, как описано выше. Анализ с помощью Flow NanoAnalyzer, настроенного на возбуждение 488/эмиссию 509, продемонстрировал, что экзосомы CD9-GFP были ~ 48% положительными, экзосомы CD81-GFP были ~ 80% положительными, а экзосомы PTGFRN-GFP были ~ 97% положительными в отношении экспрессии GFP в анализе *particle-by-particle* (фиг. 38, слева). Кроме того, средняя интенсивность флуоресценции (MFI) показывала аналогичную тенденцию: экзосомы PTGFRN-GFP были примерно в 2 раза ярче, чем экзосомы CD81-GFP в целом (фиг. 38, справа). Эти данные демонстрируют, что экзосомы, модифицированные для экспрессии гибридного белка PTGFRN-GFP, представляют собой гомогенную популяцию экзосом, высокоэкспрессирующую гибридный белок, и общий уровень экспрессии был намного выше, чем у нативных или других модифицированных экзосом, экспрессирующих GFP, гибридизированный с другими каркасами экзосом.

[00233] N-конец PTGFRN состоит из прогнозированной сигнальной пептидной последовательности (аминокислоты 1–21; SEQ ID NO: 8). Чтобы определить, может ли эта последовательность усиливать экспрессию трансгена на очищенных экзосомах, сигнальный пептид PTGFRN сравнивали с сигнальным пептидом гетерологичного белка DsbA11. Клетки HEK293SF стабильно трансфицировали экспрессирующими конструкциями, кодирующими (i) полноразмерный PTGFRN дикого типа, гибридизированный с GFP; (ii) короткий фрагмент PTGFRN (454-PTGFRN; SEQ ID NO: 33) содержащий эндогенный сигнальный пептид PTGFRN, гибридизированный с GFP; или (iii) короткий фрагмент PTGFRN (454-PTGFRN; SEQ ID NO: 33) с заменой эндогенного сигнального пептида PTGFRN сигнальным пептидом из бактериального гена DsbA11 (Koerber *et al.*, Journal of molecular biology, 427.2 (2015): 576–586), гибридизированным с GFP. Как показано на фиг. 39, клетки, экспрессирующие GFP-гибридный белок,

содержащий полноразмерный или усеченный PTGFRN-GFP, содержащий эндогенный сигнальный пептид PTGFRN, продуцировали экзосомы, включая GFP, на аналогично высоких уровнях. Клетки, экспрессирующие GFP-гибридный белок, содержащий усеченный PTGFRN с сигнальным пептидом DsbA11, однако, продуцировали экзосомы, экспрессирующие GFP на гораздо более низких уровнях. Эти результаты демонстрируют, что сигнальный пептид PTGFRN способствует высокой плотности покрытия сконструированных экзосом.

4.9.14. Пример 14. Фрагменты антител могут быть функционально экспрессированы на поверхности экзосом с использованием PTGFRN в качестве каркаса

[00234] Экспериментальные данные, описанные выше, демонстрируют, что PTGFRN представляет собой прочный каркас, способный к сверхэкспрессии многих классов белков. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой важный класс терапевтических пептидов с разнообразным применением при многих способах лечения многих заболеваний. Чтобы определить, возможна ли экспрессия функционального антигенсвязывающего фрагмента на экзосомах с использованием PTGFRN в качестве каркаса, клетки HEK293F стабильно трансфицировали для достижения сверхэкспрессии гибридного белка, состоящего из одноцепочечного Fab, распознающего лектин CLEC9A (клон 10B4, Millipore Sigma, № по каталогу 04-148 и как описано в Caminschi *et al.*, Blood, 112: 8 (2008)), полноразмерного PTGFRN, GFP и метки FLAG (фиг. 40A). Очищенные Optiprep™ экзосомы обрабатывали на белковом геле без пятен и выполняли блоттинг с антителом к метке FLAG, показывающий значительную сверхэкспрессию полноразмерного гибридного белка (фиг. 40B).

[00235] Очищенные анти-CLEC9A экзосомы были протестированы BLI на связывание с иммобилизованным CLEC9A-Fc (R&D Systems, № по каталогу 6049-CL-050; и как описано в Uto *et al.*, Nature Communications 7: 11273 (2016)). CLEC9A-Fc связывали с зондами протеина A в конечной концентрации 0,5 мкг/мл в ФСБ + 0,1% (об./об.) Tween20 и инкубировали с 1×10^{11} немодифицированных экзосом или экзосом, модифицированных для экспрессии гибридного белка, состоящего из одноцепочечного Fab, распознающего лектин CLEC9A, полноразмерного PTGFRN, GFP и метки FLAG («αCLEC9A-PTGFRN»), показанного на фиг. 40A. Как показано на фиг. 41, только экзосомы анти-CLEC9A-PTGFRN, связанные с зондом CLEC9A-Fc, демонстрируют функциональное распознавание между маркером клеточной поверхности и экзосомами, сконструированными для сверхэкспрессии антигенсвязывающего фрагмента.

4.9.15. Пример 15. Мезенхимальные стволовые клетки экспрессируют PTGFRN

[00236] Терапевтические экзосомы из нескольких типов клеток были использованы в исследовательских и клинических целях. Было показано, что стволовые клетки нескольких разновидностей, в том числе стволовые клетки-предшественники нейронов и мезенхимальные стволовые клетки, имеют терапевтическую пользу, но большинство исследований с использованием этих клеток основаны на природных немодифицированных экзосомах. Поэтому было бы желательно сконструировать такие клеточные линии для сверхэкспрессии специфических лигандов или других белков-мишеней. Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга, выращивали в 3-х мерной биореакторной системе объемом 1,1 л на основе микроносителя. После пяти дней размножения клеток питательную среду удаляли и клетки культивировали еще три дня в бессывороточной среде. Бессывороточную среду фильтровали через фильтр с порами 100 мкм для удаления микроносителей и центрифугировали на низкой скорости для удаления клеточного дебриса и загрязнений. Осветленную среду затем очищали ультрацентрифугированием с градиентом плотности Optiprep™, как описано в примере 1. Очищенные экзосомы из клеток HEK293SF и MSC анализировали вестерн-блоттингом на наличие PTGFRN и установленных экзосомных белков АЛИКС, TSG101, CD63, CD9 и CD81. Как показано на фиг. 42, все эти белки экспрессировались как в клетках HEK293SF, так и в MSC, что позволяет предположить, что экзосомные белки, *например* PTGFRN, можно использовать в качестве каркаса для создания поверхностно-сконструированных экзосом MSC.

4.9.16. Пример 16. PTGFRN может быть сверхэкспрессирован на экзосомах из нечеловеческих клеток

[00237] Результаты примеров 9 и 15 демонстрируют, что многочисленные человеческие клетки естественным образом экспрессируют PTGFRN и другие новые экзосомные белки, идентифицированные в примере 1. Чтобы определить, можно ли использовать PTGFRN в качестве универсального каркасного белка экзосомы, клетки яичника китайского хомяка (CHO) стабильно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей полноразмерный PTGFRN, гибридный с меткой FLAG («плазида PTGFRN-FLAG»). Экзосомы очищали от клеток HEK293SF дикого типа, клеток HEK293SF, трансфицированных плазмидой PTGFRN-FLAG, клеток CHO и клеток CHO, трансфицированных плазмидой PTGFRN-FLAG, используя способ, описанный в примере 1. Как показано на фигурах 43A-C, PTGFRN-FLAG был успешно сверхэкспрессирован как

в клетках HEK293SF, так и в клетках CHO, что было обнаружено с помощью PAGE без пятен (фиг. 43A) и вестерн-блоттинга с антителами к PTGFRN (фиг. 43B) и FLAG (фиг. 43C). Этот результат демонстрирует, что нечеловеческие клетки (*например*, клетки CHO), а также клетки человека (*например*, клетки HEK) могут продуцировать экзосомы, которые сверхэкспрессируют PTGFRN человека. Этот результат указывает на то, что PTGFRN является универсальным каркасным белком для создания сконструированных экзосом из множества различных типов и видов клеток.

4.9.17. Пример 17. PTGFRN обеспечивает улучшенную загрузку люминального груза по сравнению с обычными экзосомными белками

[00238] Предыдущие примеры продемонстрировали, что избыточная экспрессия PTGFRN приводит к экзосомам с большим числом белков и/или активностью по сравнению с обычными белками экзосом (*например*, пример 13; фиг. 15). Поскольку PTGFRN является трансмембранным белком, N-конец которого расположен на вневезикулярной поверхности, а C-конец — в просвете экзосомы, PTGFRN может быть подходящим каркасным белком для загрузки просвета экзосом белками-грузами. Чтобы исследовать данную возможность, клетки HEK293SF были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать двухчастную репортерную систему, которая использует низкомолекулярный рапамицин для облегчения межбелковых взаимодействий. Либо CD9 (фиг. 44A), либо PTGFRN (фиг. 44B) были гибридизированы с GFP, меткой FLAG и FKBP. Клетки также были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать mCherry, гибридизированный с меткой V5 и FRB. В присутствии небольшой молекулы рапамицина белки FRB и FKBP димеризуются с образованием стабильного комплекса. Таким образом, культивирование клеток в присутствии рапамицина может позволить ассоциацию между белком-грузом mCherry и CD9 или PTGFRN во время биогенеза экзосом. Экзосомы, очищенные от этих клеток, будут промыты для удаления рапамицина, что позволит высвободить mCherry в качестве растворимого груза в просвете экзосомы. (фиг. 44A-B).

[00239] Репортерные клетки с загрузкой CD9 выращивали в присутствии рапамицина в течение 0, 1 или 2 дней. Репортерные клетки с нагрузкой PTGFRN выращивали в присутствии рапамицина в течение 5 дней. Экзосомы были очищены от клеточных культур в отсутствие рапамицина, что позволило высвободить груз в просвете экзосомы. Очищенные образцы экзосом обрабатывали на денатурирующем полиакриламидном геле и анализировали на наличие общего белка и посредством вестерн-блоттинга в отношении каркасного белка (анти-FLAG) или груза mCherry (анти-V5).

Образцы PTGFRN были загружены в полиакриламидный гель в гораздо меньшем количестве материала по сравнению с образцами CD9, но PTGFRN было легко обнаружить с помощью вестерн-блоттинга FLAG. Грузовой mCherry также был обнаружен на сопоставимом уровне между образцами каркасов PTGFRN и CD9 (фиг. 45A). Когда полосы каркаса и грузового белка были измерены денситометрией и нормализованы к количеству собранных экзосом, каркас PTGFRN был экспрессирован на более высоком уровне и был способен загружать гораздо больше груза mCherry, чем содержалось в белках каркаса CD9 (фиг. 45B). Эти данные указывают на то, что PTGFRN может быть экспрессирован как гибридный белок с люминальным пептидом нагрузки в большей степени, чем обычный экзосомный белок CD9, и что использование PTGFRN приводит к большей направленной нагрузке груза по сравнению с обычным экзосомным белком. Эти данные указывают на то, что сложные сконструированные системы, состоящие из нескольких частей, могут использоваться в контексте каркасов PTGFRN и приводить к надежной загрузке груза в просвет экзосомы.

4.9.18. Пример 18. Создание модифицированных экзосомных белков

[00240] Полинуклеотид, кодирующий модифицированный экзосомный белок, получают с использованием полинуклеотида, кодирующего целый экзосомный белок или усеченный экзосомный белок. Конкретный усеченный экзосомный белок отбирается путем скрининга различных усеченных экзосомных белков и выбора усеченного белка, обладающего оптимальными способностями для включения в экзосомные мембраны и взаимодействия со связывающим агентом. Нацеливание усеченных белков на экзосомные мембраны проверяют с помощью нано-проточной цитометрии.

[00241] Полинуклеотид, кодирующий белок модифицированных экзосом, создают путем добавления полинуклеотида, кодирующего аффинную метку (глутатион-S-трансферазы, S-пептид, метку FLAG, GFP и *т. д.*) к полинуклеотиду, кодирующей полной или усеченной белок экзосомы (*например*, транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2). Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок. Полинуклеотид дополнительно модифицируется для улучшения нацеливания на экзосомные мембраны и/или их аффинности к связывающему агенту.

[00242] Другой тип полинуклеотида, кодирующего модифицированный экзосомный белок, получают добавлением полинуклеотида, кодирующего терапевтический пептид (*например*, антитело, фермент, лиганд, рецептор, антимикробный пептид, вариант или его фрагмент) к полинуклеотиду, кодирующему целый или усеченный экзосомный

белок (*например*, транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2). Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок, презентированный на поверхности экзосомы. Гибридный белок сохраняет терапевтическую активность терапевтического пептида.

[00243] Другой тип полинуклеотида, кодирующего модифицированный экзосомный белок, получают добавлением полинуклеотида, кодирующего нацеливающий фрагмент (*например*, нацеливающий фрагмент, специфичный для конкретного органа, ткани или клетки) к полинуклеотиду, кодирующему целый или усеченный экзосомный белок (*например*, транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2). Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок, презентированный на поверхности экзосомы. Гибридный белок позволяет нацеливать экзосому на конкретный орган, ткань или клетку.

[00244] Локализация модифицированных экзосомных белков поверхности экзосом также проверяется с помощью нано-проточной цитометрии.

4.9.19. Пример 19. Создание поверхностно-сконструированных экзосом

[00245] Клетки-продуценты, вырабатывающие поверхностно-сконструированные экзосомы, получают путем введения экзогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы. Плазмида, кодирующая экзосомный белок, временно трансфицируется для индуцирования высокого уровня экспрессии экзосомного белка на поверхности экзосомы. Плазмида, кодирующая модифицированный экзосомный белок, временно трансфицируется для получения экзосом, имеющих модифицированный экзосомный белок на поверхности.

[00246] Полинуклеотид, кодирующий экзосомный белок, вариант или фрагмент экзосомного белка или экзогенную последовательность, кодирующую аффинную метку, терапевтический пептид или нацеливающий фрагмент, стабильно трансформируется в клетку-продуцент для получения поверхностно-сконструированных экзосом. Экзогенная последовательность, кодирующая аффинную метку, терапевтический пептид или нацеливающий фрагмент, вставляется в геномный сайт, кодирующий экзосомный белок, для выработки гибридного белка, содержащего аффинную метку, присоединенную к экзосомному белку. Полинуклеотид, кодирующий модифицированный экзосомный белок, попадает в геномный сайт, кодирующий экзосомный белок.

[00247] Линия клеток-продуцентов создается путем стабильной трансфекции по меньшей мере двух полинуклеотидов, каждый из которых кодирует экзосомный белок, вариант или фрагмент экзосомного белка или экзогенный пептид (*например*, аффинную метку, нацеливающий фрагмент, терапевтический пептид). Другую линию клеток-продуцентов также создают путем вставки двух или более экзогенных последовательностей (*например*, экзогенных последовательностей, кодирующих аффинную метку, маркер, нацеливающий пептид, терапевтический пептид и *т. д.*) в несколько геномных сайтов в пределах геномной последовательности, кодирующей экзосомный белок, или в непосредственной близости к ней, для генерации поверхностно-сконструированной экзосомы, содержащей несколько модифицированных экзосомных белков. Каждый из множества модифицированных экзосомных белков нацелен на поверхность экзосом. Экзосомы имеют аффинность к двум различным связывающим агентам и очищаются одним или обоими связывающими агентами.

4.9.20. Пример 20. Выделение, очистка и субфракционирование экзосом методом аффинной очистки.

[00248] Связывающие агенты для аффинной очистки экзосом разрабатываются путем биоэннинга / направленной эволюции при элюировании в мягких условиях.

[00249] Связывающий агент прикрепляется к твердой подложке (*например*, пористой агарозной грануле) и вносится в обычную хроматографическую систему (*например*, GE АКТА). Образец, содержащий экзосомы, наносят на колонку для аффинной очистки.

5. ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[00250] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в данной заявке, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения посредством ссылки для всех целей.

6. ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00251] Настоящее раскрытие предоставляет, *среди прочего*, композиции каннабиноидов и приближенные к ним композиции. Настоящее изобретение также

относится к способу лечения нейродегенеративных заболеваний путем введения композиций каннабиноидов и приближенных. Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, приведенное выше описание не является ограничивающим. Понятно, что различные изменения могут быть сделаны без отклонения от сущности и объема изобретения. Многие изменения станут очевидными для специалистов в данной области техники после рассмотрения этого описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения экзосомы, включающий стадии:
предоставление образца, содержащего экзосому;
приведение в контакт образца со связывающим агентом, обладающим аффинностью к целевому белку, причем целевой белок включает в себя транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант; а также
выделение экзосомы на основе связывания между целевым белком и связывающим агентом.
2. Способ по п. 1, в котором указанный образец получают из клетки, выращенной *in vitro*, причем клетка необязательно представляет собой клетку HEK293.
3. Способ по п. 1, в котором указанный образец получают из жидкости организма субъекта.
4. Способ по п. 2, в котором клетка генетически модифицирована для экспрессии целевого белка.
5. Способ по п. 2 или 4, в котором клетка содержит плазмиду экспрессии, кодирующую целевой белок.
6. Способ по п. 4, в котором клетка генетически модифицирована для включения в нее экзогенной последовательности, экспрессирующей метку, имеющую аффинность к связывающему агенту, причем экзогенная последовательность вставлена в геном клетки.
7. Способ по п. 6, в котором экзогенная последовательность вставлена в геномный сайт, расположенный на 3'- или 5'-конце эндогенной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.
8. Способ по п. 6, в котором экзогенная последовательность вставлена в геномный сайт, расположенный в эндогенной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.
9. Способ по любому из пп. 7–8, в котором целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий метку и транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант.
10. Способ по любому из пп. 1–9, в котором клетка генетически модифицирована для достижения пониженной экспрессии ADAM10.

11. Способ по любому из пп. 1–10, в котором экзосома содержит целевой белок.
12. Способ по любому из пп. 1–11, в котором целевой белок выбран из транспортера АТФ и PTGFRN, BSG, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.
13. Способ по любому из пп. 1–11, в котором целевой белок содержит фрагмент или вариант транспортера АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.
14. Способ по п. 13, в котором целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33.
15. Способ по любому из пп. 13–14, в котором целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и аффинную метку, причем аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту.
16. Способ по п. 15, в котором связывающий агент включает иммуноглобулин, белок, пептид или малую молекулу.
17. Способ по любому из пп. 1–16, в котором связывающий агент прикреплен к твердой подложке, причем необязательно твердая подложка содержит пористую агарозную гранулу, микротитровальный планшет, магнитный гранулу, или мембрану.
18. Способ по п. 17, в котором твердая подложка образует хроматографическую колонку.
19. Способ по п. 18, в котором стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.
20. Способ по любому из пп. 1–19, дополнительно включающий стадии:
 - приведение в контакт подмножества образца с другим связывающим агентом, имеющим аффинность к другому целевому белку; и
 - выделение экзосомы на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом.
21. Способ по любому из пп. 1–20, в котором другой целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2 или их фрагмент или вариант.
22. Способ по любому из пп. 1–21, в котором другой целевой белок включает в себя PTGFRN или его фрагмент или вариант.
23. Способ по п. 22, в котором другой целевой белок содержит полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 33.
24. Экзосома, изготовленная способом по любому из пп. 1–23.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая экзосому по п. 24 и наполнитель.
26. Фармацевтическая композиция по п. 25, содержащая более низкую концентрацию макромолекул, чем образец; причем макромолекулы представляют собой нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.
27. Фармацевтическая композиция по п. 26, по существу не содержащая макромолекул.
28. Экзосома, содержащая целевой белок, в которой по меньшей мере часть целевого белка экспрессируется из экзогенной последовательности, и целевой белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF8, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант.
29. Экзосома по п. 28, в которой целевой белок присутствует на поверхности экзосомы с более высокой плотностью, чем другой целевой белок другой экзосомы, причем другой целевой белок включает в себя обычный экзосомный белок или его вариант.
30. Экзосома по п. 29, в которой обычный экзосомный белок выбран из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.
31. Экзосома по любому из пп. 28–30, в которой целевой белок содержит полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 33.
32. Экзосома по любому из пп. 28–31, выделенная на основе связывания целевого белка и связывающего агента.
33. Экзосома по любому из пп. 28–32, полученная из клетки, генетически модифицированной для включения в нее экзогенной последовательности, причем клетка необязательно представляет собой клетку HEK293.
34. Экзосома по п. 33, в которой клетка генетически модифицирована для снижения экспрессии ADAM10.
35. Экзосома по любому из пп. 33–34, в которой клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.
36. Экзосома по любому из пп. 33–35, в которой клетка содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки.
37. Экзосома по п. 36, в которой экзогенная последовательность вставлена в геномный сайт, расположенный на 3'- или 5'-конце геномной последовательности, кодирующей транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.

38. Экзосома по п. 36, в которой экзогенная последовательность вставлена в геномную последовательность, кодирующую транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2.
39. Экзосома по любому из пп. 28–38, в которой целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и аффинную метку, причем аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту.
40. Экзосома по любому из пп. 28–38, в которой целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и терапевтический пептид.
41. Экзосома по п. 40, в которой терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.
42. Экзосома по п. 40, в которой терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.
43. Экзосома по п. 40, в которой терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или вариант.
44. Экзосома по п. 40, в которой терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор или их фрагмент или вариант.
45. Экзосома по п. 40, в которой терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или вариант.
46. Экзосома по любому из пп. 28–38, в которой целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и нацеливающий фрагмент.
47. Экзосома по п. 46, в которой нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки.
48. Экзосома по любому из пп. 28–47, дополнительно содержащая другой целевой белок, причем другой целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант.
49. Экзосома по п. 48, выделенная на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая экзосому по любому из пп. 28–49 и наполнитель.
51. Фармацевтическая композиция по п. 50, по существу не содержащая макромолекул, причем макромолекулы выбраны из нуклеиновых кислот, загрязняющих белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.
52. Клеточная линия для выработки экзосомы по любому из пп. 28–49.
53. Клеточная линия для выработки экзосом, содержащая экзогенную последовательность, вставленную в геномную последовательность, кодирующую транспортер АТФ или PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, причем экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют гибридный белок.
54. Клеточная линия по п. 53, в которой экзогенная последовательность кодирует аффинную метку.
55. Клеточная линия по п. 53, в которой экзогенная последовательность кодирует терапевтический пептид.
56. Клеточная линия по п. 55, в которой терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.
57. Клеточная линия по п. 55, в которой терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.
58. Клеточная линия по п. 55, в которой терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или вариант.
59. Клеточная линия по п. 55, в которой терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор или их фрагмент или вариант.
60. Клеточная линия по п. 55, в которой терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или вариант.
61. Клеточная линия по п. 53, в которой экзогенная последовательность кодирует нацеливающий фрагмент.
62. Клеточная линия по п. 61, в которой нацеливающий фрагмент является специфическим для органа, ткани или клетки.

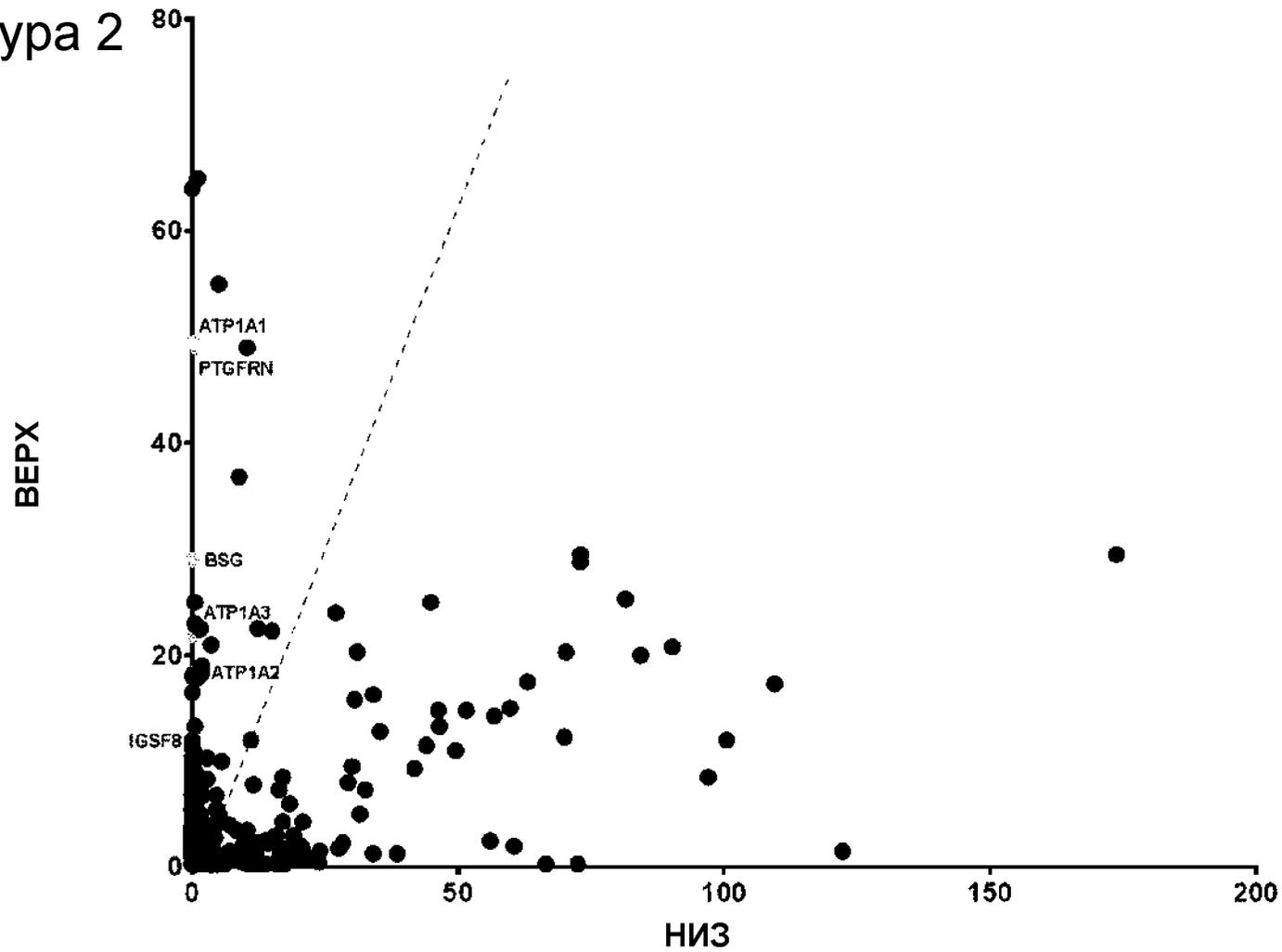
63. Клеточная линия по п. 53–62, в которой клеточная линия генетически модифицирована для снижения экспрессии ADAM10.
64. Экзосома, полученная из клеточной линии по любому из пп. 53–63.
65. Экзосома по п. 64, в которой экзосома включает гибридный белок на поверхности с более высокой плотностью по сравнению с другим гибридным белком на поверхности другой экзосомы, причем другая экзосома вырабатывается из другой клеточной линии, содержащей экзогенную последовательность, вставленную в другую геномную последовательность, кодирующую обычный экзосомный белок, при этом экзогенная последовательность и другая геномная последовательность кодируют другой гибридный белок.
66. Экзосома по п. 65, в которой обычный экзосомный белок выбран из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.
67. Способ выделения неэкзосомного материала, включающий стадии:
обеспечения образца, содержащего экзосому и неэкзосомный материал;
приведения в контакт образца со связывающим агентом, обладающим аффинностью к целевому белку, причем целевой белок включает транспортер АТФ, RTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, индуцируя тем самым экзосому к связыванию со связывающим агентом; и
выделение неэкзосомного материала.
68. Способ по п. 67, в котором неэкзосомный материал представляет собой вирус или белок.
69. Способ по п. 68, в котором неэкзосомный материал представляет собой лентивирус, ретровирус, аденоассоциированный вирус или другой вирус с оболочкой или без оболочки.
70. Способ по п. 68, в котором неэкзосомный материал представляет собой рекомбинантный белок.
71. Способ по любому из пп. 67–70, в котором выделенный неэкзосомный материал по существу не содержит экзосом.
72. Способ по любому из пп. 67–71, в котором целевой белок дополнительно содержит аффинную метку, причем аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту.

73. Способ по любому из пп. 67–72, в котором целевой белок содержит полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 33.
74. Способ по любому из пп. 67–73, в котором связывающий агент включает в себя иммуноглобулин, белок, пептид или малую молекулу.
75. Способ по любому из пп. 67–74, в котором связывающий агент прикреплен к твердой подложке, причем необязательно твердая подложка содержит пористую агарозную гранулу, микротитровальный планшет, магнитную гранулу, или мембрану.
76. Способ по п. 75, в котором твердая подложка образует хроматографическую колонку.
77. Способ по п. 76, в котором стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.

Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3

PTGFRN (Q9P2B2)

	1	101	201	301	401	501	601	701	801	878
Modifications Q9P2B2	1									D
Modifications Q9P2B2	101	C	D D					C		
Modifications Q9P2B2	201				D C	D D				
Modifications Q9P2B2	301		O							
Modifications Q9P2B2	401			C			D			
Modifications Q9P2B2	501	C			D			C		
Modifications Q9P2B2	601				O		C			
Modifications Q9P2B2	701									C
Modifications Q9P2B2	801									

Модификации

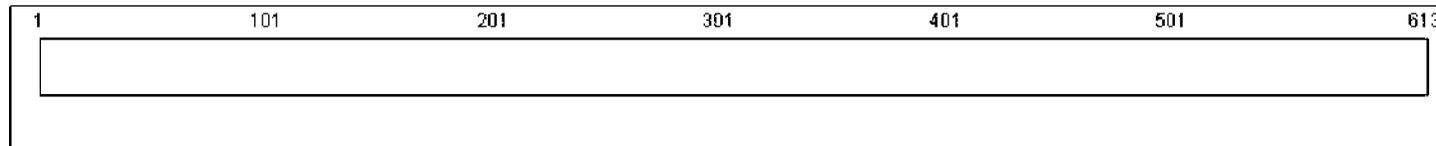
C: карбамидометил (C)

D: дезамидированная форма (Q, N)

O: окисление (M)

Фигура 4

IGSF8 (Q969P0)



	1	11	21	31	41	51	61	71	81
Modifications Q969P0	1								
	MGALRPILLP	PSEPLLLLLLH	LGHGCTARRV	LVREGDLYRV	AGTAVSISCN	VTGYEGPAQQ	NFEWFLYRPE	APDIALGIVS	TKDTQESYAV
Modifications Q969P0	51			D	C				
	EKSRVWAGEV	QVQRLOGRRV	VKLIAELQHQ	DAGIYECHTP	STDTKYLGSY	SGKVELRVLV	DYLQVSRAPP	GPRGRQAPTS	PPRMTVRRGQ
Modifications Q969P0	101	C			D				
	ELALGCLART	STQRKTHLAV	SFCRSVPEAP	VCRSTLQRVV	GIRSDLAVER	GAPYAKRLAR	CELELCKEET	DRYRHFVCGA	QAGDACTYHC
Modifications Q969P0	201			D	D				
	TAAEWIQDPD	GSWAQIAEKR	NFLANDVYQT	LSSQLAVTVG	PGERRIGPCE	PLELLCNVSG	ALPPACRQDA	YSVCWEMDPA	GAPCPGELVA
Modifications Q969P0	301	D				C			
	QLDTGCVGSL	CPCTEGRHIA	NEKVASRIYR	LRLEKRRPCE	ACTYKCLAKA	YVRCGCTRLP	EAASARSDPL	PVHVEREGVV	LEHVAWLKCC
Modifications Q969P0	401								
	TFYRGRTASL	LCNISVRGGP	PGLRLAASUV	VRRPEDGELS	SWFAQLVGGV	QDCQVARELV	RPGGGVSVSE	LVCPRSHRLR	LHSLGPEDEG
Modifications Q969P0	501								
	VYHCAPSAMV	QHADYSWYQA	GSARSGPVTV	YPYMHALDTL	FWLLLVGTCV	ALVTGATVLG	TITCCFMKRL	RKR	

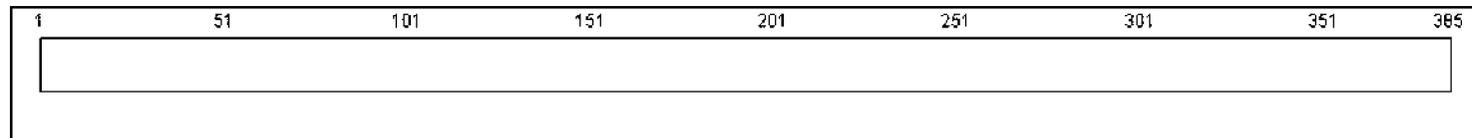
Модификации

C: карбамидометил (C)

D: дезамидированная форма (Q)

Фигура 5

BSG (P35613)



	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
Modifications P35613	1									
	M	A	A	A	L	F	V	L	L	C
	F	A	L	L	G	T	H	C	A	S
	G	A	A	G	F	V	Q	A	P	L
	S	Q	R	R	W	V	G	G	S	V
	K	L	H	C	E	A	V	G	S	P
	V	P	R	I	Q	W	F	E	G	
	Q	C	P	N	D	T	C	S	Q	L
	W	D	G	A	R	L	D	R	V	H
	I	H	A	T	Y	H	Q	H	A	A
	S	T	I	S	I	D	T	L	V	E
Modifications P35613	101									
	E	D	I	G	T	Y	E	C	R	A
	S	N	D	P	D	R	N	H	L	T
	R	A	P	R	V	K	W	V	R	A
	Q	A	V	V	L	V	L	E	P	G
	T	V	F	T	T	V	E	D	L	G
	S	K	L	L	T	C	S	L	N	
	D	S	A	T	E	V	T	G	H	R
	W	L	K	G	G	V	V	L	K	E
	D	A	L	P	G	Q	K	T	E	F
	K	V	D	S	D	Q	W	G	E	
Modifications P35613	201	C	O			D	O	C		
	Y	S	C	V	E	L	P	E	P	H
	C	T	A	N	I	Q	L	H	C	F
	P	E	V	K	A	V	K	S	S	E
	H	I	N	E	G	E	T	R	M	L
	W	K	S	E	S	V	P	P	V	
	T	W	A	Y	K	I	T	D		
	S	E	K	A	L	M	G	S		
	K	S	R	F	E	V	S	S	S	Q
	G	E	S	E	L	L	E	N	L	
	N	E	R	A	D	P	G	Q	Y	R
Modifications P35613	301									
	C	N	G	T	S	S	K	E	S	E
	Q	R	I	T	L	E	V	R	S	
	H	L	A	A	L	P	P	L	G	
	I	V	A	E	V	L	V	L	V	T
	I	I	F	I	Y	E	K	R	E	K
	P	E	D	V	L	D	D	D	D	A
	G	S	A	P	L	K	S	S	G	
	H	Q	N	D	E	K	G	K	N	V
	Q	R	N	S						

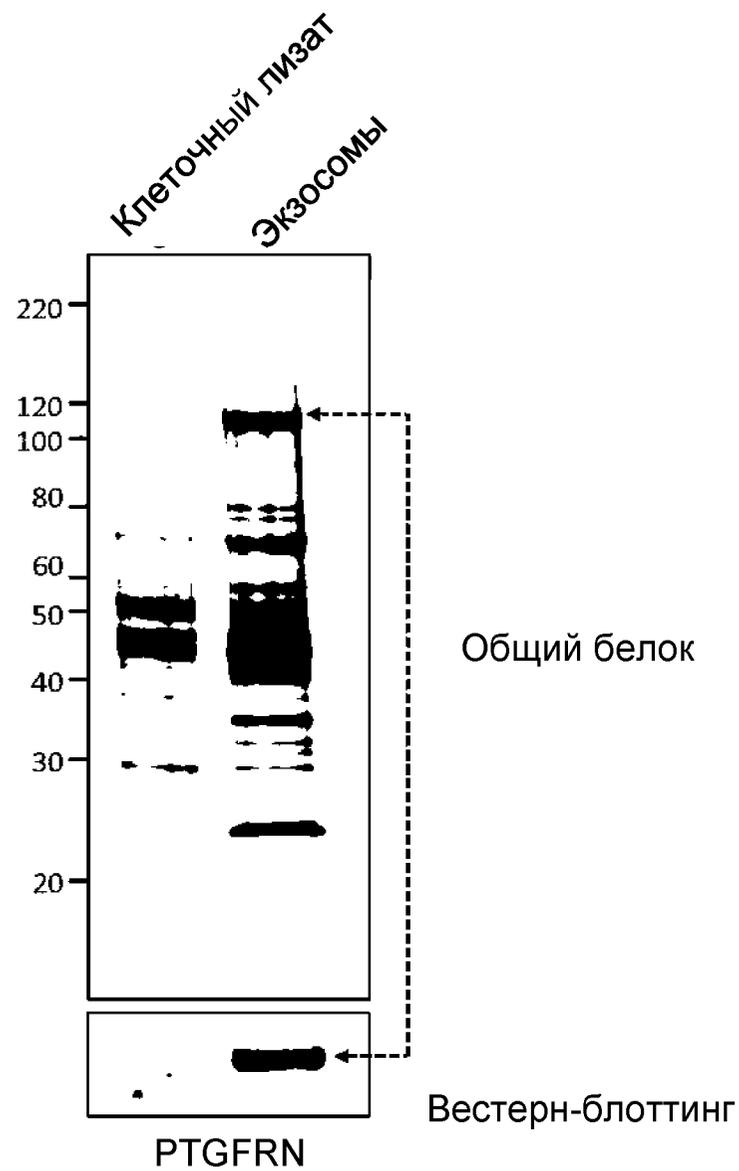
Модификации

C: карбамидометил (C)

D: дезамидированная форма (N, Q)

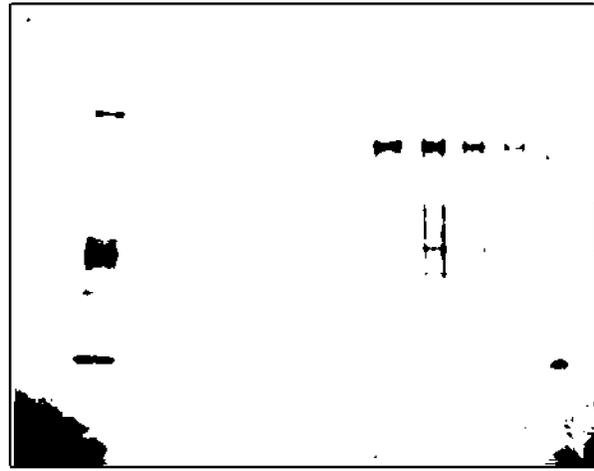
O: окисление (M)

Фигура 6А



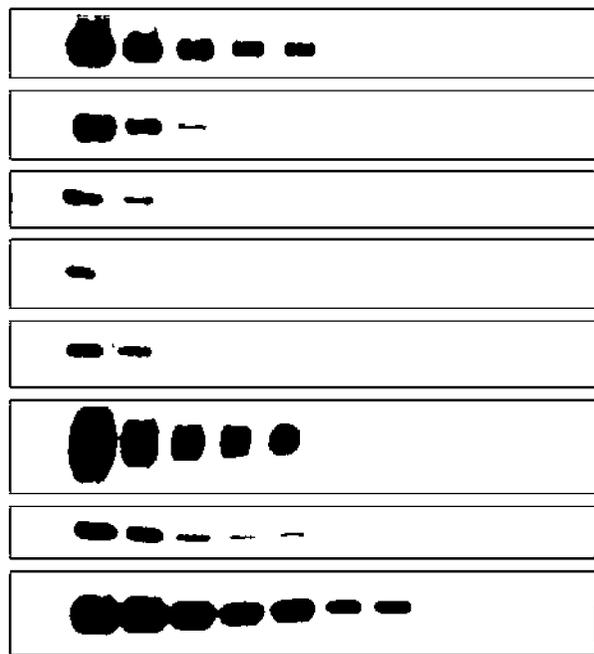
Фигура 6В

Фигура 7А



Общий белок
восстанавливающие
условия

Фигура 7В



ITGA4

ITGB1

PTGFRN

IGSF3

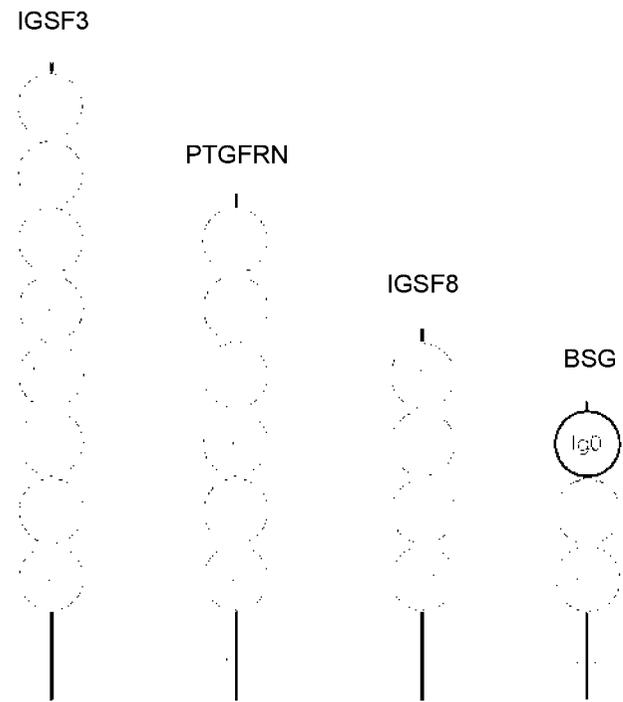
IGSF8

Basigin

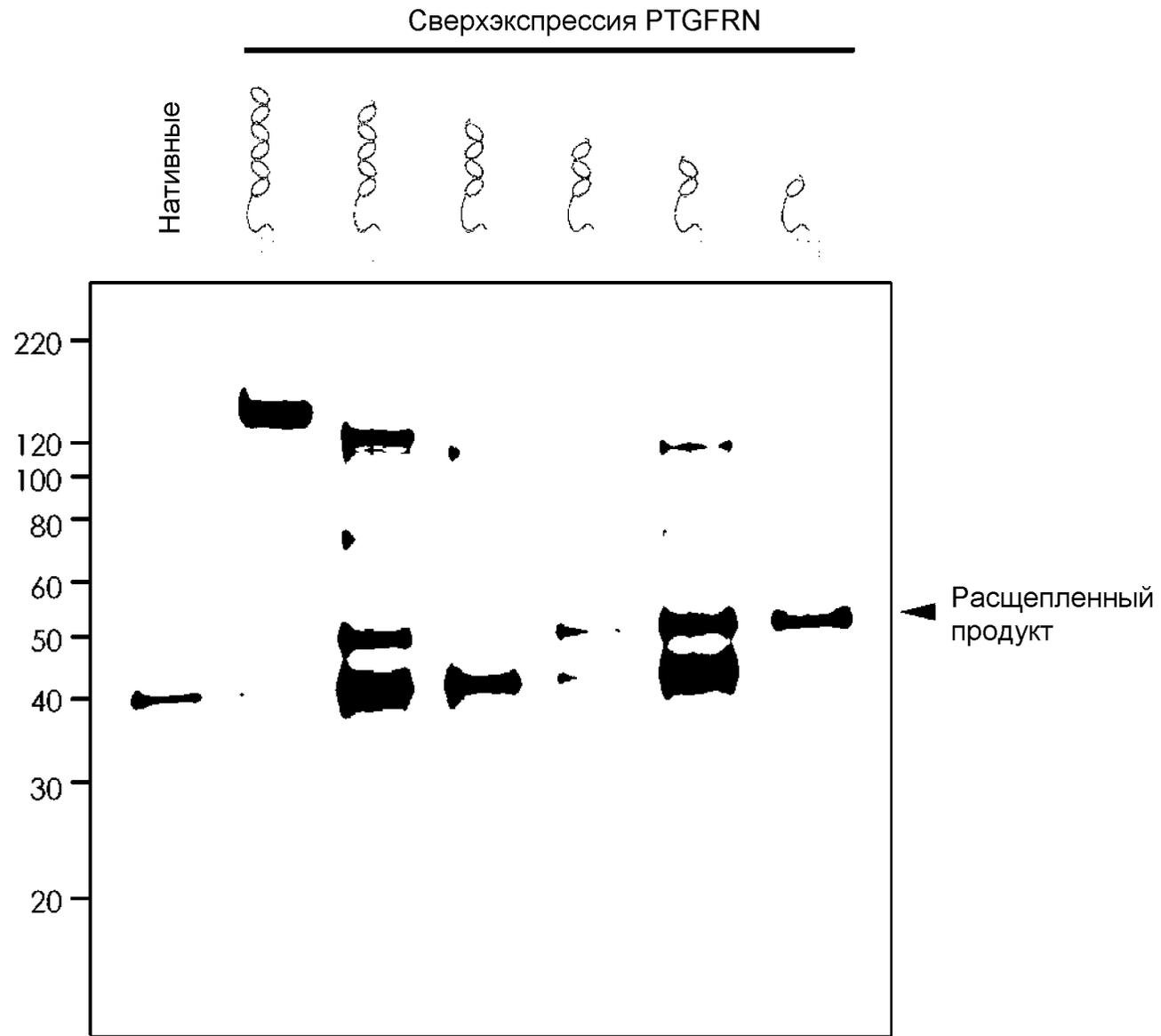
Аликс (экзосомный маркер)

Синтетин (экзосомный маркер)

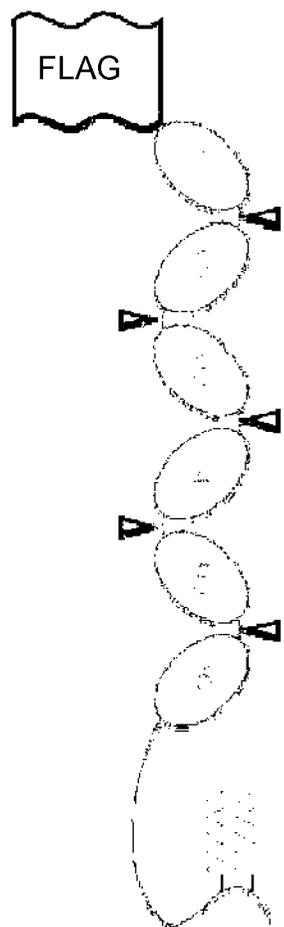
Фигура 8



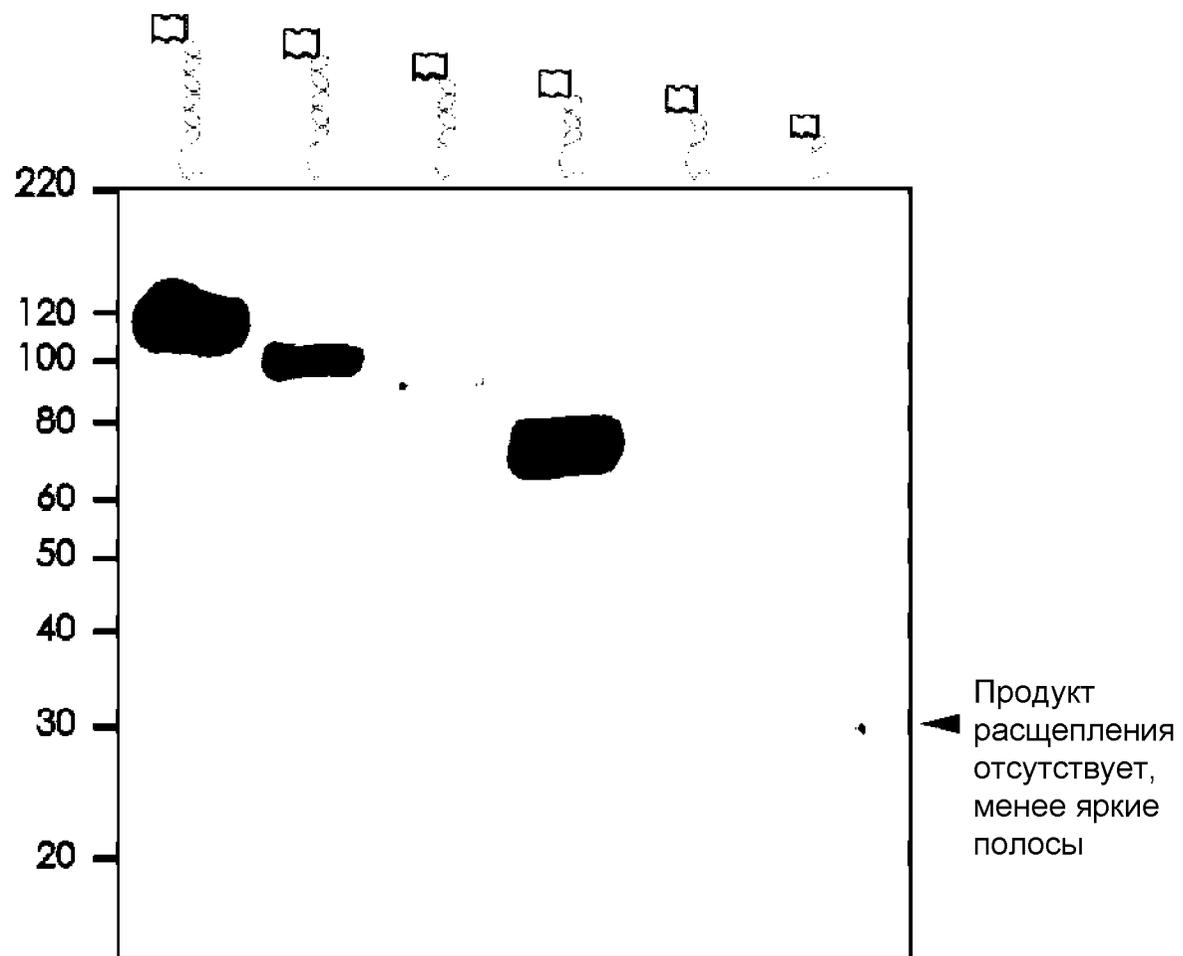
Фигура
10



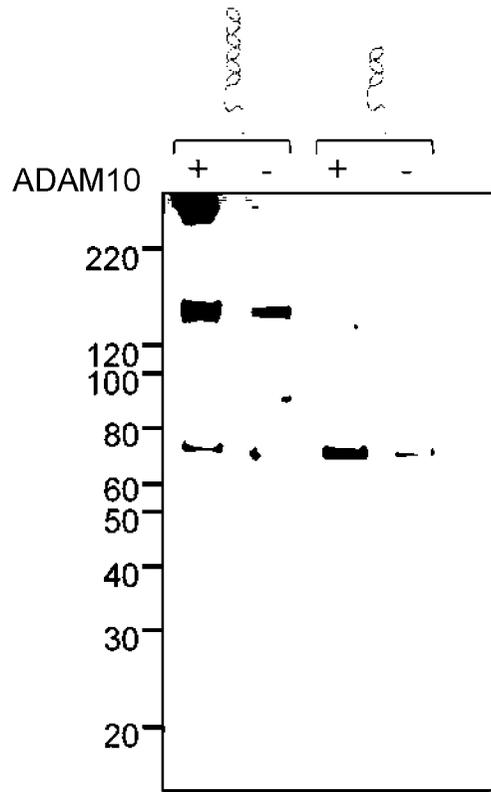
Фигура 11А



Фигура 11В

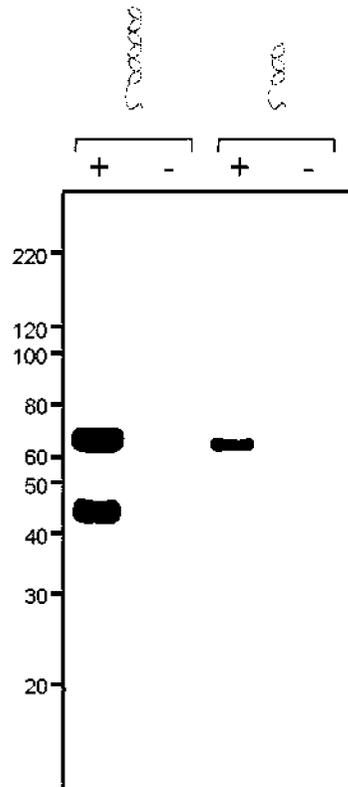


Фигура 12А



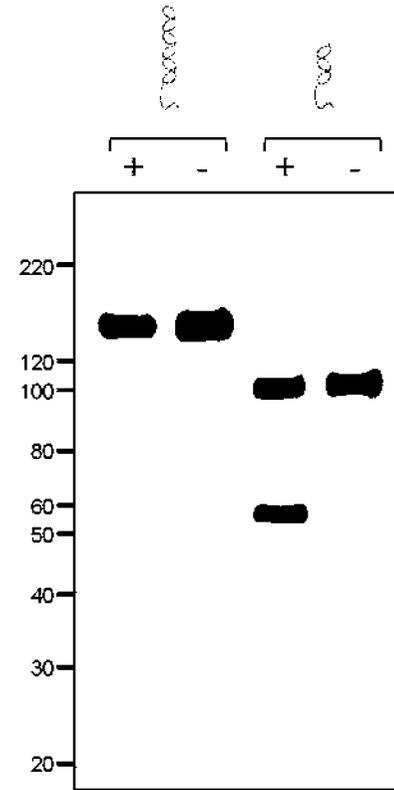
Общий белок
4–20% TGX,
снижение

Фигура 12В



αADAM10

Фигура 12С



αGFP

← Продукт
расщепления
в ADAM10 KO
отсутствует

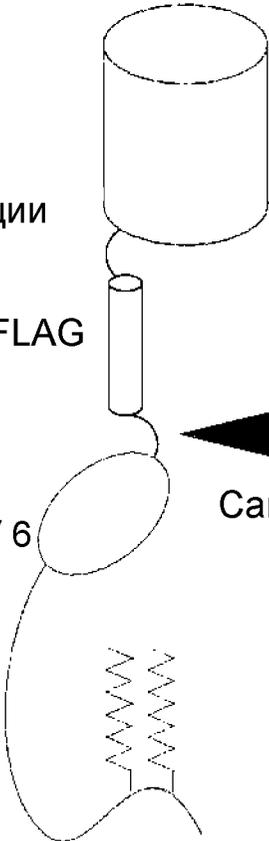
Фигура 13

Белок-партнер при гибридизации

FLAG

PTGFRN IgV 6

Сайт отсечения



Фигура 14А

Гибридный белок

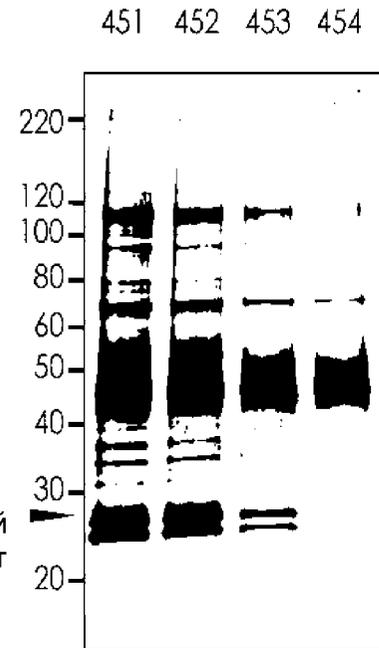
FLAG

```

451 ...EHSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSLSNPIEIDFQTSGP I F...
452 ...EHSAGGGGSDYKDDDDKGGGGS-----IEIDFQTSGP I F...
453 ...EHSAGGGGSDYKDDDDKGGGGS-----FQTSGP I F...
454 ...EHSAGGGGSDYKDDDDKGGGGS-----GPIF...
    
```

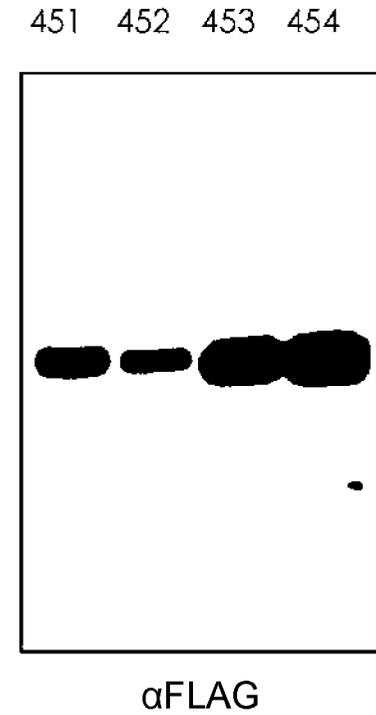
} Делеции

Фигура 14В

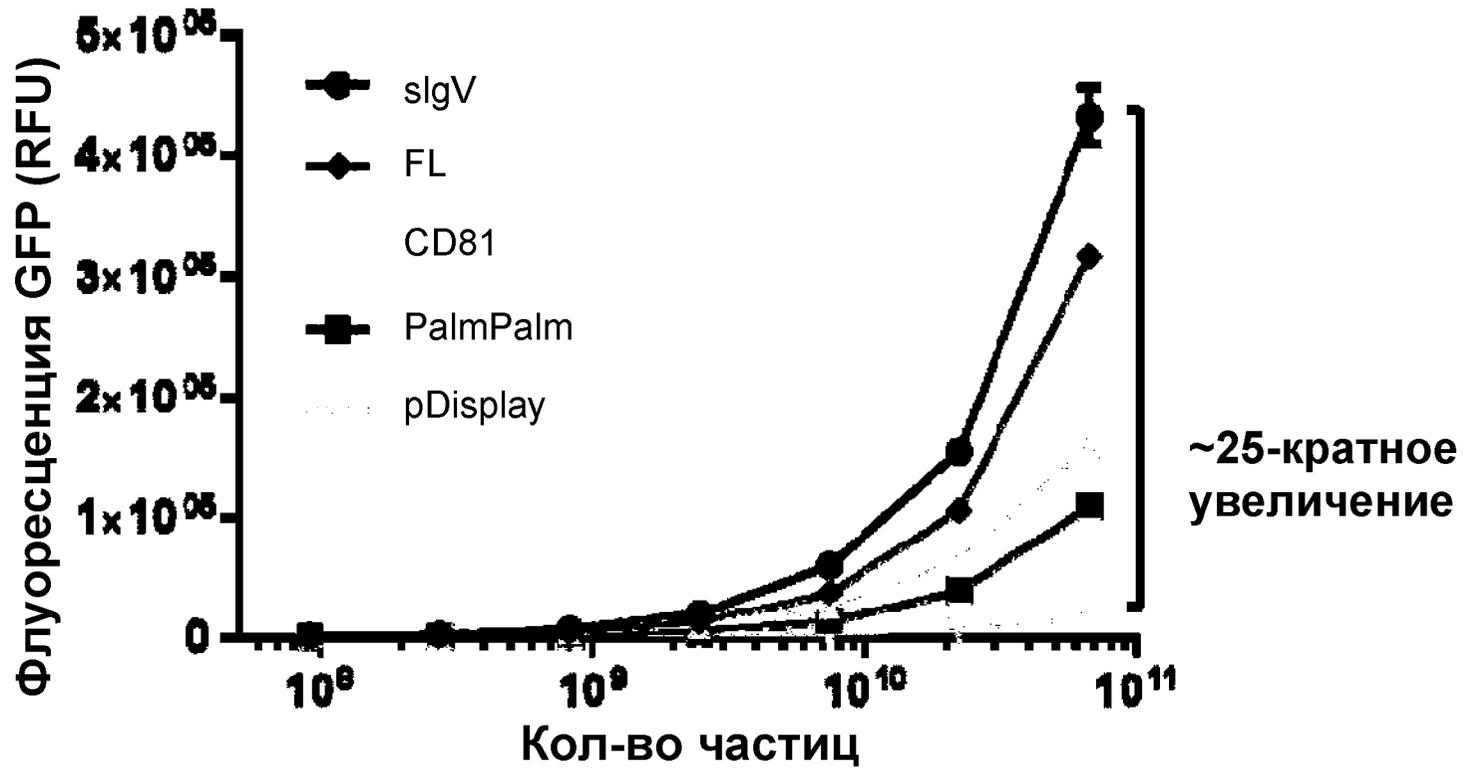


4–20% TGX, снижение

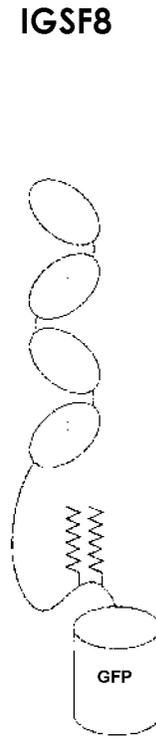
Фигура 14С



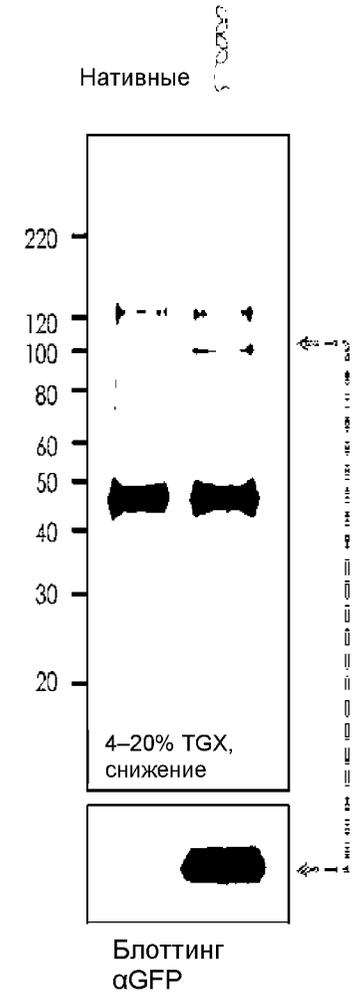
Фигура 15



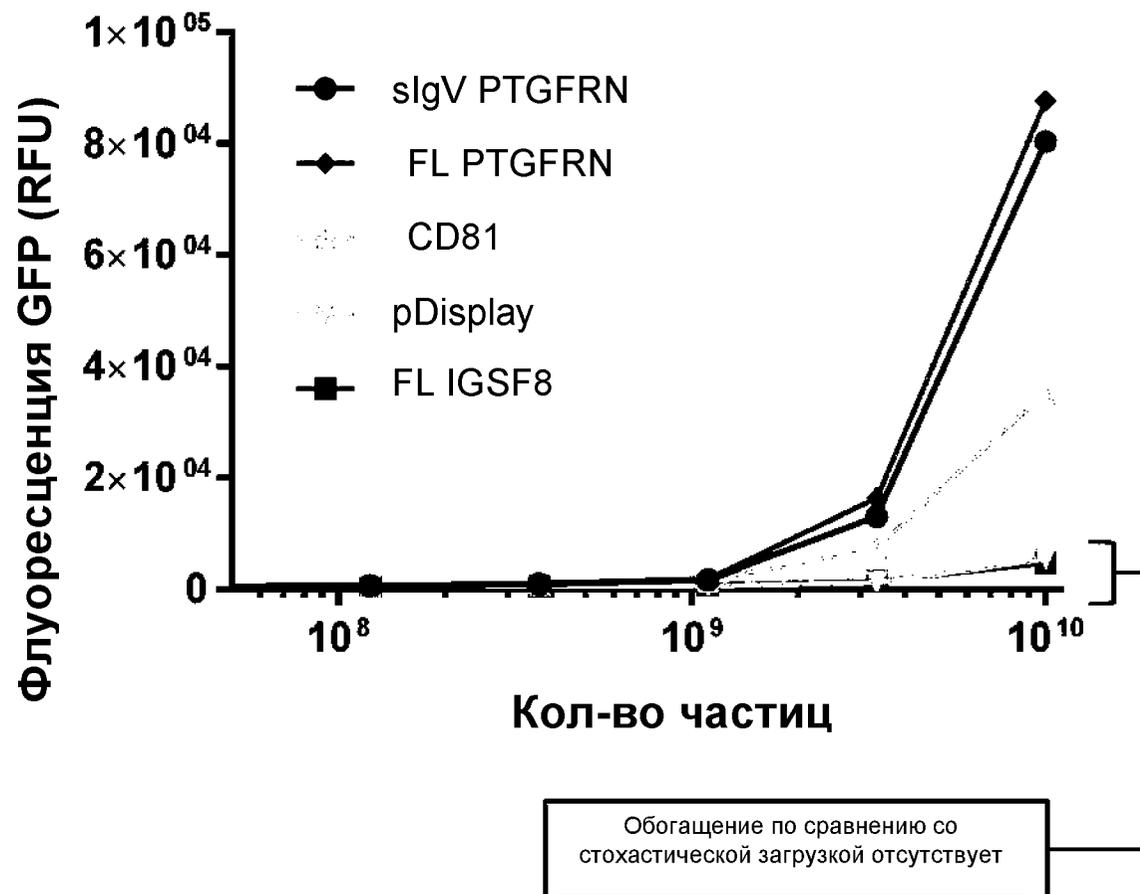
Фигура 16А



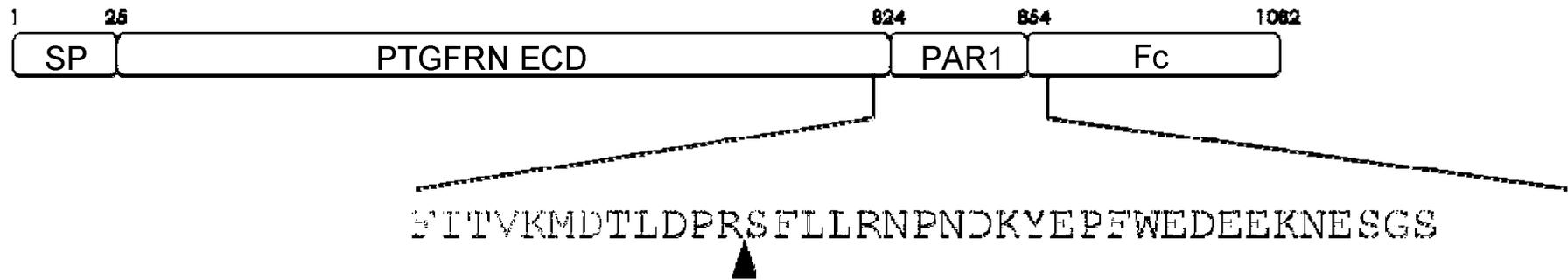
Фигура 16В



Фигура 17

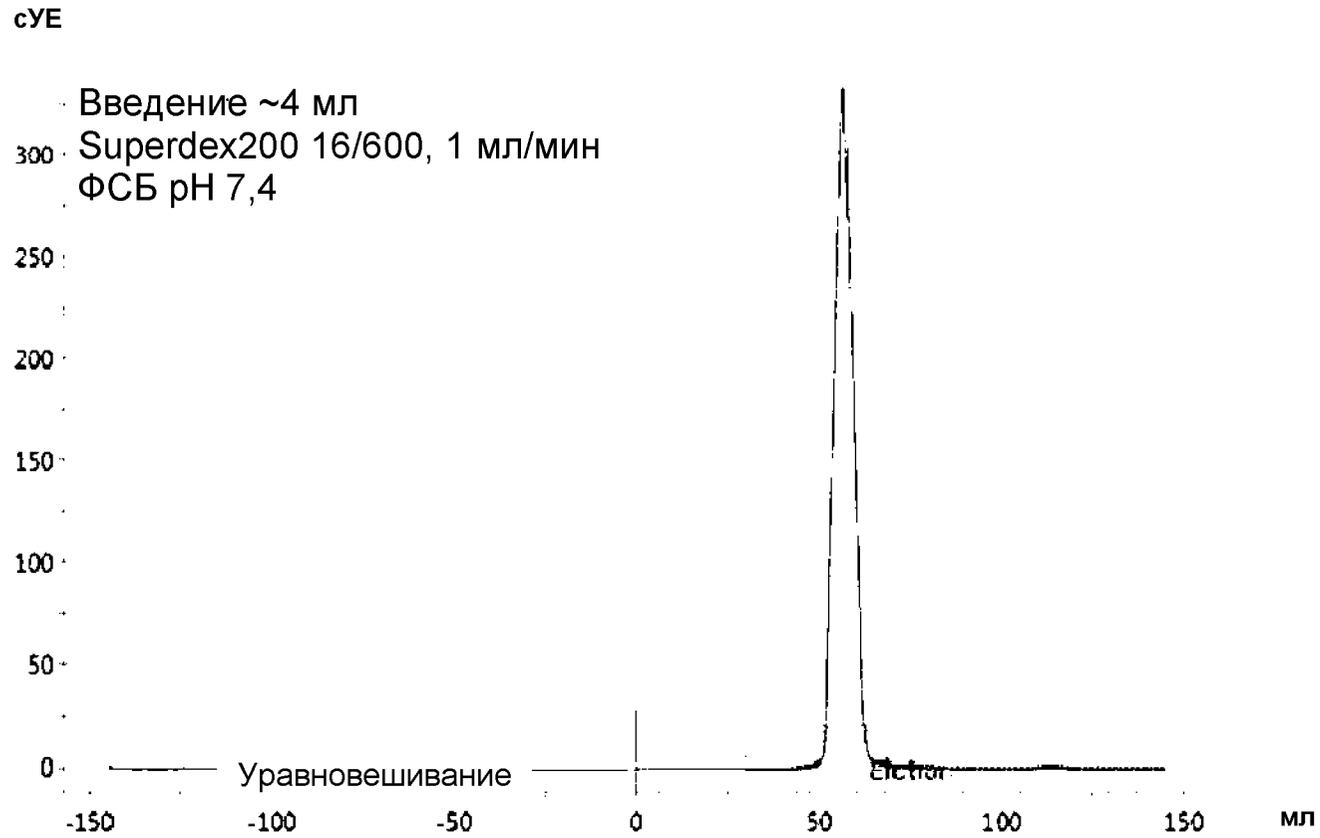


Фигура 18



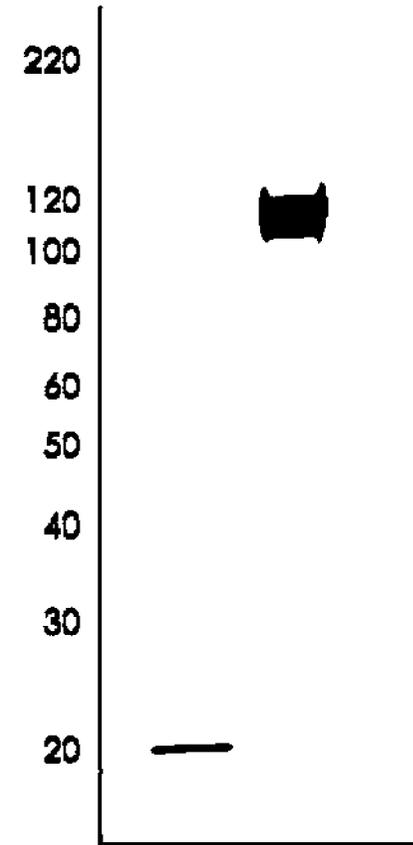
Сайт расщепления тромбина

Фигура 19А



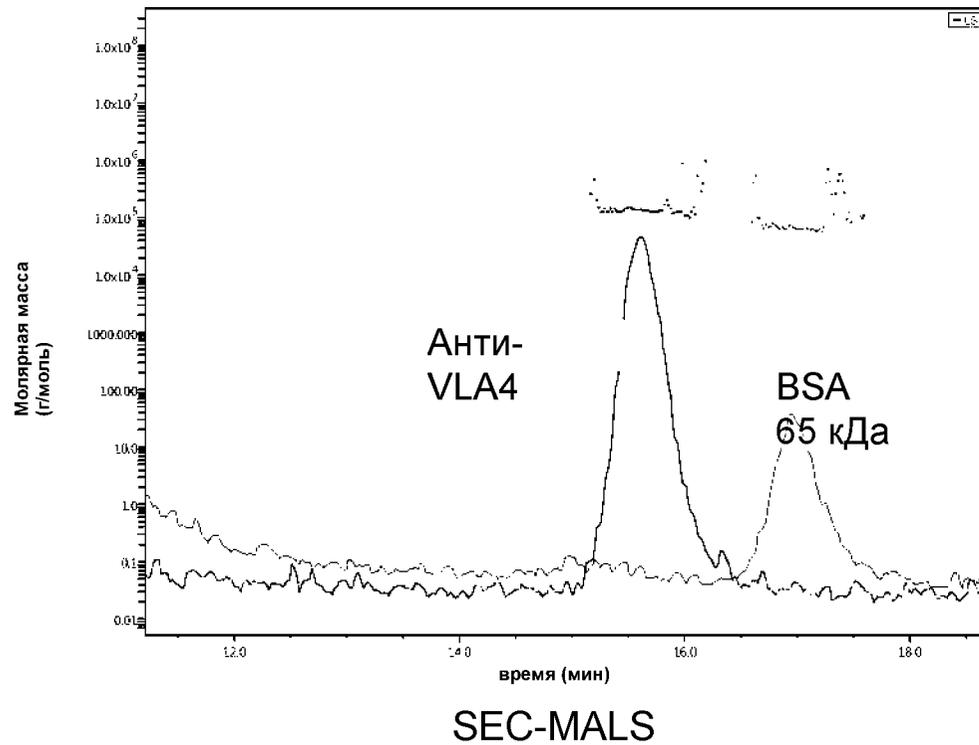
Фигура 19В

Полноразмерный,
очищенный



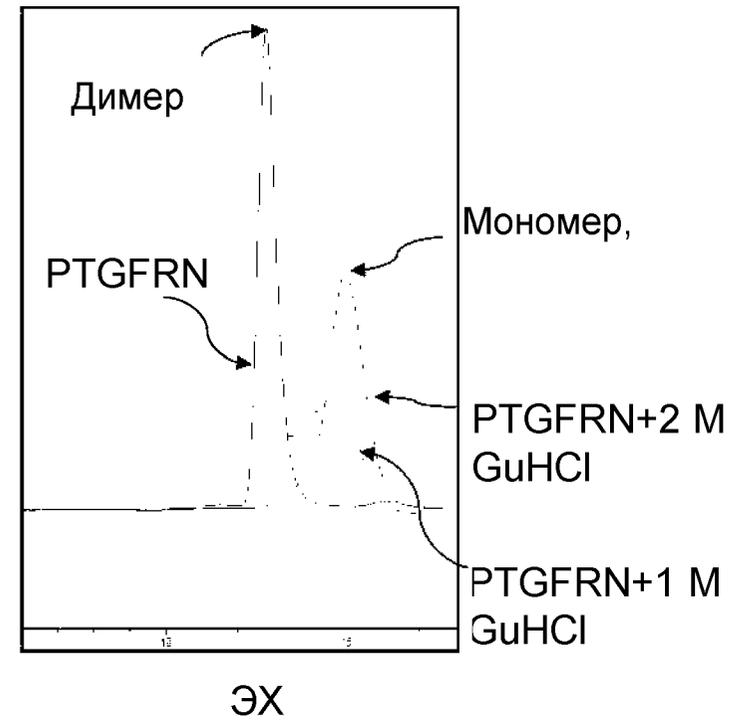
Фигура 20А

PTGFRN ECD провоцирует
олигомеризацию



Фигура 20В

Олигомеризация, чувствительная к
диссоциации GuHCl



Фигура 21

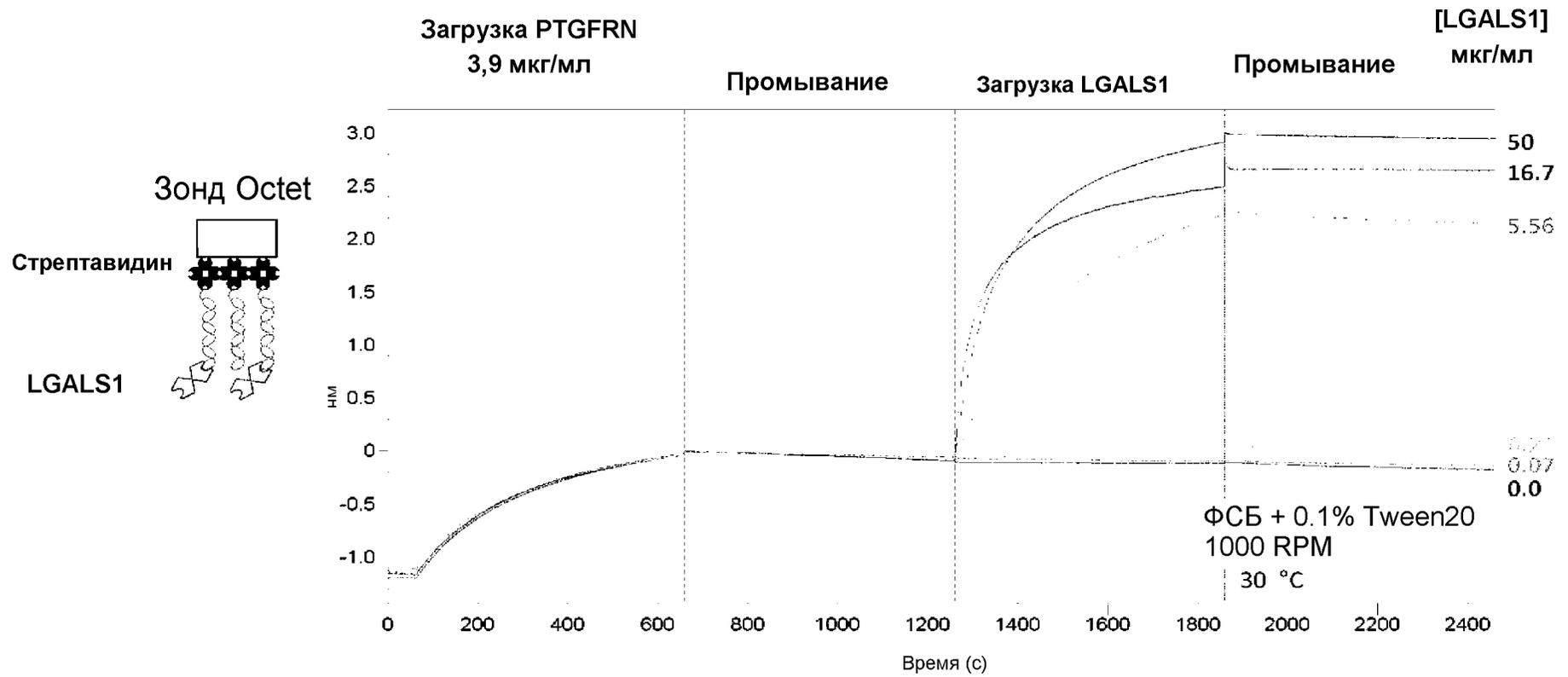
Партнеры по связыванию с эктодоменом PTGFRN (pH 7,4)

Ранг	Название	Оценка
1	LGALS1	144,801
2	FCN1	2,788
3	MGAT4B	9,738

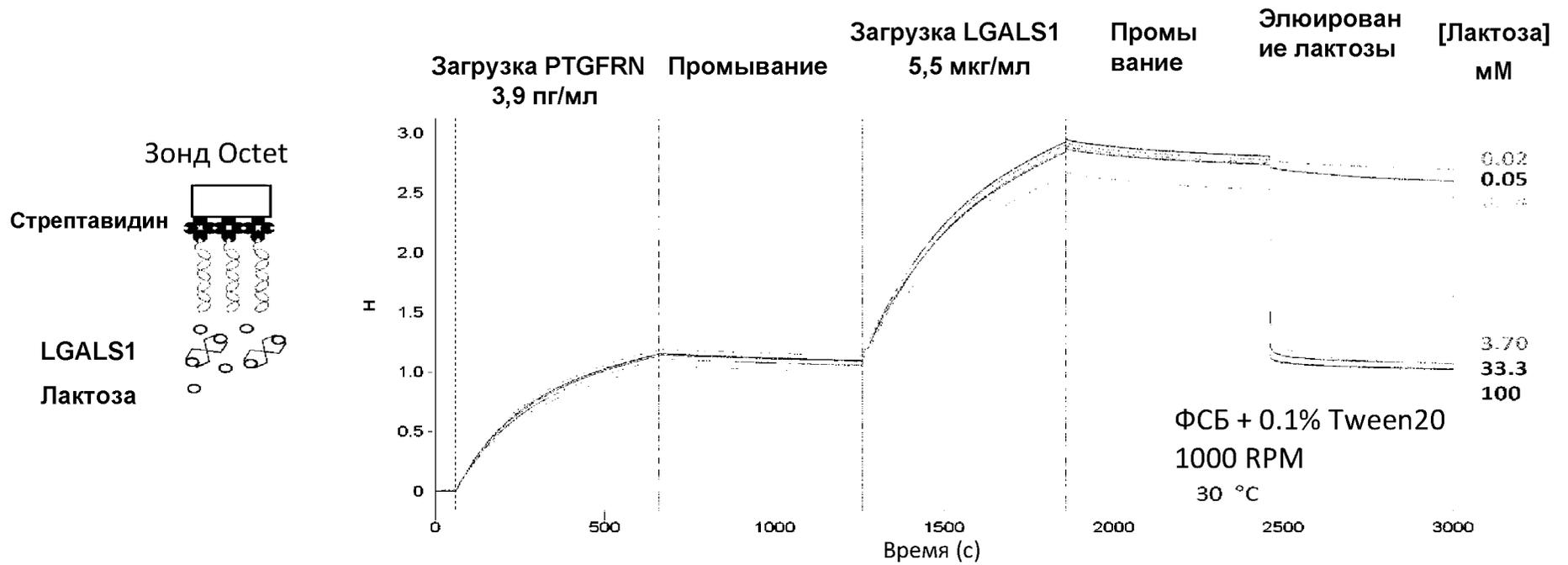
Партнеры по связыванию с эктодоменом PTGFRN (pH 5,6)

Ранг	Название	Оценка
1	EPN1	112,017
2	LGALS1	82,059
3	ZCCHC8	29,974
4	MGAT4B	13,778
5	FCN1	10,605

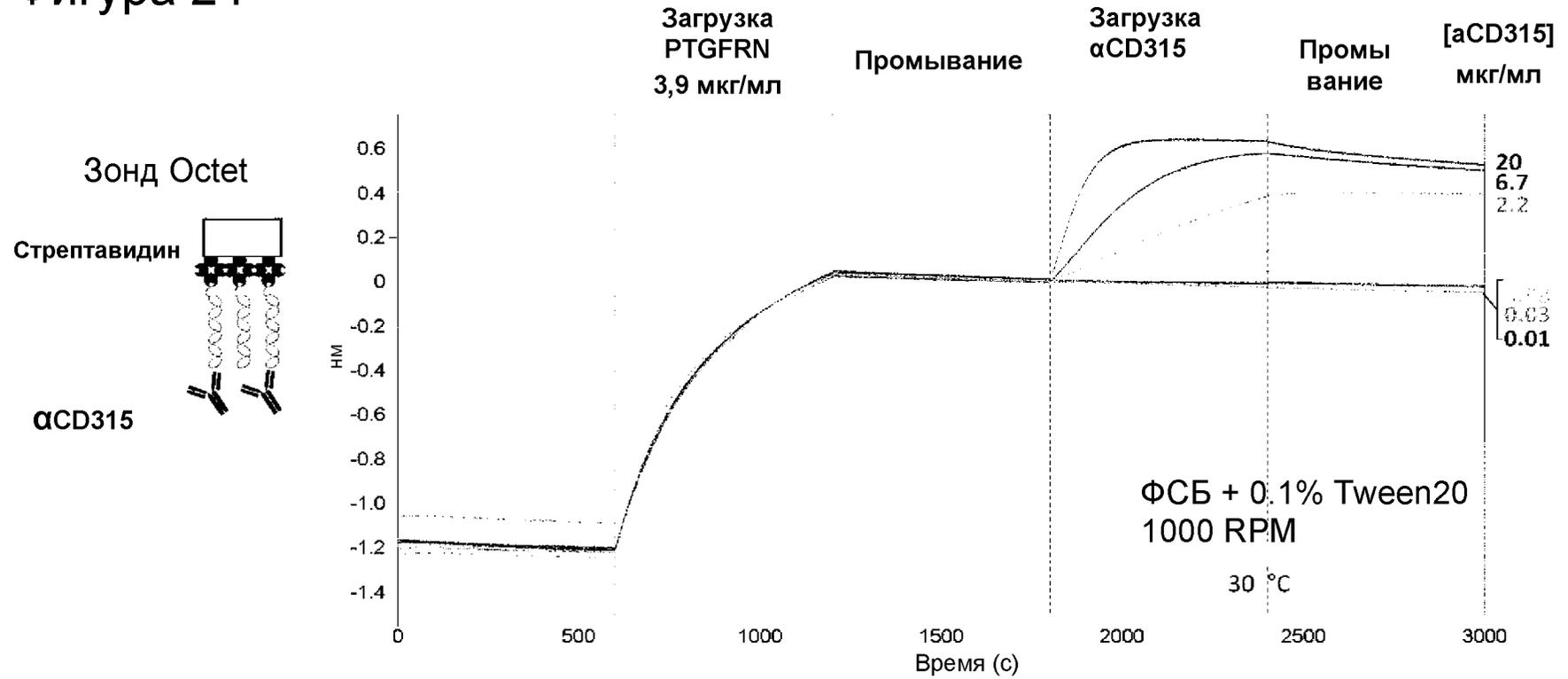
Фигура 22



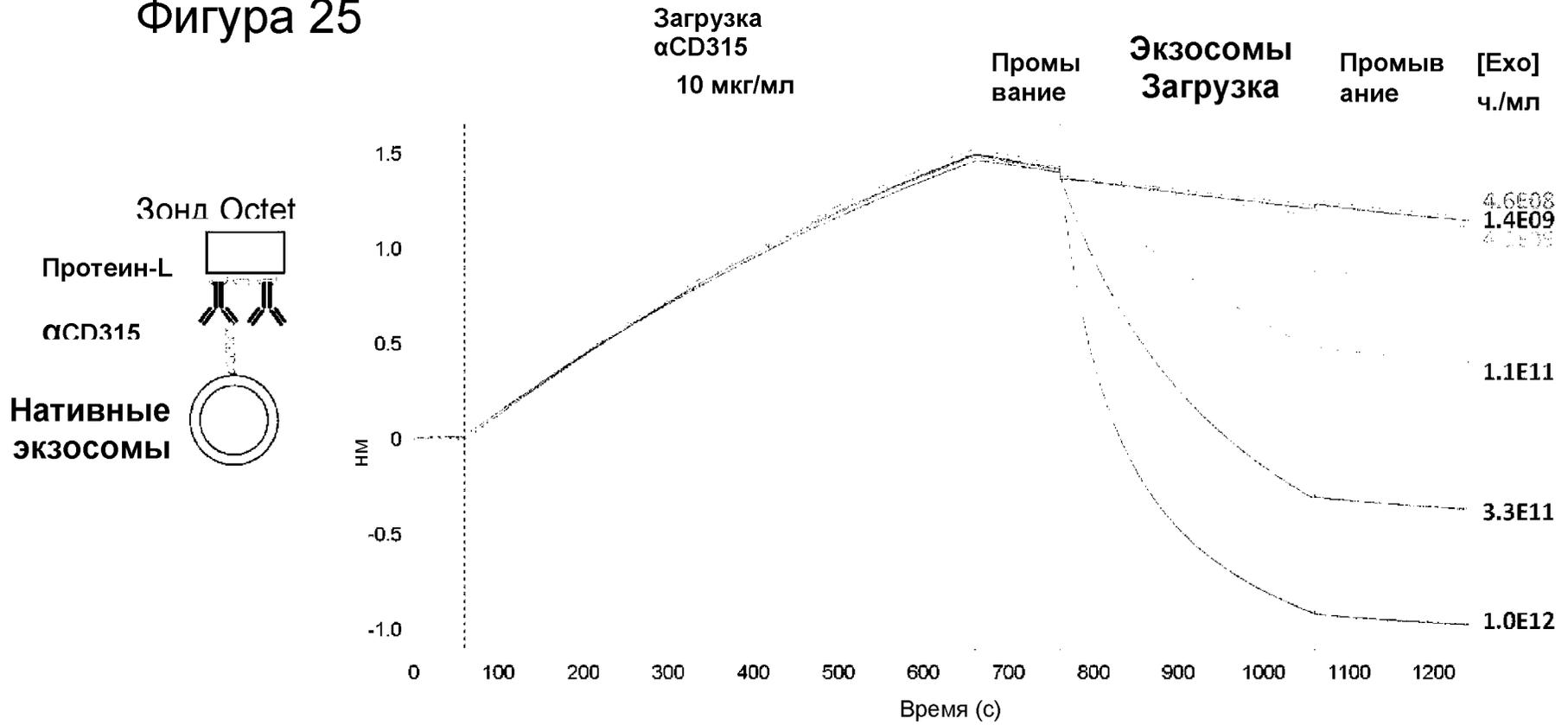
Фигура 23



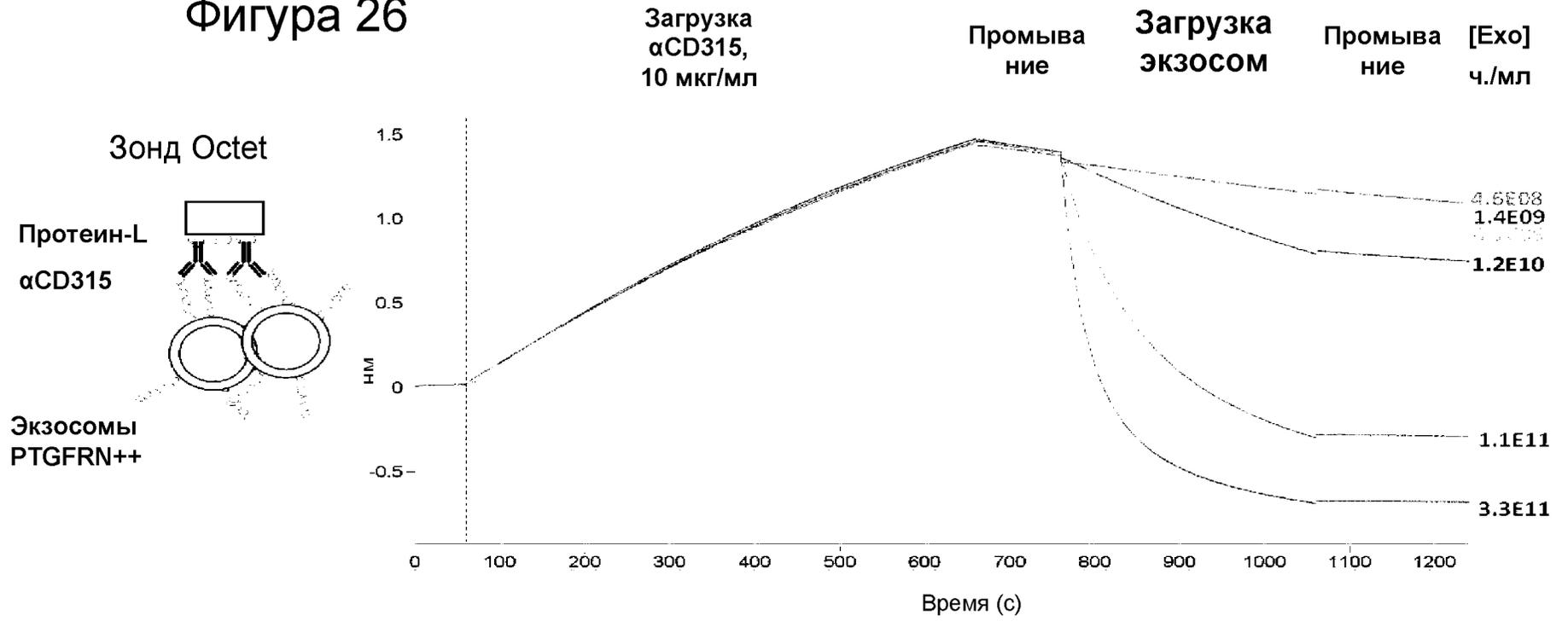
Фигура 24



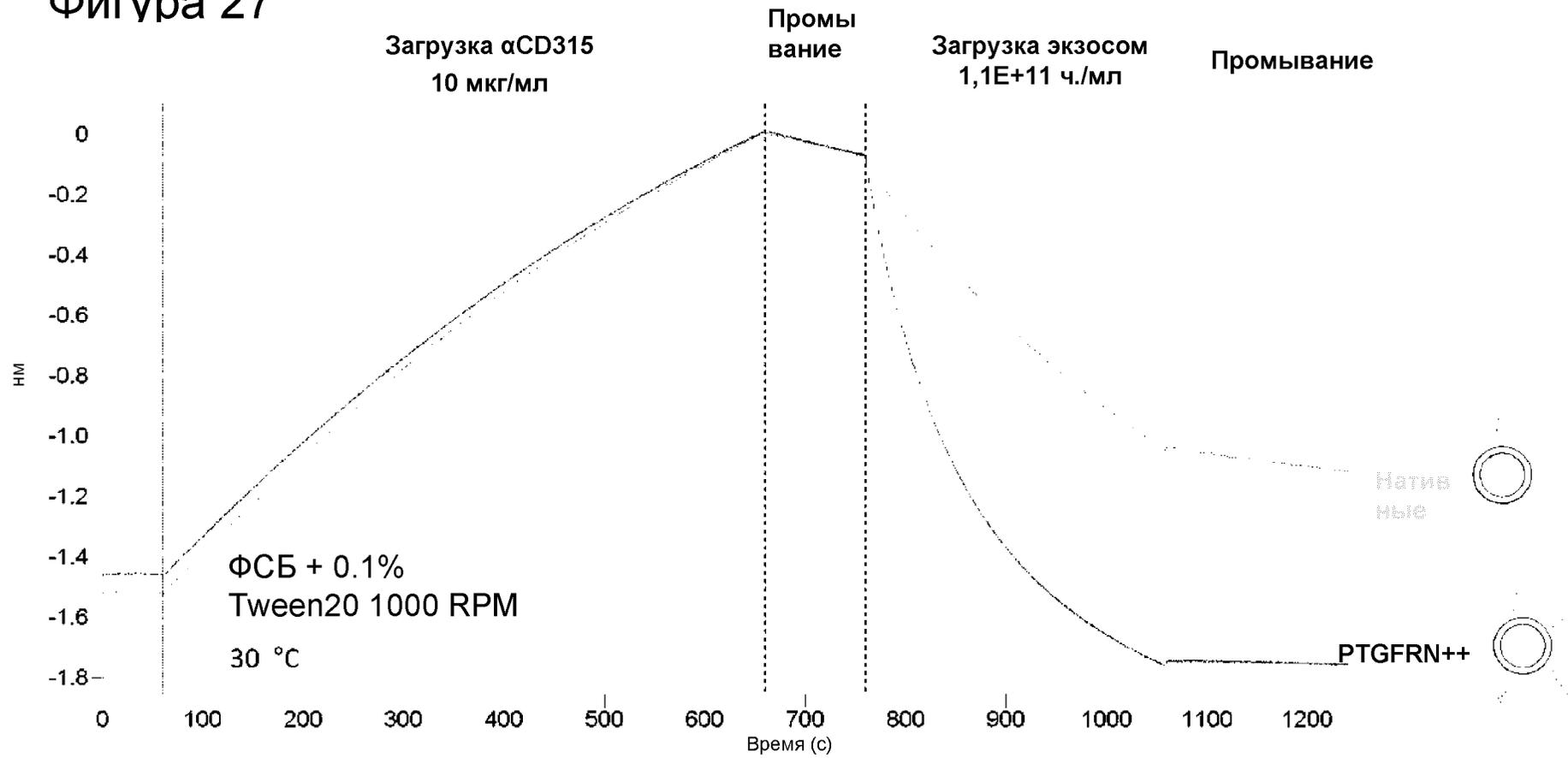
Фигура 25



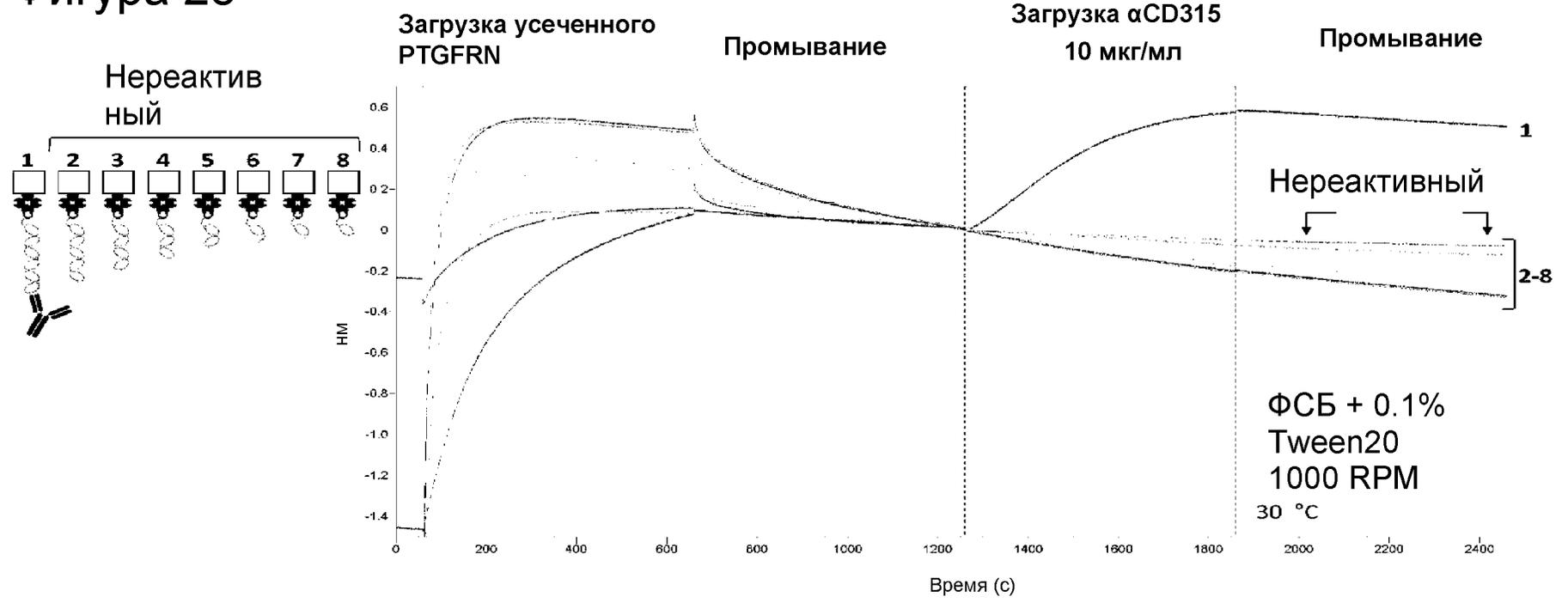
Фигура 26



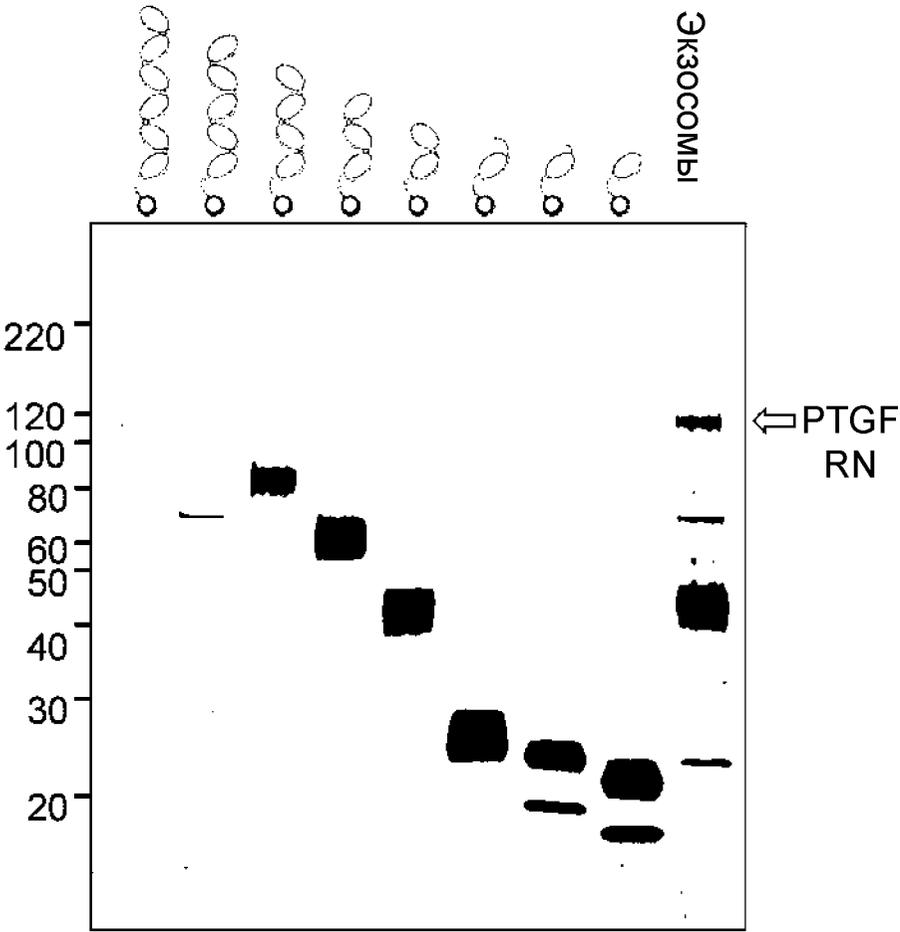
Фигура 27



Фигура 28

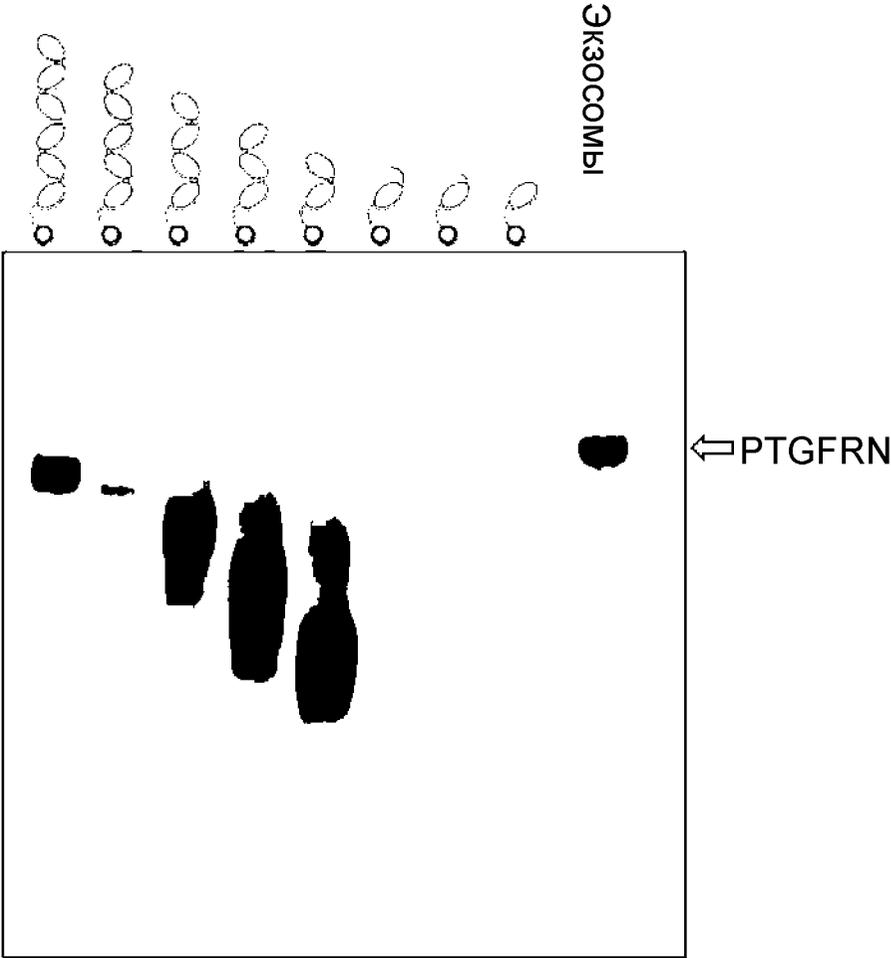


Фигура 29А



4–20% TGX, снижение

Фигура 29В



Объединенные поликлональные Rb, 1:1000

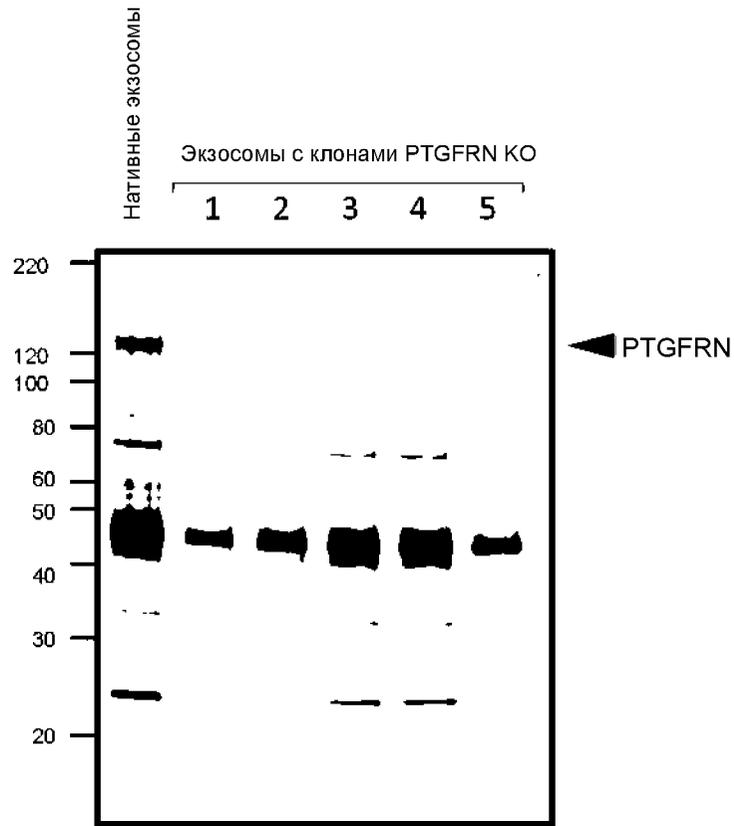
Фигура 31

Кол-во совпадений пептидных спектров (PSM)

PTGFRN	197	151	37	0	0	111
IGSF8	61	19	31	5	10	52
IGSF3	5	3	14	0	0	0
BSG	91	60	62	24	48	82
SLC3A2	163	117	59	117	95	35
ITGB1	74	400	82	252	95	319
CD81	34	21	2	9	9	48
CD9	21	6	0	31	0	41

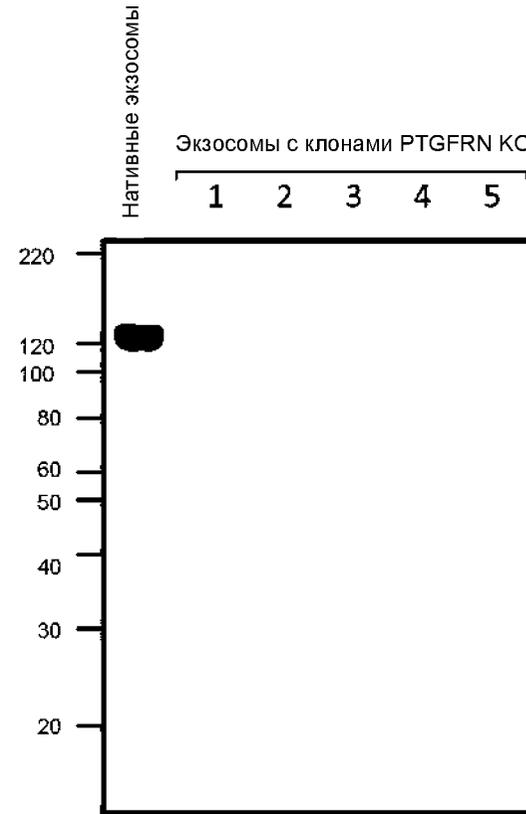
*Выполнялось в ходе отдельного эксперимента

Фигура 32А



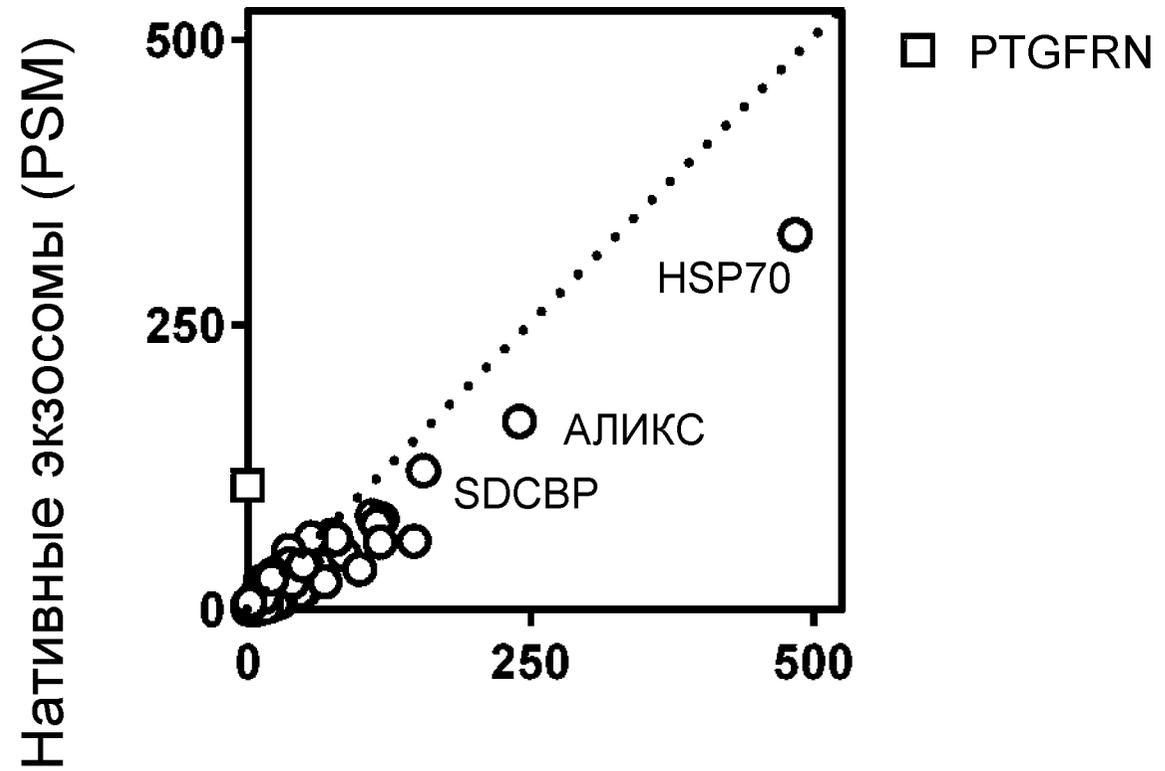
4–20% TGX, снижение PAGE

Фигура 32В



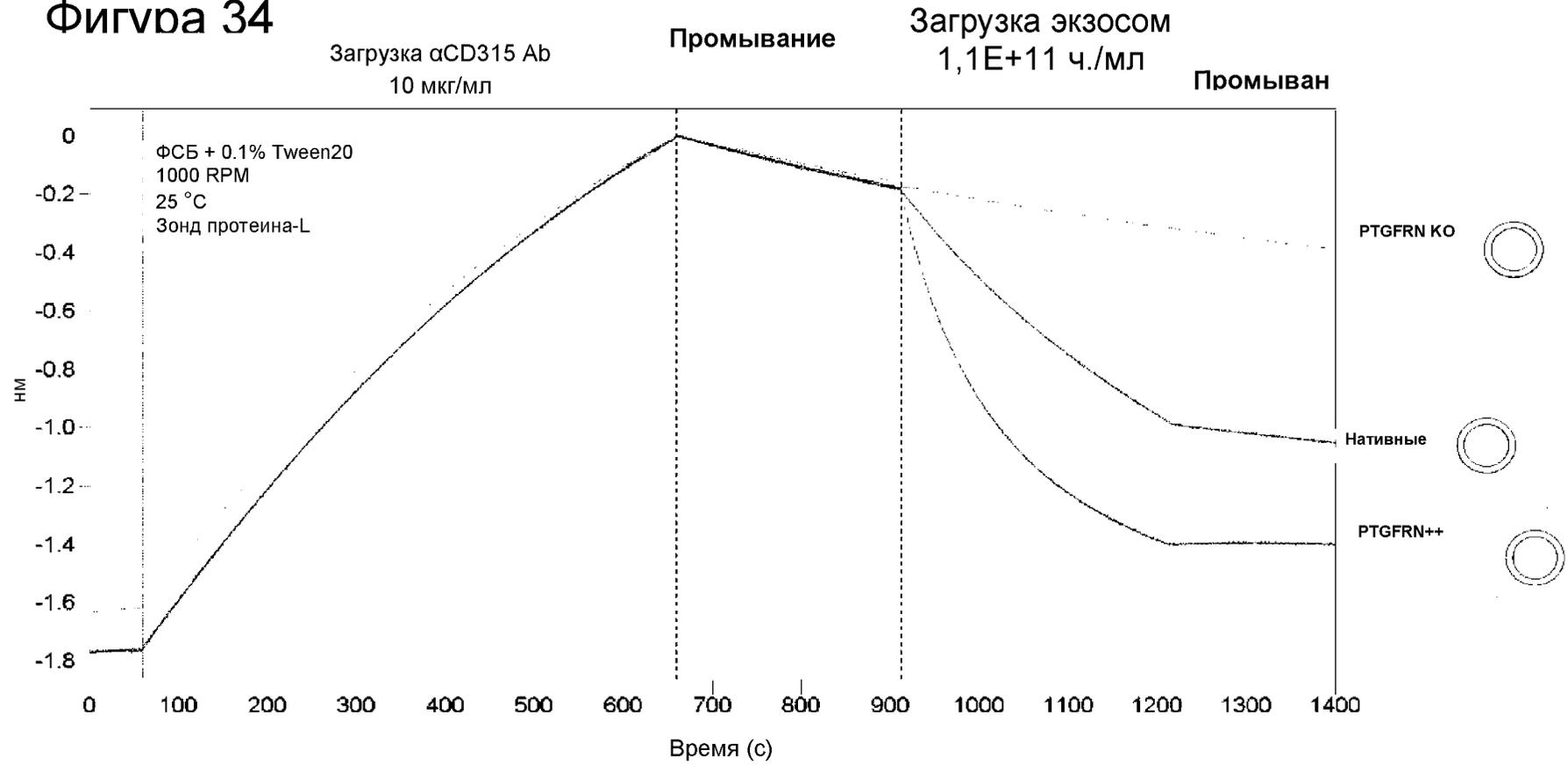
Объединенные поликлональные Rb, 1:1000, вестерн-блоттинг

Фигура 33

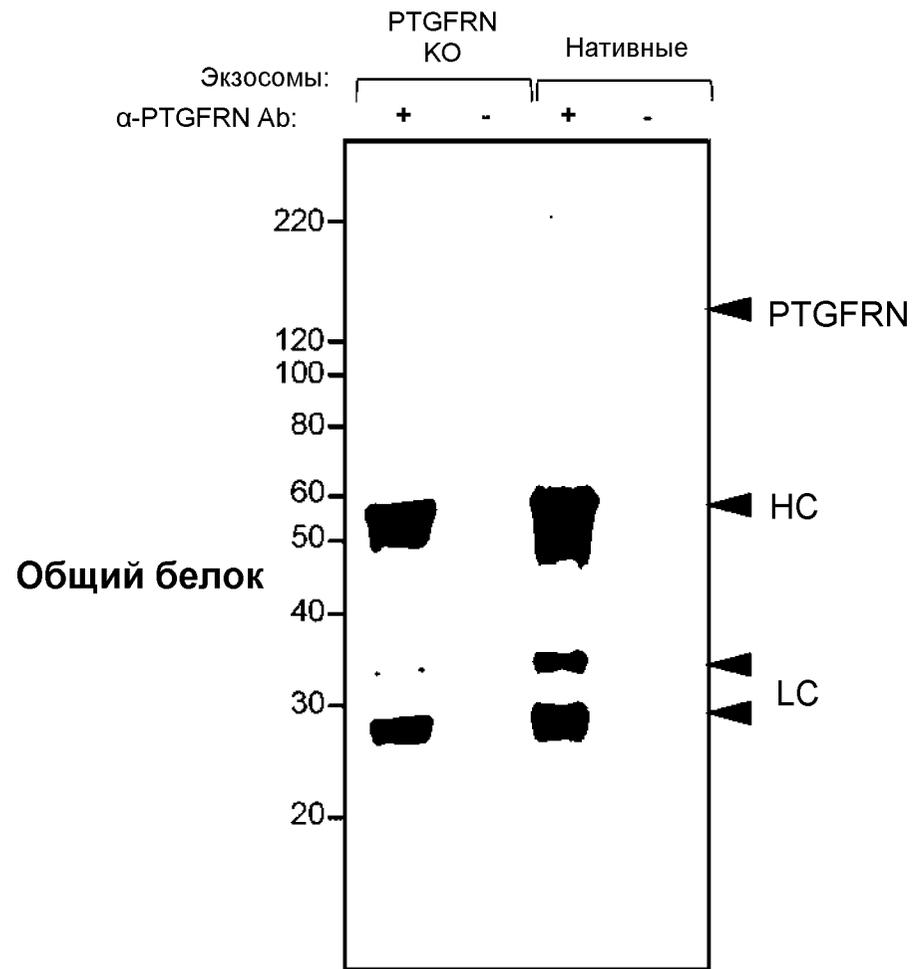


Экзосомы с клонами PTGFRN КО (PSM)

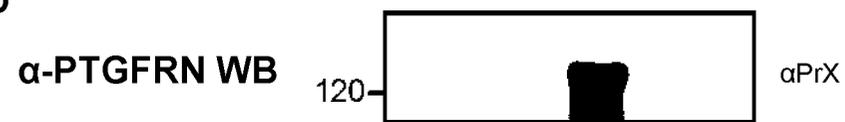
Фигура 34



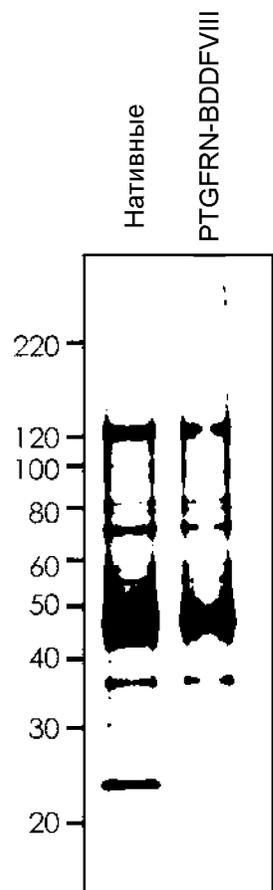
Фигура 35А



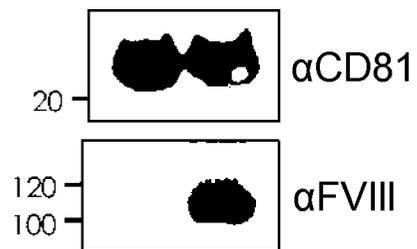
Фигура 35В



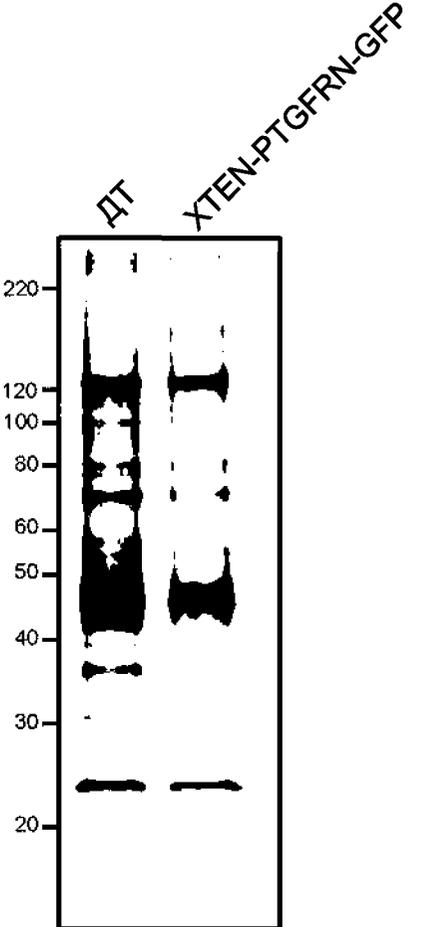
Фигура 36А



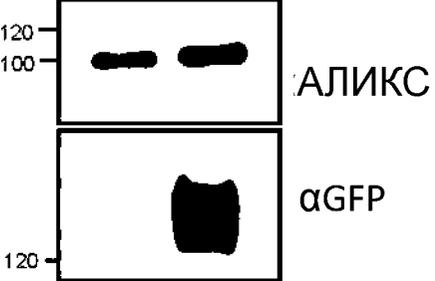
Фигура 36В



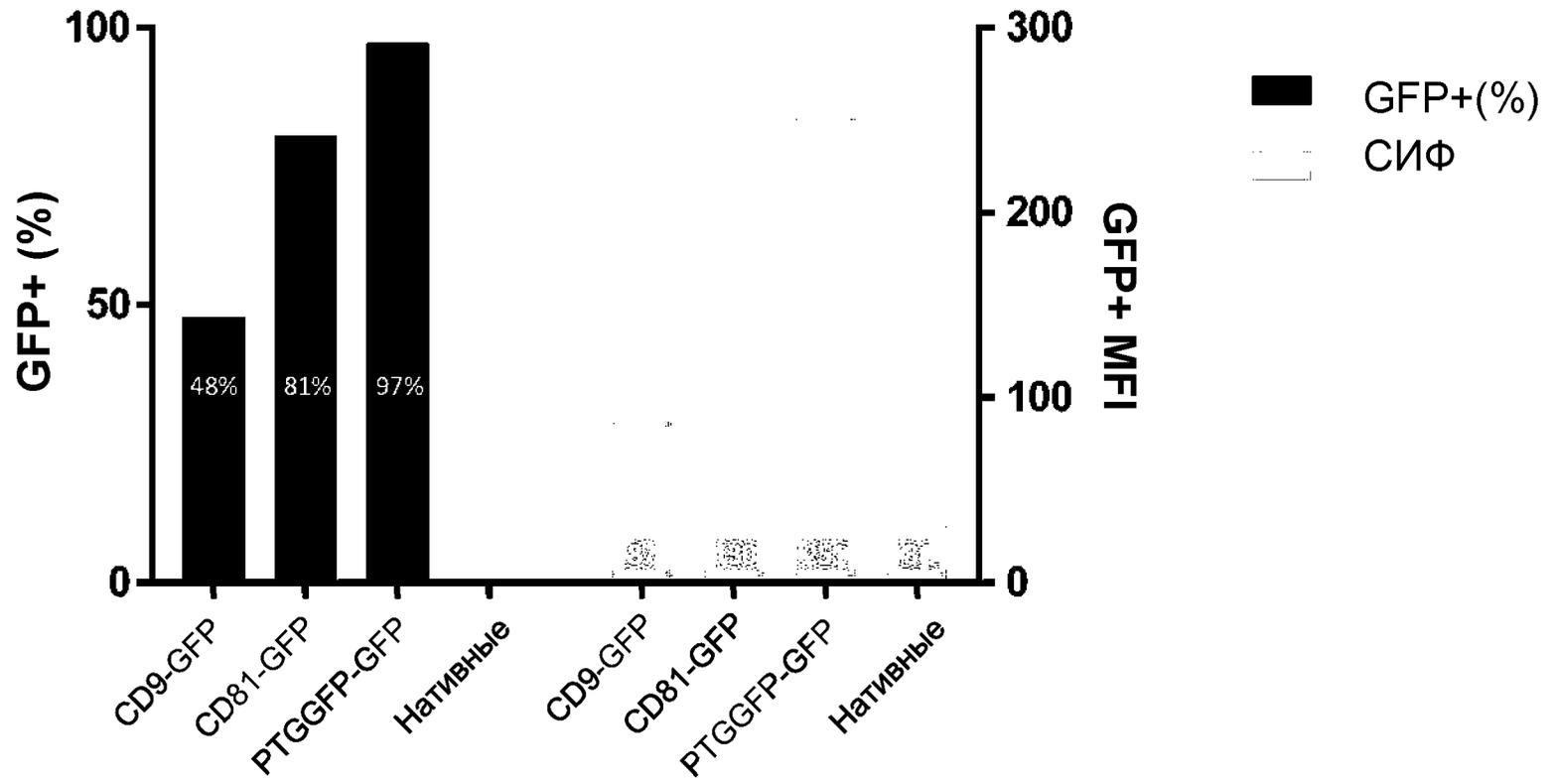
Фигура 37А



Фигура 37В

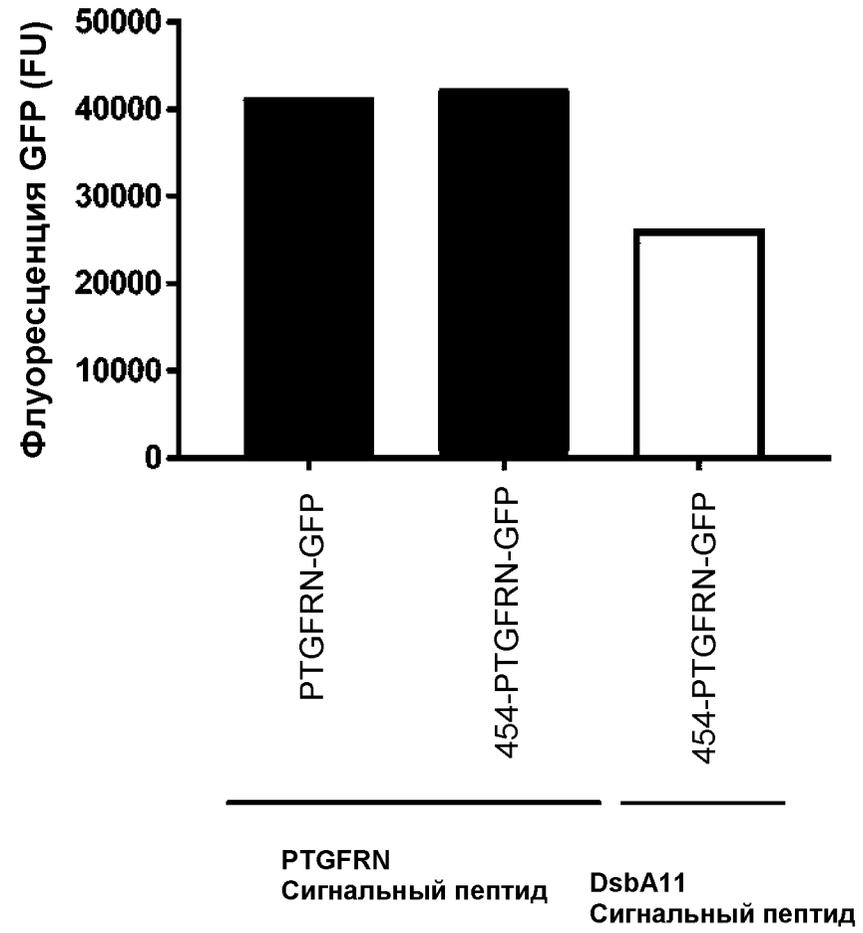


Фигура 38

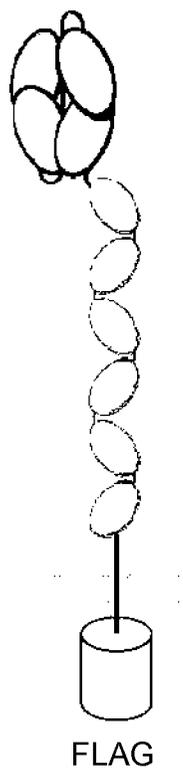


Фигура 39

Зависимая от сигнального пептида экспрессия в экзосомах

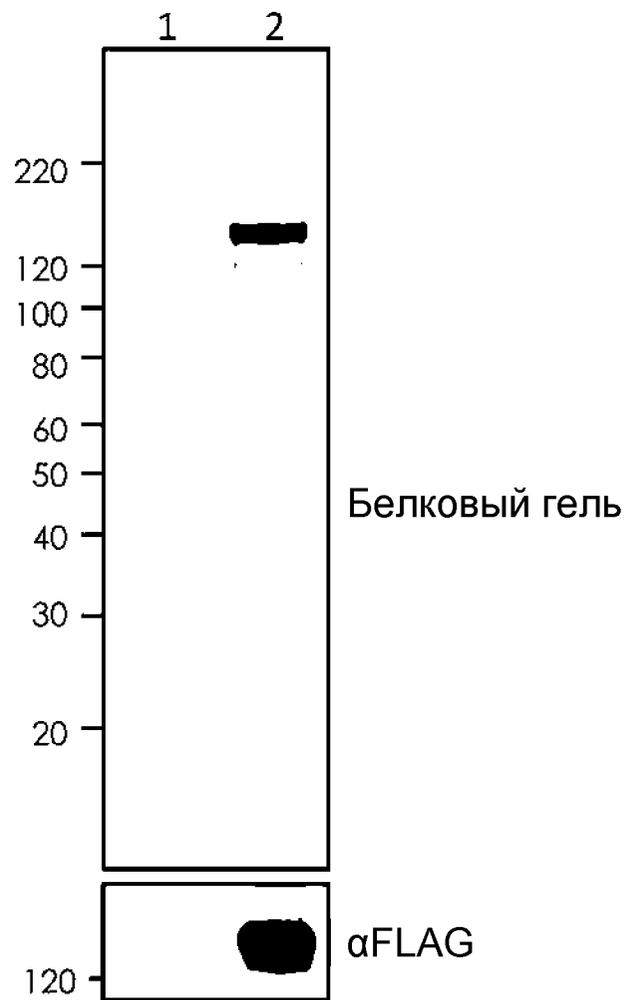


Фигура 40А

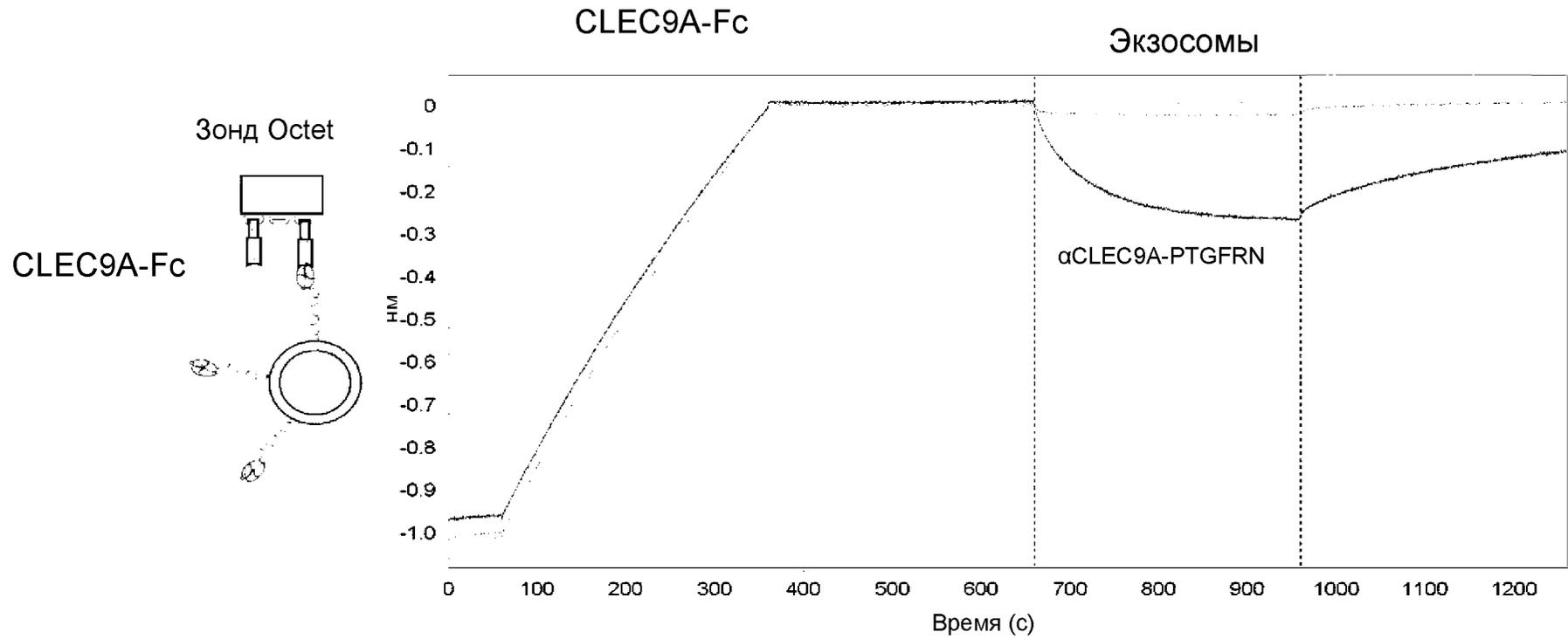


scFab-aCLEC9A-PTGFRN-mEGFP-FLAG

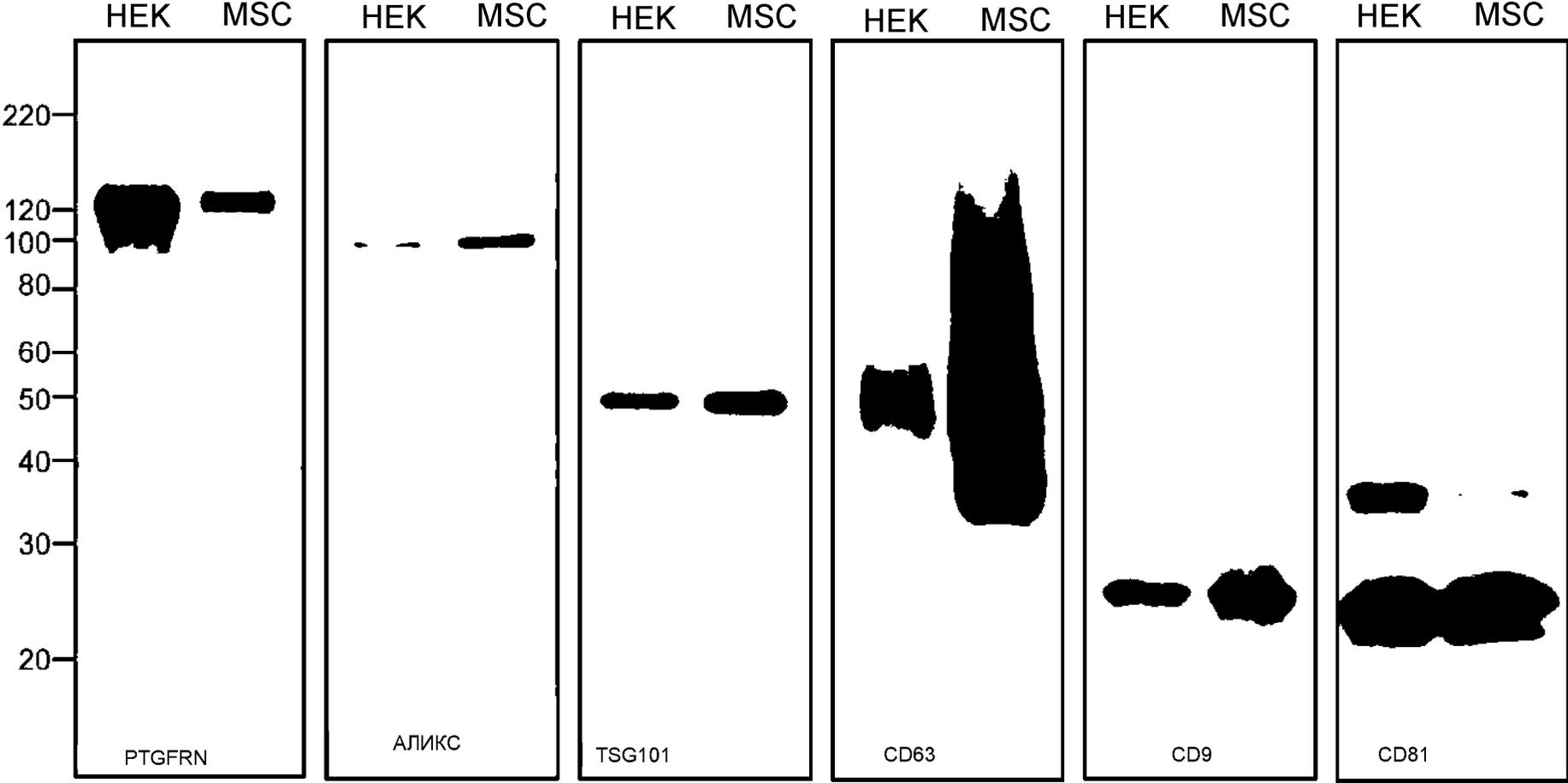
Фигура 40В



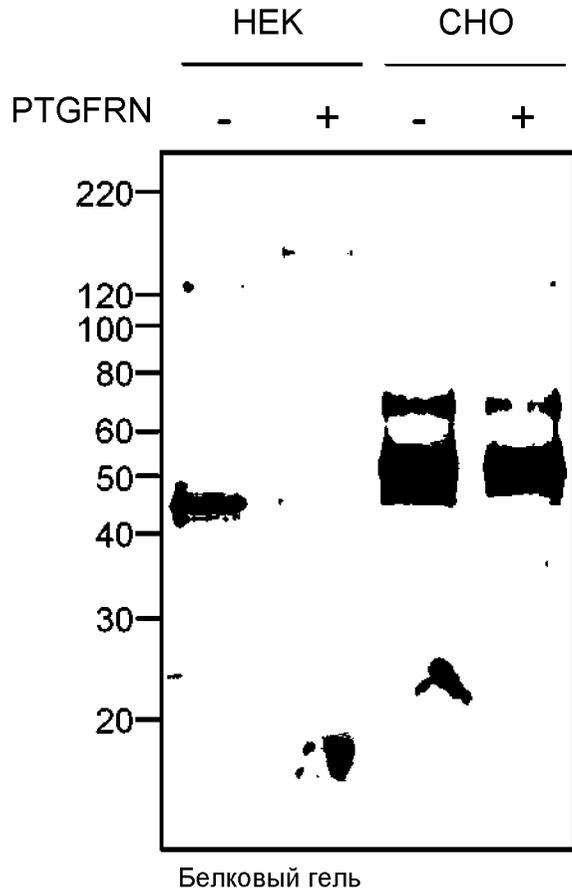
Фигура 41



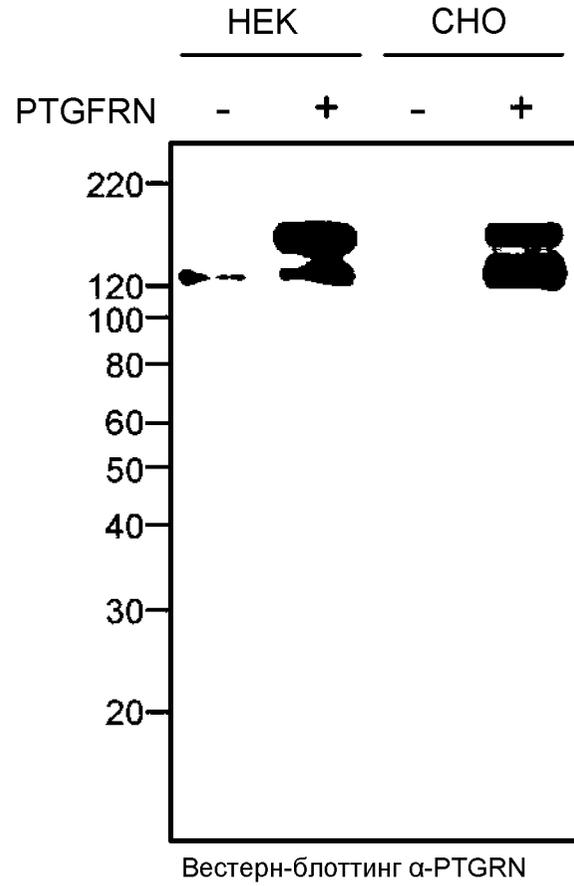
Фигура 42



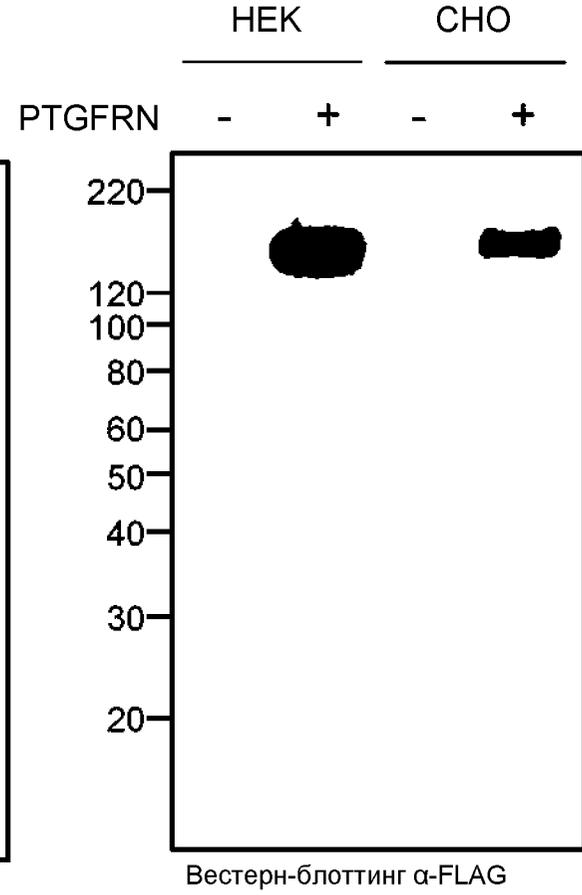
Фигура 43А



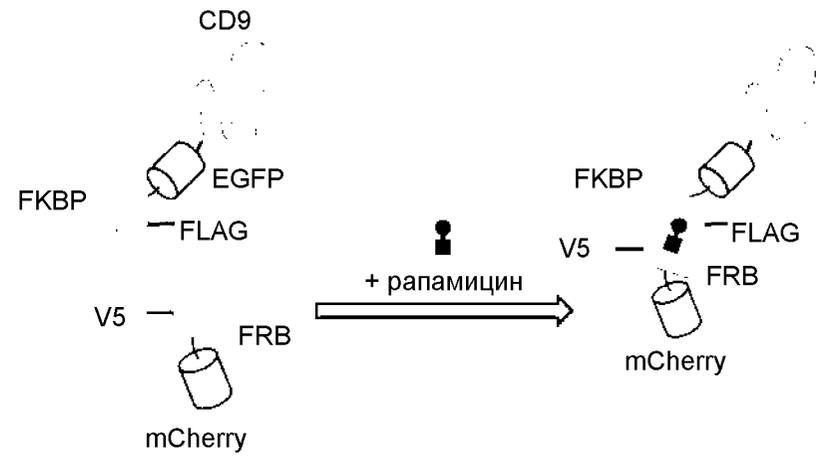
Фигура 43В



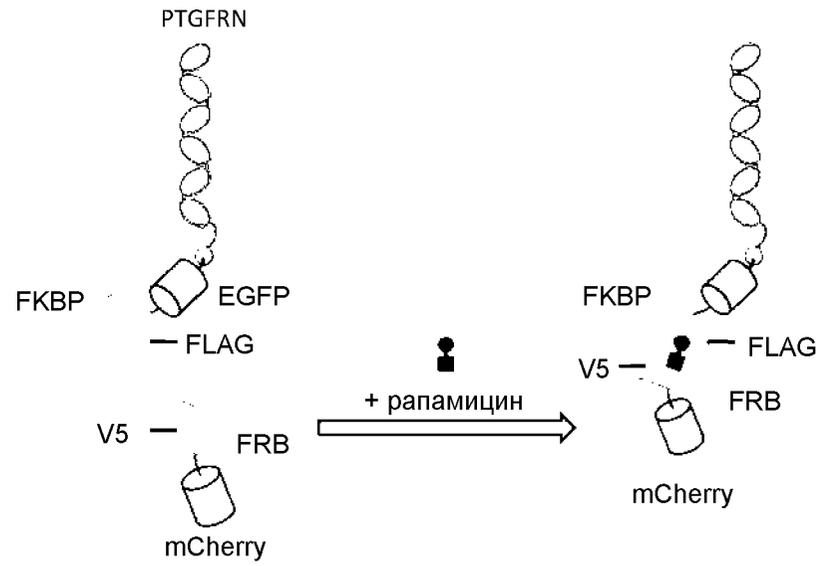
Фигура 43С



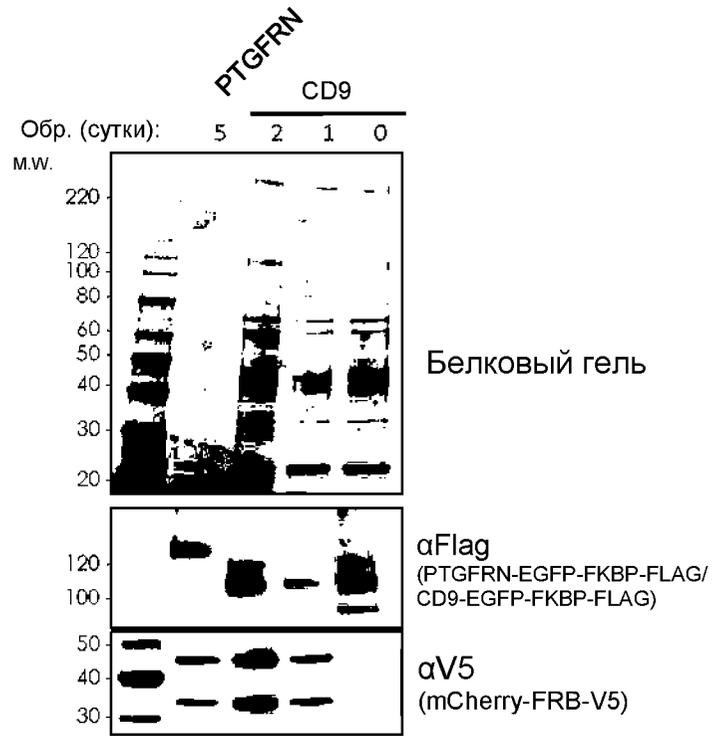
Фигура 44А



Фигура 44В



Фигура 45А



Фигура 45В

