

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090832** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.13

(51) Int. Cl. *A61K 38/02* (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.16

**(54) КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ЭКЗОСОМ И СПОСОБЫ ЗАГРУЗКИ
ПОЛЕЗНЫХ НАГРУЗОК В ПРОСВЕТ ЭКЗОСОМЫ**

(31) 62/587,767; 62/634,750

(32) 2017.11.17; 2018.02.23

(33) US

(86) PCT/US2018/061679

(87) WO 2019/099942 2019.05.23

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

(72) Изобретатель:

**Макконнелл Расселл Е., Дули
Кевин П., Харрисон Рэйн А., Сюй Кэ,
Хоуд Дэмиан Дж., Хаупт Соня, Кулман
Джон Д., Уилльямс Дуглас Е., Юнисс
Маделин (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения терапевтической экзосомы с использованием впервые идентифицированных белков, которыми обогащен просвет экзосом. В частности, настоящее изобретение относится к способам локализации терапевтического пептида или белка в экзосомах. Способы включают в себя создание сконструированных с просветом экзосом, которые включают один или несколько экзосомных белков в более высоких концентрациях, модификацию или фрагмент экзосомного белка или гибридный белок экзосомного белка и терапевтический или загружаемый белок.

A1

202090832

202090832

A1

КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ЭКЗОСОМ И СПОСОБЫ ЗАГРУЗКИ ПОЛЕЗНЫХ НАГРУЗОК В ПРОСВЕТ ЭКЗОСОМЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/587 767, поданной 17 ноября 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/634 750, поданной 23 февраля 2018 г., раскрытия которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Рассматриваемая в настоящий момент заявка включает перечень последовательностей, направленный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 15 ноября 2018 года, называется 41406US_CRF_sequencelisting.txt и имеет размер 57 837 байта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] 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.

[0004] Главной особенностью экзосом является их способность содержать биологически активную полезную нагрузку в пределах их внутреннего пространства, т. н. просвета. Хорошо известно, что экзосомы содержат эндогенную полезную нагрузку, включая мРНК, микроРНК, ДНК, белки, углеводы и липиды, но в настоящее время способность направлять специфическую нагрузку желаемой терапевтической полезной нагрузки ограничена. Экзосомы могут быть загружены посредством избыточной экспрессии желаемых терапевтических полезных нагрузок в клетке-производителе, но эта нагрузка часто имеет ограниченную эффективность из-за стохастической локализации полезной нагрузки в клеточных центрах обработки экзосом. Альтернативно, очищенные экзосомы могут быть загружены *ex vivo*, например, путем электропорации. Эти методы могут показывать низкую эффективность или ограничиваться небольшими полезными нагрузками, такими как миРНК. Следовательно, необходимы способы, подходящие для создания высокоэффективных и четко определенных нагруженных экзосом, для лучшего

обеспечения терапевтического использования и других применений технологий на основе экзосом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Аспект настоящего изобретения относится к новым способам загрузки экзосом для терапевтического применения. В частности, в данных способах используются белковые маркеры, впервые идентифицированные из просвета экзосом. В частности, в просветах экзосом в больших количествах были определены определенные группы белков (*например*, связанный с миристиновой кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы 1 (MARCKSL1) и кислоторастворимый белок головного мозга 1 (BASP1)). Кроме того, было показано, что короткой последовательности аминоконца BASP1 достаточно для направления высокоэффективной загрузки молекул флуоресцентного белка в той же степени, что и полноразмерного белка BASP1. Данный фрагмент, содержащий менее десяти аминокислот, представляет собой значительный прогресс в области загрузки сконструированных экзосом и позволяет эффективно воспроизводить загрузку любого терапевтического белкового груза в просвет экзосом без каких-либо дополнительных этапов манипуляции *ex vivo*. Загрузка экзосом с использованием гибридных белков, описанных в настоящем документе, приводит к получению сконструированных экзосом со значительно более высоким уровнем груза по сравнению с любым другим способом генной инженерии из описанных до настоящего времени.

[0006] Белки и пептидные последовательности, недавно идентифицированные в экзосомах, используются в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. Например, некоторые варианты осуществления относятся к генерации гибридного белка путем конъюгирования экзосомного белка или фрагмента белка и терапевтически релевантного белка и получения экзосомы, содержащей гибридный белок, в просвете экзосомы. Нативный полноразмерный белок или биологически активный фрагмент терапевтически релевантного белка может быть перенесен в просвет экзосом путем конъюгирования с фрагментами белков или белками, обогащенными экзосомами.

[0007] Настоящее изобретение также относится к созданию или применению сконструированной с просветом экзосомы, предназначенной для более эффективной загрузки или для загрузки терапевтически релевантного белка в просвет экзосомы. Например, просветы экзосом могут быть модифицированы для удержания в просвете более высокой концентрации нативных полноразмерных экзосомных белков и/или фрагментов или модифицированных белков нативного экзосомного белка.

[0008] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к клетке-продуценту или способу генерации клетки-продуцента для выработки такой сконструированной с просветом экзосомы. Экзогенный полинуклеотид может быть временно или стабильно введен в клетку-продуцент, чтобы заставить клетку-продуцент вырабатывать сконструированные с просветом экзосомы.

[0009] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к экзосоме, содержащей целевой белок, где по меньшей мере часть целевого белка экспрессируется из экзогенной последовательности, а целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию.

[0010] В некоторых вариантах осуществления целевой белок присутствует в экзосоме с более высокой плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме, причем другой целевой белок включает в себя обычный экзосомный белок или его вариант. В некоторых вариантах осуществления обычный экзосомный белок выбран из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.

[0011] В некоторых вариантах осуществления экзосома получена из клетки, генетически модифицированной для включения в нее экзогенной последовательности, причем клетка необязательно представляет собой клетку HEK293.

[0012] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.

[0013] В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце геномной последовательности, кодирующей MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0014] В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент и терапевтический пептид.

[0015] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или модификацию.

[0016] В некоторых вариантах осуществления экзосома дополнительно содержит второй целевой белок, в котором второй целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления экзосома дополнительно содержит второй целевой белок, где второй целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент.

[0017] В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118). В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

[0018] В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 4–110. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 116). В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит пептид SEQ ID NO: 13.

[0019] В некоторых вариантах осуществления целевой белок дополнительно содержит загружаемый пептид.

[0020] В другом аспекте настоящее изобретение представляет фармацевтическую

композицию, содержащую экзосому и наполнитель.

[0021] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит макромолекул, где макромолекулы выбраны из нуклеиновых кислот, экзогенных белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.

[0022] В еще одном аспекта настоящее изобретение относится к популяции клеток для получения представленных в данном документе экзосом.

[0023] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает экзогенную последовательность, кодирующую целевые белки, содержащие MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно содержит вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй целевой белок, где второй целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно содержит вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй целевой белок, где второй целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенную последовательность встраивают в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, в котором экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют целевой белок. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность находится в плазмиде.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенная последовательность кодирует терапевтический пептид. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или модификацию.

[0026] В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность кодирует нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент

специфичен для органа, ткани или клетки.

[0027] В некоторых вариантах осуществления второй целевой белок дополнительно содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки.

[0028] В одном аспекте настоящее изобретение представляет полипептид для модификации экзосом, содержащий последовательность (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118); (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы состоящий из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu); или (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

[0029] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 4–110. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 116).

[0030] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид конденсирован с загружаемым пептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид конденсирован с N-концом загружаемого пептида.

[0031] В одном аспекте настоящее изобретение представляет полинуклеотидную конструкцию, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую полипептид, представленный в данном документе. В некоторых вариантах кодирующая последовательность оптимизирована по кодонам.

[0032] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления сконструированной экзосомы, содержащий этапы: а) введения в клетку конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, содержащий (i) первую последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию, и (ii) вторую последовательность, кодирующую загружаемый пептид; б) выдерживания клетки в условиях, позволяющих клетке экспрессировать гибридный полипептид; и с) получения из указанной клетки сконструированной экзосомы, содержащей гибридный полипептид.

[0033] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность содержит последовательность (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118); (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы состоящий из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu); или (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

[0034] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 4–110. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 116).

[0035] В некоторых вариантах осуществления гибридный полипептид присутствует в просвете сконструированной экзосомы с более высокой плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме, причем другой целевой белок включает в себя обычный экзосомный белок или его вариант. В некоторых вариантах осуществления гибридный

полипептид присутствует с более чем в 2 раза большей плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме. В некоторых вариантах осуществления гибридный полипептид присутствует с более чем 4 раза, 16 раз, 100 раз или 10 000 раз более высокой плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] На фигурах изображены 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.

[0037] На ФИГ. 1 представлено изображение градиента плотности Optiprep™, содержащего образец, после ультрацентрифугирования. Скобками помечены верхняя фракция, содержащая экзосомы («Верх»), средняя фракция, содержащая клеточный дебрис («Середина») и нижняя фракция, содержащая агрегаты высокой плотности и клеточный дебрис («Низ»).

[0038] На ФИГ. 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 (включая белки MARCKS, MARCHSL1 и BASP1), тогда как белки, расположенные ниже пунктирной линии, представляют белки, не специфичные для экзосом.

[0039] На ФИГ. 3 представлена карта покрытия триптического пептида MARCKS (SEQ ID NO: 1).

[0040] На ФИГ. 4 представлена карта покрытия триптического пептида MARCKSL1 (SEQ ID NO: 2).

[0041] На ФИГ. 5 представлена карта покрытия триптического пептида BASP1 (SEQ ID NO: 3).

[0042] На ФИГ. 6А показана картина белкового блоттинга общего клеточного лизата (слева) и очищенных экзосомных популяций (справа), собранных из клеток HEK293. Вестерн-блоттинг геля, представленного на ФИГ. 6А, показывает, что MARCKS (**ФИГ. 6В**), MARCKSL1 (**ФИГ. 6С**) и BASP1 (**ФИГ. 6Д**) локализованы в очищенных экзосомах и либо не обнаруживаются в общем клеточном лизате, либо находятся на существенно более низких уровнях в клеточном лизате по сравнению с экзосомами.

[0043] На ФИГ. 7 показана интенсивность флуоресценции очищенных экзосом, содержащих GFP, конденсированных с фрагментом MARCKS, содержащим аминокислоты 1–30, CD81 или pDisplay.

[0044] На ФИГ. 8 показана интенсивность флуоресценции очищенных экзосом, содержащих GFP, конденсированный с полноразмерным MARCKSL1, фрагментом MARCKSL1, содержащим аминокислоты 1–30, CD81 или pDisplay.

[0045] На ФИГ. 9 показана интенсивность флуоресценции очищенных экзосом, содержащих GFP, конденсированный с полноразмерным BASP1, фрагментом BASP1, содержащим аминокислоты 1–30, CD81 или pDisplay.

[0046] На ФИГ. 10 показана схема гибридных белков, используемых для определения минимальной BASP1 N-концевой последовательности, достаточной для загрузки экзосом (SEQ ID NO 122–134 соответственно в порядке появления). Гибридным белкам присваивается номер, указанный в «pCB».

[0047] На ФИГ. 11 показан график нанопоточной цитометрии, измеряющий сигнал флуоресценции экзосом, сконструированных для экспрессии фрагментов BASP1, конденсированных с GFP. Ось X маркирована в соответствии с номерами, присвоенными различным гибридным белкам, как показано на ФИГ. 10.

[0048] На ФИГ. 12 показано изображение окрашенного белкового геля, показывающее равную загрузку экзосом, загруженных фрагментами BASP1, конденсированного с GFP. Пунктирная стрелка указывает положение миграции гибридных белков BASP1. Полосы пронумерованы в соответствии с номерами, присвоенными различным гибридным белкам, как показано на ФИГ. 10.

[0049] На ФИГ. 13 показано изображение белкового геля, окрашенного синим красителем Coomassie для маркировки общего белка. Пунктирная стрелка указывает положение миграции гибридных белков BASP1. Полосы помечены номерами, присвоенными различным гибридным белкам, как показано на ФИГ. 10.

[0050] На ФИГ. 14 показано изображение блоттинга анти-FLAG белка очищенных экзосом, содержащих фрагменты BASP1, конденсированные с FLAG и GFP. Полосы пронумерованы в соответствии с номерами, присвоенными различным гибридным белкам, как показано на ФИГ. 10.

[0051] На ФИГ. 15 показано изображение блоттинга анти-Аликс-белка очищенных экзосом, содержащих фрагменты BASP1, конденсированные с FLAG и GFP, подтверждающие одинаковую нагрузку белка. Полосы пронумерованы в соответствии с

белковыми последовательностями, показанными на ФИГ. 10.

[0052] На ФИГ. 16А показаны последовательности гибридных белков, содержащих фрагмент BASP1, конденсированный с меткой FLAG и GFP (SEQ ID NO: 135-142, соответственно, в порядке появления). **На ФИГ. 16В** показаны результаты вестерн-блоттинга анти-FLAG для экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих один из гибридных белков, на ФИГ. 16А.

[0053] На ФИГ. 17А показаны последовательности из фрагмента BASP1 (1–30) (SEQ ID NO: 4) и его модификации (1–30-S6D, 1–30-S6A и 1–30-L5Q), конденсированные с меткой FLAG и GFP (SEQ ID NOS 143-145, соответственно, в порядке появления). **На ФИГ. 17В** показаны результаты вестерн-блоттинга анти-FLAG для экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих один из гибридных белков, на ФИГ. 17А.

[0054] На ФИГ. 18 показано изображение белкового геля, окрашенного красителем Coomassie, с экзосомными образцами, очищенными из клеток, стабильно экспрессирующих полноразмерные MARCKSL1, BASP1 или конденсированные с FLAG-GFP аминокислоты 1–30 MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. Черные стрелки на изображении указывают полосы, соответствующие гибридным белкам.

[0055] На ФИГ. 19 показано выравнивание последовательности белка между первыми 28 аминокислотами BASP1 (консервативная область 1), аминокислотами 1–7 и 152–173 MARCKS (консервативная область 2) и аминокислотами 1–7 и 87–110 MARCKSL1 (консервативная область 3).

[0056] На ФИГ. 20А показаны последовательности аминокислот 1–30 В ASP 1 («BASP1–30») (SEQ ID NO: 4) и гибридные белки, содержащие аминокислоты 1–3 MARCKS или его модификации, конденсированные с PSD-доменом MARCKS или его модификации («MARCKS-MG-PSD», «MARCKS-MA-PSD», «MARCKS-MG-PSD-K6S» и «MARCKS-MG-PSD-K6A») (SEQ ID NO: 146–149 соответственно в порядке появления). Точечные мутации, введенные в последовательности MARCKS, выделены жирным шрифтом. **На ФИГ. 20В** показаны результаты вестерн-блоттинга анти-FLAG очищенных экзосом из клеток, стабильно экспрессирующих гибридные белки, содержащие аминокислотные последовательности по ФИГ. 20А и FLAG.

[0057] На ФИГ. 21 показаны три разные консенсусные последовательности, полученные из функциональных исследований MARCKS, MARCKSL1 и BASP1, и потребности в аминокислотах каждой из последовательностей для загрузки нагрузки в просвет экзосом (SEQ ID NO: 118).

[0058] На ФИГ. 22А показан общий белок (вверху) и вестерн-блоттинг анти-Cas9 (внизу) нативных экзосом или экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих Cas9, конденсированный с аминокислотами 1–10 или 1–30 BASP1, а также уменьшающиеся количества рекомбинантного Cas9. **На ФИГ. 22В** (вверху) показана стандартная кривая, полученная на основании денситометрии Cas9 результатов вестерн-блоттинга по ФИГ. 22А. **На ФИГ. 22В** (внизу) далее представлены количества Cas9, загруженного на каждую очищенную экзосому в виде гибридных белков, конъюгированных с аминокислотными 1–30 или аминокислотными фрагментами 1-10 BASP1, оцененные на основе стандартной кривой.

[0059] На ФИГ. 23А показаны изображения белкового геля экзосом, очищенных из клеток, стабильно трансфицированных конструкцией, экспрессирующей конденсированный с N-концом BASP1 (аминокислоты 1–10) овальбумин («BASP1 (1–10)-OVA») или клеток, стабильно трансфицированных двумя конструкциями, одной экспрессирующей конденсированный с N-концом BASP1 (аминокислоты 1–10) овальбумин, и другой экспрессирующей CD40L, конденсированный с трансмембранным белком PTGFRN («BASP1 (1-10) -OVA; 3XCD40L-PTGFRN»). На ФИГ. 23А дополнительно показано изображение загрузки белкового геля с уменьшением количества рекомбинантного OVA. **На ФИГ. 23В** показаны результаты вестерн-блоттинга антиовальбумина для образцов по ФИГ. 23 А.

[0060] На ФИГ. 24А показана последовательность нанотела верблюда, направленного против GFP, конденсированного с аминокислотами 1–10 BASP1 и меткой FLAG (SEQ ID NO: 150). **На ФИГ. 24В** показаны результаты вестерн-блоттинга анти-FLAG и белкового геля очищенных экзосом из клеток, стабильно экспрессирующих гибридный белок по ФИГ. 24А («BASP1(1-10)-нанотело») или белок, лишенный последовательности BASP1 («нанотело»).

[0061] На ФИГ. 25 показана схема системы загрузки мРНК экзосомы, включающей (i) BASP1 (1–30), конденсированный с FLAG, и мономерные или димерные варианты MCP (1XMCP (V29I) («815»; SEQ ID NO: 111), 1XMCP (V29I/N55K) («817»; SEQ ID NO: 112), 2XMCP(V29I) («819»; SEQ ID NO: 113) или 2XMCP(V29I/N55K)) («821»; SEQ ID NO: 114) и (ii) мРНК люциферазы, содержащей 3 петли «шпильки» MS2 («мРНК люциферазы-MS2» или «811»; SEQ ID NO: 115).

[0062] На ФИГ. 26А показан белковый гель экзосом, содержащих конструкции загрузки мРНК, описанные на ФИГ. 25, мРНК люциферазы (811) в сочетании с различными гибридными белками BASP1 (815, 817 или 819). **На ФИГ. 26В** показан вестерн-блот анти-

FLAG образцов по ФИГ. 26А.

[0063] На ФИГ. 27А показаны результаты количественной ОТ-ПЦР для количества мРНК люциферазы в клетках (вверху) или экзосомах (внизу), содержащих загружаемые конструкции мРНК, показанные на ФИГ. 25. **На ФИГ. 27В** показана таблица количественного определения количества мРНК люциферазы в очищенных экзосомах из образцов на ФИГ. 27А, включая кратное обогащение на основе стохастической нагрузки мРНК люциферазы.

[0064] На ФИГ. 28 показаны схематические диаграммы тримеров CD40L, конденсированных с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 для обеспечения возможности отображения на внешней поверхности трансмембранных белков, закрепленных в просвете экзосомы.

[0065] На ФИГ. 29А показаны результаты активации мышиных В-клеток в культурах, инкубированных с экзосомами поверхностной экспрессии CD40L, конденсированными с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1. **На ФИГ. 29В** показаны результаты активации В-клеток человека в культурах, инкубированных с экзосомами поверхностной экспрессии CD40L, конденсированными с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1. **На ФИГ. 29С** показана диаграмма относительной активности различных экзосом с отображением на поверхности CD40L при конденсировании с N-концевыми последовательностями MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или полноразмерной PTGFRN.

[0066] На ФИГ. 30 представлено количество совпадений спектра пептидов (PSM) люминальных белков (MARCKS, MARCKSL1 или BASP1) и обычных экзосомных белков (CD81 и CD9) у экзосом, очищенных от различных клеточных линий различного происхождения (НЕК293SF, почка; HT1080, соединительная ткань; K562, костный мозг; MDA-MB-231, грудь; Raji, лимфобласт; мезенхимальная стволовая клетка (MSC), костный мозг).

[0067] На ФИГ. 31 показан белковый гель (слева) и вестерн-блот анти-FLAG (справа) только из экзосом, полученных из клеток яичника китайского хомячка (CHO), или из клеток со сверхэкспрессией N-концевых фрагментов BASP1 или BASP1 (1–30 или 1–8), конденсированных с FLAG-GFP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0068] 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.

[0069] 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, вырабатываемые живыми клетками (например, прямым отпочкованием плазматической мембраны или конденсированием поздней эндосомы с плазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов и/или культивируемых клеток.

[0070] 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 конденсированием поздней эндосомы с плазматической мембраной. Экзосома представляет собой вид внеклеточного пузырька. 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.

[0071] 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 выработана указанной клеткой-продуcentом без указанной манипуляции. Подходящие манипуляции с указанной клеткой-продуcentом включают, но не ограничиваются ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. Выработка нановезикул в некоторых случаях может привести к разрушению указанной клетки-продуcentа. Предпочтительно, популяции нановезикул по существу не содержат везикул, которые получены из клеток-продуcentов путем прямого отщепления от плазматической мембраны или конденсирования 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-продуcentа в соответствии с указанными манипуляциями, она может быть выделена из клетки-продуcentа на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0072] Используемый в данном документе термин **«сконструированная с просветом экзосома»** относится к экзосоме с внутренним просветом с полостью с модифицированным составом. Например, просвет 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 модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, композиция может быть изменена с помощью генной инженерии или получена из клетки, ранее модифицированной генной инженерией.

[0073] 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.

[0074] 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 MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 сохраняет способность специфически нацеливаться на просвет экзосом. 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 конденсирования фрагментов с аутофлуоресцентными белками, например, такими как GFP. В конкретном варианте осуществления фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% способностей встречающихся в природе MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 для специфического нацеливания на экзосомы. В конкретном варианте осуществления способность варианта MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагмента MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 специфически нацеливаться на просвет экзосом составляет по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% способности MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 соответственно. Эта способность может быть оценена, например, с помощью флуоресцентно меченных вариантов, при проведении анализов, описанных в экспериментальном разделе.

[0075] 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% идентичность MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагменту MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов MARCKS имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с MARCKS в соответствии с SEQ ID NO: 1 или ее функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов MARCKSL1 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с MARCKSL1 в соответствии с SEQ ID NO: 2 или ее функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов BASP1 имеют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с BASP1 в соответствии с SEQ ID NO: 3 или ее функциональным фрагментом. В каждом из вышеупомянутых случаев предпочтительно, чтобы вариант или вариант фрагмента сохранял способность специфически нацеливаться в просвет экзосом.

[0076] 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 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).

[0077] Упоминание любого белка, представленного в настоящем документе, охватывает функциональный вариант белка. Термин «**функциональный вариант**» белка относится к варианту белка, который сохраняет способность специфически нацеливаться в просвет экзосомы. В конкретном варианте осуществления способность функционального варианта MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагмента MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 специфически нацеливаться на просвет экзосом составляет по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% способности MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 соответственно.

[0078] 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).

[0079] Используемый в данном документе термин «**целевой белок**» или «**целевой пептид**» относится к белку или пептиду, который может быть нацелен в просвет экзосомы. Целевой белок или пептид может быть немутантным белком, который естественным образом нацелен в просвет экзосомы, или фрагментом или модификацией немутантного белка. Целевой белок может представлять собой гибридный белок, содержащий FLAG-метку, терапевтический пептид, нацеливающий фрагмент или другой пептид, присоединенный к немутантному белку или модификации или фрагменту немутантного белка. Целевой белок может содержать модификацию, такую как миристоилирование, пренилирование или пальмитоилирование, или растворимый белок, присоединенный к внутреннему слою мембраны с помощью линкера.

[0080] В данном описании термин «**загружаемый белок**» или «**загружаемый пептид**» относится к любому белку или пептиду, или его фрагменту или модификации, которые могут быть загружены в экзосому или сконструированную экзосому. Загружаемые белки

или пептиды могут включать терапевтические пептиды или белки, которые действуют на мишень (например, клетку-мишень), которая контактирует с экзосомой. Загружаемые белки могут представлять собой гибридный белок, содержащий нацеливающий белок или пептид или его фрагмент или модификацию, как описано выше, таким образом, что загружаемый гибридный белок может быть нацелен на просвет экзосомы.

[0081] 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.

[0082] 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 экзосомная 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 экзосомная композиция не содержит обнаруживаемых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только экзосомы.

[0083] 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.

[0084] 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 обнаруживаемый 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, дцДНК, днкРНК и миРНК), аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие обнаруживаемый фрагмент или токсин, которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы, вирусы и вирусные частицы (*например*, аденоассоциированные вирусы и вирусные частицы, ретровирусы, аденовирусы и т. д.) и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарства и токсины, включая низкомолекулярные агонисты STING, включая циклические динуклеотиды, такие как ML-RR S2 и 3'-3'-сAIMPdFSH).

[0085] 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).

[0086] Термины «**индивидуум**», «**субъект**», «**хозяин**» и «**пациент**» используются в данном

документе 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.

[0087] 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.

[0088] Используемый в данном документе термин «**макромолекула**» означает нуклеиновые кислоты, экзогенные белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

[0089] 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, лактадерин LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним. Во избежание сомнений, транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант не являются обычными экзосомными белкам.

Другие толковательные соглашения

[0090] 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.

[0091] Если не указано иное, ссылка на соединение, которое имеет один или несколько стереоцентров, подразумевает ссылку на каждый стереоизомер и все его комбинации стереоизомеров.

Экзосомные белки

[0092] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к

идентификации, применению и модификации экзосомных белков, которые в больших количествах находятся в просветах экзосом. Такие экзосомные белки могут быть идентифицированы путем анализа высокоочищенных экзосом с помощью масс-спектрометрии или других методов, известных в данной области.

[0093] Экзосомные белки включают различные белки просветов или мембранные белки, такие как трансмембранные белки, цельные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах экзосом. Конкретно, белки включают, но не ограничиваются ими, (1) связанный с миристиновой кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), (2) подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы C (MARCKSL1) и (3) кислоторастворимый белок мозга 1 (BASP1)

[0094] Один или несколько экзосомных белков, идентифицированных в данном документе, могут быть селективно использованы в зависимости от клетки-продуцента, условий производства, способов очистки или предполагаемого применения экзосом. Экзосомные белки, в большом количестве находящиеся в просвете 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 и выделения терапевтических экзосом.

Сконструированные с просветом экзосомы

[0095] Другой аспект настоящего изобретения относится к получению и использованию сконструированных с просветом экзосом. Сконструированные с просветом экзосомы имеют в своем составе модифицированное внутреннее пространство. Например, композиции просвета могут быть изменены путем изменения содержания белка, липидов или гликанов просвета.

[0096] В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные с просветом экзосомы генерируются химическими и/или физическими методами, такими как индуцированное PEG конденсирование и/или ультразвуковое конденсирование.

[0097] В других вариантах осуществления сконструированные с просветом экзосомы создаются с помощью способов геной инженерии. Экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать модифицированные композиции просвета. В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные с просветом экзосомы имеют экзосомный

белок с более высокой или более низкой плотностью или включают модификацию или фрагмент экзосомного белка.

[0098] Например, сконструированные с просветом экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей белок экзосомы или модификацию или фрагмент белка экзосомы. Экзосомы, включая белки, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать модифицированные композиции белков просвета.

[0099] Различные модификации или фрагменты экзосомного белка могут быть использованы для вариантов осуществления настоящего изобретения. Например, можно использовать белки, модифицированные для более эффективного нацеливания на просветы экзосом. Также можно использовать белки, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на просветы экзосом.

[0100] Также могут быть использованы гибридные белки, обладающие терапевтической активностью. Например, гибридный белок может содержать MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их модификацию, в частности их фрагмент или вариант, и терапевтический пептид или загружаемый белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит фрагмент аминоконца BASP1.

[0101] 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, антиген (*например*, опухолевый антиген или антиген инфекционного агента, такого как бактерия, вирус, грибок или простейшие), рецептор, антимикробный пептид, фактор транскрипции или его фрагмент или модификацию. Гибридные белки могут быть расположены в просвете экзосом и обеспечивать терапевтическую активность для экзосомы.

[0102] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид является компонентом комплекса редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления указанный комплекс редактирования генома представляет собой эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TAL-эффекторная нуклеаза или TALEN); нуклеаза цинкового пальца (ZFN); рекомбиназа; комплекс CRISPR/Cas9, комплекс CRISPR/Cpf1, комплекс CRISPR/C2c1, C2c2 или C2c3, комплекс CRISPR/CasY или CasX или любой другой подходящий комплекс CRISPR, известный в данной области, или любой другой

подходящий комплекс редактирования генома, известный в данной области, или любую их комбинацию.

[0103] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой трансмембранный пептид. Описанные в данном документе трансмембранные пептиды могут быть экспрессированы в виде гибридных белков с любой из последовательностей, описанных в данном документе, или любыми их фрагментами или вариантами. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок имеет первый конец, конденсированный с люминальной последовательностью в просвете экзосомы, и второй конец, экспрессируемый на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок включает транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант.

[0104] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой белок, связывающий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления связывающий нуклеиновую кислоту белок представляет 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. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько РНК представляют собой микроРНК, миРНК, направляющую РНК, линкРНК, мРНК, антисмысловую РНК, дцРНК или их комбинации.

[0105] 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.

[0106] Гибридные белки могут быть нацелены в просвет экзосом и обеспечивать терапевтическую активность для экзосомы.

[0107] В некоторых вариантах осуществления используются гибридные белки, имеющие нацеливающий фрагмент. Например, гибридные белки могут содержать MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию, 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(ab1)₂, 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.

[0108] В некоторых вариантах осуществления используются гибридные белки, содержащие вирусные белки. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит белок вирусного капсида или оболочки. В некоторых вариантах осуществления гибридные белки позволяют собирать интактные вирусы, которые удерживаются в просвете экзосомы.

[0109] В некоторых вариантах осуществления гибридные белки, содержащие MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4–109 или их модификацию, в частности их фрагмент или вариант, приводят к увеличению количества гибридного белка в экзосомах по сравнению с экспрессией гибридного белка, в котором отсутствуют MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4–109 или их модификацию, в частности их фрагмент или вариант, или по сравнению с гибридными белками, которые содержат обычные экзосомные белки. В некоторых вариантах осуществления гибридные белки, содержащие MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4–109 их фрагмент или модификацию включают пептид с последовательностью MGXKLSKKK, где X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 117); или пептид с последовательностью (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять

не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления обычный экзосомный белок выбран из списка, состоящего из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента. В некоторых вариантах обогащение гибридного белка, включающего MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4–109 или их фрагмент или модификацию в экзосомах в > 2 раза, в > 4 раза, в > 8 раз, в > 16 раз, в > 25 раз, в > 50 раз, в > 100 раз, в > 200 раз, в > 500 раз, в > 750 раз, в > 1000 раз, в > 2000 раз, в > 5000 раз, в > 7500 раз, в > 10 000 раз выше, чем у гибридного белка без MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любой из SEQ ID NO: 4–109 или их фрагмента или модификации, или по сравнению с гибридными белками, которые содержат обычные экзосомные белки. В некоторых вариантах любая из белковых последовательностей SEQ ID NO: 1–109 пригодная для загрузки экзосом гибридным белком.

[0110] В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированная с просветом экзосома содержит гибридный белок, содержащий экзогенную последовательность, и впервые идентифицированный в данном документе белок просвета 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 в просвете экзосом с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков в просветах 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 в просвете экзосом с плотностью, которая в 2–4 раза, в 4–8 раз, в 8–16 раз, в 16–32 раз, в 32–64 раз, в 64–100 раз, в 100–200 раз, в 200–400 раз, в 400–800 раз, в 800–1000 раз превышает плотность гибридных белков в просветах других экзосом, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка.

[0111] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD9. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS его вариант, фрагмент, вариант

фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием PDGFR. В некоторых вариантах осуществления гибридный, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадерина. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием варианта обычного экзосомного белка.

[0112] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1,

его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD9. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1 его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1 его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1 его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадерина. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1 его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка. В некоторых вариантах осуществления гибридный, содержащий MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию,

присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка. В некоторых вариантах осуществления гибридный, содержащий BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного экзосомного белка.

[0114] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD9. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием PDGFR. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадерина. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO:

1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием подходящего белка. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий любой из SEQ ID NO: 1–109, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификацию, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в экзосомах, аналогично модифицированных с использованием варианта обычного экзосомного белка.

[0115] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе сконструированные с просветом экзосомы демонстрируют превосходные характеристики по сравнению со сконструированными с просветом экзосомами, известными в данной области. Например, сконструированные с просветом экзосомы, полученные с использованием впервые идентифицированных экзосомных белков, представленных в данном документе, содержат в просвете большее количество модифицированных белков, чем экзосомы в предшествующем уровне техники, *например*, те, которые получены с использованием обычных экзосомных белков. Кроме того, сконструированные с просветом экзосомы по настоящему изобретению могут иметь более высокую, более специфическую или более контролируемую биологическую активность по сравнению со сконструированными с просветом экзосомами, известными в данной области. Например, сконструированная с просветом экзосома, содержащая терапевтически или биологически релевантную экзогенную последовательность, конденсированную с экзосомным белком или его фрагментом, описанным в настоящем документе (*например*, BASP1 или его фрагмент), может иметь больше желаемых сконструированных характеристик, чем конденсирования 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, лактадерин и его фрагменты и пептиды, которые имеют аффинность к любому из этих белков или их фрагментов. Во избежание сомнений, транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент или вариант не являются обычными экзосомными белками. Ранее избыточная экспрессия экзогенных белков основывалась на стохастическом

или случайном расположении экзогенных белков в экзосоме для выработки сконструированных с просветом экзосом. Это привело к низкой и непредсказуемой плотности экзогенных белков в экзосомах. Таким образом, белки экзосом и их фрагменты, описанные в данном документе, обеспечивают важные достижения в новых экзосомных композициях и способах их получения.

[0116] Гибридные белки, представленные в настоящем документе, могут включать MARCKS, MARCKSL1, BASP1 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.

[0117] В некоторых вариантах осуществления гибридные белки, представленные в настоящем документе, включают MARCKS, MARCKSL1, BASP1 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.

[0118] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции и способы получения описанных в данном документе сконструированных с просветом внеклеточных везикул, содержат нановезикулы.

Клетка-продуцент для производства сконструированных с просветом экзосом

[0119] 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 целей настоящего изобретения можно использовать различные клетки-продуценты, например, клетки НЕК293. Дополнительные типы клеток, которые можно использовать для получения описанных в данном документе сконструированных с просветом экзосом, включают, без ограничения, мезенхимальные стволовые клетки, Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки, макрофаги и линии раковых клеток.

[0120] Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения одной или нескольких экзогенных последовательностей для получения сконструированных с просветом экзосом. Генетически модифицированная клетка-продуцент может содержать экзогенную последовательность путем временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть трансформирована 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 сконструированных с просветом экзосом.

[0121] 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 экзосомный белок. 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.

[0122] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую экзосомный белок или модификацию или фрагмент экзосомного белка. Может быть введена дополнительная копия последовательности, кодирующей экзосомный белок, для получения сконструированной с просветом экзосомы, имеющей более высокую плотность экзосомного белка. Экзогенная последовательность, кодирующая модификацию или фрагмент экзосомного белка, может быть введена для получения сконструированной с просветом экзосомы, содержащей модификацию или фрагмент экзосомного белка. Экзогенная последовательность, кодирующая аффинную метку, может быть введена для получения сконструированной с просветом экзосомы, содержащей гибридный белок, содержащий аффинную метку, присоединенную к экзосомному белку.

[0123] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность на указанной сконструированной с просветом экзосоме, чем на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления указанный экзосомный белок присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий экзосомный белок присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на немодифицированном экзосомном белке на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления фрагмент или вариант экзосомного белка присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на немодифицированном экзосомном белке на указанной нативной экзосоме.

[0124] В конкретных вариантах осуществления MARCKS, фрагмент или вариант MARCKS или его модификация присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на немодифицированном MARCKS на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления MARCKSL1, фрагмент или вариант MARCKSL1 или его модификация присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на немодифицированном MARCKSL1 на указанной нативной экзосоме. В некоторых вариантах осуществления BASP1, фрагмент или вариант BASP1 или его модификация присутствует на указанной сконструированной с просветом 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 сконструированной с просветом экзосоме, чем на немодифицированном BASP1 на указанной нативной экзосоме.

[0125] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент дополнительно модифицируется для включения дополнительной экзогенной последовательности. Например, дополнительная экзогенная последовательность может быть включена для модуляции экспрессии эндогенного гена или для получения экзосомы, включающей определенный полипептид в качестве полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует белок экзосомы или модификация или фрагмент экзосомного белка, а другая кодирует полезную нагрузку.

[0126] Более конкретно, сконструированные с просветом экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей один или несколько белков просвета экзосом, включая, но не ограничиваясь ими, (1) связанный с миристиновой

кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), (2) подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы C (MARCKSL1) и (3) кислоторастворимый белок мозга 1 (BASP1). Любой из одного или нескольких белков просвета экзосомы, описанных в данном документе, может быть экспрессирован из плазмиды, экзогенной последовательности, встроенной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая мессенджер-РНК (мРНК).

[0127] В некоторых вариантах осуществления один или несколько белков просвета экзосом экспрессируются в клетке, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей ее полноразмерную эндогенную форму. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKS последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKSL1 последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок BASP1 последовательности SEQ ID NO: 3.

[0128] Сконструированные с просветом экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент одного или нескольких белков просвета экзосом, включая, но не ограничиваясь ими, (1) связанный с миристиновой кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), (2) подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы 1 (MARCKSL1) и (3) кислоторастворимый белок мозга 1 (BASP1). В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент белка просвета экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот с N-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент белка просвета экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот с C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент белка просвета экзосомы, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот с N-конца и с C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент белка просвета экзосомы, в котором отсутствует один или несколько функциональных или структурных доменов нативного белка. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид с последовательностью MGXKLSKKK, где X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ

ID NO: 117). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

[0129] В некоторых вариантах осуществления, сконструированные с просветом экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей экзосомный белок или его фрагмент или модификацию, конденсированный с одним или более гетерологичных белков. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков конденсированы с N-концом экзосомного белка или его модификации, в частности его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков конденсированы с C-концом экзосомного белка или его модификации, в частности его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков конденсированы с N-концом и C-концом экзосомного белка или его модификации, в частности его фрагмента или варианта. 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.

[0130] В некоторых вариантах осуществления сконструированные с просветом экзосомы получают из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей полипептид последовательности идентичной или аналогичной полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, включая, но не ограничиваясь ими, (1) связанный с миристиновой кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), (2)

подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы 1 (MARCKSL1) и (3) кислоторастворимый белок мозга 1 (BASP1). В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 50% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 50% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 60% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 60% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 70% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 70% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 80% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 80% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 90% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 90% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 95% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 95% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 99% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 99% идентичен SEQ ID NO: 1–3. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 99,9% идентичен полноразмерному нативному белку просвета экзосомы или его фрагменту, *например*, на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1–3.

[0131] В некоторых вариантах осуществления сконструированные с просветом экзосомы вырабатываются из клетки, содержащей полипептид с последовательностью, идентичной или аналогичной фрагменту кислоторастворимого белка мозга 1 (BASP1). В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 50% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 50% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 60% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 60% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 70% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 70% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 80% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 80% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 90% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 90% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 95% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 95% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах

осуществления указанный полипептид на 99% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 99% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 99,9% идентичен BASP1 или его фрагменту, *например*, на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4–109. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на 100% идентичен фрагменту BASP1, *например*, на 100% идентичен SEQ ID NO: 4–109.

Характеристика экзосом

[0132] 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.

Измерение содержания экзосом

[0133] 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.

[0134] Композиции экзосом могут оцениваться способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, транскриптомику, секвенирование, протеомику, масс-спектрометрию или ВЭЖХ.

[0135] 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 олигонуклеотидов, гибридизации целевых олигонуклеотидов 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.

[0136] 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 условий жесткости при гибридизации. Также тРНК и другие РНК (например, рРНК, мРНК) обоих видов могут быть напечатаны на микрочипе, обеспечивая относительно стабильный внутренний 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.

[0137] 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 олигомер кДНК, соответствующий РНК-мишени, получают путем обратной транскрипции РНК-мишени с меченым праймером. 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. TNT 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 меченную биотином кДНК, полученную из меченного 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.

[0138] 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.

Измерение размера экзосом

[0139] 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.

[0140] 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.

[0141] 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, имеют наибольший размер, измеренный с помощью NTA, приблизительно 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).

[0142] 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).

[0143] 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).

[0144] Размер отдельной экзосомы может быть определен на основе нанопоточной цитометрии при проведении анализа частица за частицей. В некоторых вариантах осуществления нано-поточный цитометр представляет собой Flow NanoAnalyzer (NanoFCM, Inc.; Xiamen, Китай). В некоторых вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер по одному из измерений,

измеренный с помощью нанопоточной цитометрии, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых вариантах осуществления экзосомы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер, измеренный с помощью нанопоточной цитометрии, приблизительно 40–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 20–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer). В некоторых 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 нанопоточной цитометрии, около 40–1000 нм (*например*, с использованием Flow Nano Analyzer).

Измерение плотности заряда экзосом

[0145] 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.

Измерение плотности экзосомных белков

[0146] 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-поточной цитометрии, ИФА, альфа-ИФА и/или денситометрии путем измерения полос на белковом геле.

Примеры

[0147] 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 того, чтобы сохранить точность 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.*

[0148] 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*, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); AL. 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).

Пример 1. Идентификация новых экзосомных белков

Сбор экзосом

[0149] Экзосомы собирали из супернатанта суспензионных культур клеток HEK293 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™ ультрацентрифугированием.

[0150] Для градиента Optiprep™ готовили 4-уровневый стерильный градиент с 4 мл 45% Optiprep™, 3 мл 30% Optiprep™, 2 мл 22,5% Optiprep™, 2 мл 17,5% Optiprep™ и 1 мл ФСБ в 12 мл пробирке Ultra-Clear (344059) для ротора SW 41 Ti. Фракцию экзосом добавляли к градиенту Optiprep™ и ультрацентрифугировали при $200\,000 \times g$ 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.

[0151] 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.

Подготовка проб для анализа ЖХ-МС/МС

[0152] Для определения белков, специфичных для экзосом, верхнюю фракцию и нижнюю фракцию градиента Optiprep™ анализировали методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Перед анализом концентрацию общего белка в каждом из двух образцов определяли анализом на бикарбонную 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 ЭДТК, 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.

[0153] Осаждение белка проводили добавлением 1250 мкл этанола при -20 °C. Для

повышения эффективности образцы интенсивно встряхивали и затем обрабатывали ультразвуком на водяной бане в течение 5 минут. Осажденный материал гранулировали центрифугированием в течение 5 минут при 15 000 g при комнатной температуре. 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 ЭДТК, 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.

[0154] После инкубации каждый образец разбавляли, используя 30,0 мкл 50 mM Трис, pH 8,5, и начинали протеолитическое расщепление, добавляя 2,0 мкг трипсина. Все образцы смешивали и затем инкубировали в течение ночи при 37 °C. 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 75,0 мкл воды/ацетонитрила 95:5 с 0,1% муравьиной кислотой и переносили во флакон ВЭЖХ для анализа.

Анализ ЖХ-МС/МС

[0155] 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, 95% воды, 5% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты) при скорости потока 2500 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 LC C18 (75 мкм x 25 см, размер частиц 2 мкм, размер пор 100 Å, Thermo Fisher Scientific). Ступенчатый градиент, используемый для элюирования, начинался при 5% MPB, где он выдерживался в течение 15 минут во время загрузки. Процент MPB затем увеличился с 5 до 17% за 30 минут, снова с 17 до 25% за 45 минут и, наконец, с 25 до 40% за 5 минут. Наиболее гидрофобные виды были удалены путем увеличения MPB до 90% в течение 5 минут и последующего выдерживания в течение 9 минут. Общее время выполнения способа составляло 130 минут и оставалось достаточное количество времени для повторного уравнивания колонки. Промывочные циклы выполнялись между аналитическими инъекциями для минимизации

переноса.

[0156] 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 MS/MS 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.

Обработка данных

[0157] 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 либо полной справочной базы данных Uniprot Homo sapiens (таксономия 9606, 127 783 записей), либо Swiss-Prot Homo sapiens (таксономия 9606 версия 2017-05-10: 42 153 записи), а также пользовательской базы данных Uniprot, содержащей белки Ela (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).

[0158] Tidd Decoy PSM Validator максимальная дельта Cn, 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%.

[0159] 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 **ФИГ. 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 был идентифицирован ряд белков, в которых отсутствовали трансмембранные домены и которые показывали значительное количество фракций экзосом, включая (1) связанный с миристиновой кислотой богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS), (2) подобный связанному с миристиновой кислотой богатому аланином субстрату протеинкиназы 1 (MARCKSL1) и (3) кислоторастворимый белок мозга 1 (BASP1). Как показано на картах покрытия триптическим пептидом на **ФИГ. 3–5**, масс-спектрометрическое исследование привело к широкому охвату MARCKS (**ФИГ. 3**), MARCKSL1 (**ФИГ. 4**) и BASP1 (**ФИГ. 5**). Поскольку ни один из этих белков не имеет трансмембранных доменов, предполагается, что они находятся в значительном количестве в виде растворимых белков в просвете экзосом. Вместе эти результаты демонстрируют, что существует множество люминальных белков, обогащенных очищенными экзосомными популяциями, которые могут быть полезны в качестве каркасов нагрузки при создании сконструированных экзосом.

Пример 2. Проверка экспрессии белка просвета

[0160] Чтобы подтвердить, что специфичные для экзосом белки, идентифицированные в масс-спектрометрических исследованиях, в большом количестве экспрессировались в просветах экзосом, проводили вестерн-блоттинг в общем лизате клеток и очищенных популяциях экзосом из клеток НЕК293. Как показано на **ФИГ. 6А**, равные количества общего белка из клеточного лизата (слева) и очищенных экзосом (справа) были загружены в денатурирующий полиакриламидный гель. Вестерн-блоттинг MARCKS (**ФИГ. 6В**), MARCKSL1 (**ФИГ. 6С**) и BASP1 (**ФИГ. 6D**) продемонстрировал, что полосы, представляющие новые люминальные белки, легко обнаруживаются в экзосомах, но не в клеточных лизатах, демонстрируя, что эти белки в значительном количестве находятся в экзосомах и могут визуально обнаруживаться в общем лизате экзосом. Демонстрация того, что эти белки просвета в большом количестве экспрессируются и находятся в экзосомах, дает возможность создавать экзосомы с модифицированным просветом, содержащие гетерологичные белки, конденсированные с любым из этих новых белков на высоких уровнях.

Пример 3. Проверка люминальной нагрузки с использованием новых белков в качестве каркаса

[0161] Для подтверждения полезности MARCKS, MARCKSL1 и/или BASP1 в качестве

каркасов люминальной нагрузки, каждый из белков был конденсирован с N-концом GFP. Кроме того, первые 30 аминокислот каждого из этих белков также были конденсированы с GFP для определения того, может ли более короткий фрагмент белка управлять загрузкой сконструированных экзосом. В качестве эталонных стандартов использовали конденсированные с GFP экзосомы, сконструированные с возможностью содержания CD81 (хорошо известный экзосомный маркер) или PDGFR (трансмембранный белок с умеренной эффективностью экзосомной нагрузки).

[0162] Сконструированные клетки HEK293SF, содержащие каждую из конструкций экспрессии, были стабильно выбраны и выращены до высокой плотности в 200 мл культур. Супернатанты собирали и очищали ультрацентрифугированием с градиентом плотности Optiprep™, как описано в примере 1. Полученные GFP-содержащие экзосомы измеряли в 96-луночном формате на считывателе планшетов Synergy H1 (BioTek®). Как показано на ФИГ. 7, первых 30 аминокислот MARCKS, конденсированных с GFP («MARCKS (aa 1–30)»), было недостаточно для загрузки экзосом выше уровня либо CD81-GFP («CD81»), либо PDGFR-GFP («pDisplay»). Аналогично, первых 30 аминокислот MARCKSL1, конденсированных с GFP («MARCKSL1 (aa 1–30)»), было недостаточно для увеличения загрузки в экзосому по сравнению с CD81-GFP («CD81»), хотя гибрид полноразмерного MARCKSL1 с GFP («MARCKSL1») привел к значительно более высокому сигналу, чем CD81-GFP (**ФИГ. 8**). В поразительном контрасте с предыдущими данными, гибрид полноразмерного BASP1 с GFP («BASP1») и первые 30 аминокислот BASP1, конденсированные с GFP («BASP1 (aa1–30)»), привели к гораздо большей загрузке GFP по сравнению с CD81-GFP («CD81») или PDGFR-GFP («pDisplay») (**ФИГ. 9**). Такие результаты предполагают, что BASP1 (полноразмерный или N-конец) и полноразмерный MARCKSL1 могут быть подходящими каркасами для люминальной экспрессии загружаемых белков экзосом.

Пример 4. Идентификация минимальной белковой последовательности, достаточной для загрузки полезной нагрузки в просвет экзосомы

[0163] Результаты, приведенные в примере 3, показывают, что N-концевой последовательности BASP1 достаточно для загрузки загружаемого белка в просвет экзосомы. Для определения минимальной пептидной последовательности с такой активностью были проведены эксперименты по загрузке сконструированного GFP путем генерирования множества усечений BASP1, конденсированных с N-концом GFP, и измерения степени их загрузки в экзосомы. На ФИГ. 10 показана серия гибридных белков, использованных в данном эксперименте, с указанием фрагментов и модификаций

последовательности BASP1, метки FLAG для обнаружения для вестерн-блоттинга, первых нескольких аминокислот GFP и глицин/сериновых линкеров между каждой из областей.

[0164] Как сообщалось, BASP1 может быть миристоилированным, что может играть роль в его размещении в просвете экзосомы. Для проверки роли миристоилирования в загрузке BASP1, в экспериментах с загрузкой GFP также были протестированы точечные мутации глицина и аланина в предполагаемых сайтах миристоилизации. Одиночные мутации в положении 2 (последовательность pCB 692), положении 3 (pCB 693) или двойная мутация (pCB 694) были включены в BASP1 1–30 (pCB 540) и протестированы с гибридными белками, содержащими различные усечения BASP1 (pCB 683–691).

[0165] Клетки HEK293SF трансфицировали и отбирали в присутствии пуромицина с получением стабильной экспрессии плазмиды, кодирующей каждую из последовательностей на ФИГ. 10 и экзосомы были очищены, как описано в примере 1. Очищенные экзосомы анализировали на флуоресценцию GFP с помощью нанопоточной цитометрии (Flow NanoAnalyzer, NanoFCM, Inc.) для определения степени загрузки GFP. Как показано на **ФИГ. 11**, экзосомы из нетрансфицированных клеток (*m. e.*, без GFP) показали очень низкий сигнал (WT экз.). Экзосомы, содержащие BASP1 G2A-GFP (pCB 692) или BASP1 G2A/G3A-GFP (pCB 694), показали аналогично низкие уровни сигнала GFP, тогда как BASP1 G3A-GFP (pCB 693) показали гораздо более высокие уровни, что указывает на то, что глицин в положении два BASP1 необходим для загрузки фрагментов BASP1 в экзосомы, возможно, из-за миристоилирования. Усечения BASP1 pCB683-689 также показали высокие уровни сигнала GFP, в то время как более короткие фрагменты pCB690-691 были аналогичны WT экз. Эти результаты демонстрируют, что pCB689, фрагмент из девяти аминокислот, достаточен для доставки загружаемого белка в просвет экзосом на очень высоком уровне.

[0166] Для подтверждения результатов, показанных на **ФИГ. 11**, экзосомы GFP -фрагмента BASP1 анализировали путем блоттинга белка. Равные количества белков были загружены на SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad, Inc.) для измерения общего количества экзосомного белка (**ФИГ. 12**). Фрагменты BASP1-GFP были обнаружены в нескольких полосках белкового геля при ~ 30 кДа (пунктирная стрелка). Данный метод визуализации основан на связывании флуоресцентной молекулы в геле с триптофановыми остатками белка, однако в каждом из гибридных белков BASP1-GFP имеется только один триптофановый остаток, что, возможно, ведет к недооцениванию обилия фрагмента BASP1 на каждой полоске. Для достижения объективного измерения загрузки BASP1-GFP в экзосомы, белковый гель, содержащий образцы экзосом, окрашивали Coomassie синим

(Invitrogen SimplyBlue SafeStain) (**ФИГ. 13**). Структура полос окрашенного геля позволила четко идентифицировать гибридные белки BASP1-GFP (пунктирная стрелка) и подтвердила равные количества входного белка в каждом образце, что коррелирует с результатами, показанными на **ФИГ. 12**.

[0167] Вестерн-блоттинг с антителом к FLAG (моноклональное антитело M2, Millipore-Sigma) показал равные количества BASP1-GFP в pCB540 (аминокислоты 1–30) и pCB683-689 (**ФИГ. 14**), дополнительно показывая способность BASP1 загружать люминальную экзосомную нагрузку. Анти-FLAG сигнал для более коротких фрагментов pCB690-691 был значительно меньше или отсутствовал. BASP1 G2A-GFP (pCB 692) или BASP1 G2A/G3A-GFP (pCB 694) также не имели сигнала, в то время как BASP1 G3A-GFP (pCB 693) экспрессировался на уровнях, аналогичных pCB540. Эти результаты согласуются с данными нанопоточной цитометрии на **ФИГ. 11** и подтверждают, что pCB689 достаточно для загрузки экзосом загружаемым белком. Вестерн-блоттинг с антителом к Аликс, установленным экзосомным белком, показал одинаковый сигнал во всех образцах, что указывает на то, что сверхэкспрессия BASP1-GFP не нарушала паттерн экспрессии эндогенных экзосомных белков или иным образом не нарушала биогенез или состав экзосом (**ФИГ. 15**). Вместе эти результаты демонстрируют, что метка из девяти аминокислот (MGGKLSKKK — SEQ ID NO: 13) может экспрессироваться в виде гибрида с гетерологичными белками и управлять размещением белка в просвете экзосом. Кроме того, второе положение последовательности требуется для экзосомной загрузки, в то время как третье положение является необязательным. Таким образом, последовательности MGAKLSKKK (SEQ ID NO: 110) или, в более общем смысле, MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) также могут использоваться для загрузки любого желаемого белка в просвет экзосомы.

[0168] Для того, чтобы определить минимальную BASP1 аминокислотной последовательности между двенадцатью аминокислотами усечения, что облегченные загрузкими и шесть-аминокислотой усечения, которая не в состоянии облегчить загрузку, как показано выше, отдельные укороченные мутанты N-конец BASP1, конденсированные с FLAG-метка и GFP генерировались и стабильно экспрессировались в клетках HEK293SF (**ФИГ. 16A**). Экзосомы очищали от стабильных клеточных культур, как описано выше. Последовательности BASP1 из семи-двенадцати аминокислот были способны загружать GFP в экзосомы с высокой плотностью, в то время как первые шесть аминокислот не показывали такой способности (**ФИГ. 16B**). Эти данные показывают, что для люминальной нагрузки экзосом с N-концом BASP1 необходим по меньшей мере один остаток лизина после положения шесть.

[0169] Серин в положении 6 BASP1 высоко консервативен у разных видов и в MARCKS и MARCKSL1. Чтобы определить, нужна ли эта аминокислота для загрузки нагрузки в экзосомы, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали экспрессирующими плазмидами, кодирующими BASP1 1–30-FLAG-GFP или BASP1 1–30-FLAG-GFP, включающим точечный мутант: замену в шестом положении серина на аспарагиновую кислоту (S6D; полярно-заряженное замещение) или аланин (S6A; небольшое неполярное замещение). Кроме того, лизин в положении пять был мутирован в глутаминовую кислоту (L5Q) для проверки потенциальной роли этого положения в модулирующем миристоилировании, пальмитоилировании и других мембранных функций нескольких мембранно-ассоциированных белков (Gottlieb-Abraham et al., Mol. Biol. Cell. 2016 Dec 1;27(24):3926-3936) **(ФИГ. 17А)**. BASP1 S6D полностью отменял загрузку GFP в экзосомы, тогда как S6A не изменял нагрузку. BASP1 L5Q также не влиял на люминальную нагрузку, указывая на то, что отрицательный заряд в положении шесть нарушает нагрузку, в то время как полярная аминокислотная замена в положении пять хорошо переносится **(ФИГ. 17В)**.

[0170] Первые тридцать аминокислот BASP1 содержат N-концевую лидерную последовательность, указанную выше, с последующим богатым на лизин участком аминокислот. Чтобы понять, могут ли N-концы MARCKS и MARCKSL1 загружать экзосомы аналогично BASP1, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали полноразмерными белками MARCKS и MARCKSL1 или аминокислотами 1–30, конденсированными с FLAG-GFP. Очищенные экзосомы анализировали с помощью SDS PAGE и окрашивания Coomassie для определения степени загрузки. Полноразмерные MARCKS и MARCKSL1 были способны загружать экзосомы GFP, но аминокислоты 1–30 уступали полноразмерным белкам, что указывает на наличие дополнительных структурных или последовательных особенностей в дистальных областях белков MARCKS и MARCKSL1, необходимых для загрузки. **(ФИГ. 18)**. Анализ последовательностей MARCKS и MARCKSL1 выявил области с потенциальной гомологией последовательности к N-концу BASP1. Аминокислоты 152–173 MARCKS и 87–110 MARCKSL1 богаты лизином с вкраплениями остатков фенилаланина и серина и, по прогнозам, являются доменами сайтов фосфорилирования (PSD) или эффекторными доменами (ED) **(ФИГ. 19)**. Клетки HEK293SF стабильно трансфицировали плазмидными конструкциями, конденсирующими аминокислоты 1–3 MARCKS с доменом PSD (MG-PSD). Отдельные точечные мутации были сгенерированы в предсказанном сайте миристоилирования (MA-PSD) и положении шесть (K6S и K6A) для определения роли этих остатков в нагрузке экзосом **(ФИГ. 20А)**. Вестерн-блоттинг очищенных экзосом показал, что по сравнению с положительным контролем BASP1 1–30, ни MG-PSD, ни MA-PSD не могли эффективно загружать

экзосомы. Интересно, что мутации K6A и K6S привели к улучшению загрузки, что позволяет предположить, что положительный заряд в положении 6 предотвращает загрузку экзосомного груза и что PSD MARCKS может быть функционально комплементарно эндогенной N-концевой последовательности (**ФИГ. 20B**). Вместе эти исследования позволили идентифицировать несколько мотивов, достаточных для загрузки груза в экзосомы (**ФИГ. 21**).

[0171] Самый узкий мотив, мотив 1, допускает последовательность белка (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118), где каждая буква или группа букв в скобках представляет собой положение аминокислоты, и где дополнительно положение пять не может быть положительно заряженной аминокислотой (K/R/H), а положение шесть не может быть отрицательно заряженной аминокислотой (D/E). Субмотивы мотива 1 включают, без ограничения, белковые последовательности: (M)(G)(G)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(A)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(F)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(S)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(Q)(S/A)(K)(K), (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S)(K)(K) и (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(A)(K)(K), где положение пять не может быть положительно заряженной аминокислотой (K/R/H) и положение шесть не может быть отрицательно заряженной аминокислотой (D/E).

[0172] Мотив 2, более широкий мотив, может быть выражен как (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

[0173] Мотив 3, самый широкий мотив, может быть выражен как (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile,

Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu). Во всех случаях с мотивами 1–3 последовательность может быть укорочена на одну аминокислоту до длины, составляющей семь аминокислот (*т. е.*, состоящей из аминокислот 1–7 в порядке, представленном на мотивах 1–3). Любая из последовательностей, полученных из любого из мотивов 1, 2 или 3 (или этих мотивов, в которых отсутствует аминокислота 7), может быть использована для загрузки груза в экзосомы в той же степени, что и полноразмерная BASP1 или естественные усечения последовательностей BASP1, или в сравнимой степени. Данный глубокий анализ функции структуры аминокислотной последовательности обеспечивает новое понимание требований для направления биологически экспрессированной нагрузки в экзосомы клетками-продуцентами.

Пример 5. N-конец BASP1 достаточен для загрузки разнообразных классов белков

[0174] Результаты, представленные в примере 4, показывают, что N-конец BASP1 может быть применимым инженерным каркасом для генерации люминально загруженных экзосом непосредственно в клетках-продуцентах. Для проверки этой гипотезы были созданы стабильные клетки HEK293SF для экспрессии полноразмерного белка Cas9 с оптимизацией кодонов (в соответствии с описанным в Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol.* 2015 Feb; 33(2): 139-42), конденсированного с аминокислотами 1–30 или 1–10 BASP1. Экзосомы очищали от клеточной культуры в соответствии с описанным выше и анализировали посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с использованием антител к Cas9 (Abeam; Catalogue № ab191468, клон 7A9-3A3). Как показано на **ФИГ. 22А**, BASP1 1–30 и 1–10 были достаточными для загрузки Cas9 в экзосомы. В качестве положительного контроля для вестерн-блоттинга использовали рекомбинантный белок Cas9. Количественная денситометрия и сравнение различных количеств рекомбинантных экзосомных полос Cas9 и BASP1-Cas9 в экспериментах с вестерн-блоттингом показали, что в экзосомы загружено 4–5 молекул Cas9 на экзосому (**ФИГ. 22В**). Этот фермент Cas9, масса которого составляет ~ 160 кДа, представляет собой значительное увеличение размера груза по сравнению с экспериментами GFP, показанными выше.

[0175] В качестве дополнительной проверки разнообразия загружаемых белков, которые могут быть загружены в виде гибрида с N-концом BASP1, овальбумин стабильно экспрессировали в клетках HEK293SF в виде гибрида с аминокислотами 1–10 из BASP1

(«BASP1(1–10)-OVA»). Отдельную клеточную линию котрансфицировали той же самой плазмидой и второй плазмидой, кодирующей тримерный CD40L, конденсированный с экзосом-специфическим поверхностным гликопротеином PTGFRN («3xCD40L-PTGFRN»), с использованием второго селектируемого маркера. Экзосомы очищали от двух трансфицированных клеточных культур и анализировали посредством SDS-PAGE (**ФИГ. 23А**) и вестерн-блоттинга с антителами к овальбумину (Abeam; каталог № ab 17293, клон 6С8) (**ФИГ. 23В**). В качестве контроля в отдельном геле титровали рекомбинантный овальбумин (InvivoGen; Catalogue № vac-pova). Овальбумин надежно загружался в экзосомы в случае, когда он был конденсирован с аминокислотами 1–10 BASP1 в виде единой конструкции или в комбинации с дополнительной плазмидой для сверхэкспрессии (3xCD40L-PTGFRN). Этот результат демонстрирует, что экзосомы могут быть сконструированы комбинаторно с люминальной загрузкой и одновременной с загрузкой на поверхности (*например*, PTGFRN) из отдельного транскрипта.

[0176] Другим классом белков, которые могут быть полезны в контексте терапевтических экзосом, являются антитела и фрагменты антител. Одноцепочечные нанотела верблюда, нацеленные на GFP (как описано в Caussinus E, Kanca O, Affolter M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. Nat Struct Mol Biol. 2011 Dec 11;19(1):117-21) стабильно экспрессировались в клетках HEK293SF в виде гибридного белка с аминокислотами 1–10 BASP1 и меткой FLAG («BASP1 (1-10)-нанотело») или только меткой FLAG («нанотело») (**ФИГ. 24А**). Очищенные экзосомы анализировали посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителами к FLAG, демонстрируя произошедшее значительное обогащение нанотела равными количествами общего загруженного белка в случае, когда нанотело было конденсировано с N-концом BASP1 (**ФИГ. 24В**). Данные результаты демонстрируют, что загруженный белок различных классов может экспрессироваться и упаковываться в экзосомы клетками-продуцентами с использованием очень короткой белковой последовательности, полученной из N-конца BASP1.

Пример 6. N-конец BASP1 можно использовать для загрузки нуклеиновых кислот в просвет экзосом

[0177] Нуклеиновые кислоты и, в частности РНК (*например*, мРНК, миРНК, микроРНК) является привлекательным классом терапевтической загрузки, загружаемой в просвет терапевтических экзосом. Загрузка РНК в экзосомы может защищать РНК от деградации во внеклеточной среде, и загруженная экзосома может быть направлена на определенные клетки и/или ткани посредством дополнительных уровней конструирования экзосомной, *например*, поверхностной экспрессии нацеливающей конструкции. Чтобы понять, могут ли идентифицированные выше экзосомные белки (или фрагменты белков) использоваться для

генерации экзосом с загруженными мРНК, были созданы комбинаторные сконструированные экзосомы. Как показано на **ФИГ. 25**, аминокислоты 1–30 BASP1 экспрессировали в виде гибрида с FLAG и вариантами фагового белка MCP. MCP распознает и связывается со шпилькой мРНК, называемой MS2, которая может экспрессироваться в виде транскрипционного гибрида с мРНК и другими РНК, тем самым стимулируя физическую ассоциацию между гибридными белками MCP и интересующими гибридными РНК MS2. Мутационный анализ ранее выявил два положения в MCP, которые увеличивают аффинность к MS2; замена валина на изолейцин в положении 29 (V29I; Lim & Peabody, RNA. Nucleic Acids Res. 1994 Sep 11;22(18):3748-52) и замена аспарагина на лизин в положении 55 (N55K; Lim et al., J Biol Chem. 1994 Mar 25;269(12):9006-10). BASP1 1–30 был конденсирован с мономерными или димерными вариантами MCP, где каждый MCP представлял собой либо V29I, либо дважды мутированный V29I/N55K. Репортерную конструкцию люциферазы экспрессировали в виде гибрида с 3 шпильками MS2 из отдельной плазмиды. Было получено пять стабильных клеточных линий HEK293SF, либо отдельно для люциферазы-MS2 (№ 811), либо в комбинации с каждым из вариантов BASP1-MCP (№ 815, 817, 819 или 821) (**ФИГ. 25**). В качестве дополнительного контроля клетки HEK293SF стабильно трансфицировали меченным FLAG BASP1 1–27. Экзосомы выделяли и обрабатывали Benzonase® для удаления любых внешне-ассоциированных мРНК и очищали в соответствии со способами, описанными выше. Очищенные экзосомы анализировали посредством SDS-PAGE (**ФИГ. 26A**) и вестерн-блоттинга с антителами к FLAG (**ФИГ. 26B**), демонстрируя равные количества общего белка и сопоставимые уровни гибридов BASP1-FLAG в каждом препарате экзосомы. Важно, что гибриды BASP1-MCP экспрессируются со сравнимыми уровнями в виде гибридов FLAG BASP1 1–27 без белка MCP, демонстрируя, что добавление мономеров или димеров MCP не нарушает BASP1-опосредованную загрузку белков в экзосомах.

[0178] Были выделены клетки, стабильно экспрессирующие BASP1-MCP и люциферазу-MS2 мРНК и общее количество мРНК люциферазы было количественно измерено посредством ОТ-ПЦР (прямой праймер: 5'- TGGAGGTGCTCAAAGAGTTG-3' (SEQ ID NO: 119); обратный праймер: 5'- TTGGGCGTGCACTTGAT-3' (SEQ ID NO: 120); зонд: 5'- /56- FAM/CAGCTTTCC/ZEN/GGGCATTTGGCTTC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 121)). Нетрансфицированные клетки экспрессировали более низкие уровни люциферазы, чем все 811-экспрессирующие клетки, которые экспрессировали сопоставимые уровни люциферазы (**ФИГ. 27A, сверху**). Очищенные экзосомы из каждой стабильной клеточной линии также анализировали посредством количественной ОТ-ПЦР. Нативные экзосомы не имели обнаруживаемых уровней люциферазы MS2, в то время как клетки,

экспрессирующие только 811, имели обнаруживаемые, но очень низкие уровни люциферазы MS2. Важно, что каждый из гибридных белков BASP1-MCP содержал большее количество люциферазы-MS2 мРНК, демонстрируя важность связывания между MCP и MS2 для облегчения загрузки мРНК в экзосомы (**ФИГ. 27А, снизу**). Количественное определение относительной мРНК между группами продемонстрировало обогащение в ~ 30–60 раз для всех гибридов BASP1-MCP в отношении одного 811 (**ФИГ. 27В**). Предполагается, что конструкция BASP1-MCP 821, содержащая димерный MCP V29I/N55K, имела наибольшую аффинность к мРНК MS2 и действительно содержала наибольшее количество люциферазы-MS2 в данном эксперименте. Эти результаты демонстрируют, что фрагменты BASP1 представляют собой прочные и универсальные каркасные белки для загрузки в просвет экзосом разнообразной нагрузки, включая нуклеиновые кислоты.

Пример 7. Возможность использования BASP1, MARCKS и MARCKSL1 для создания экзосом с нагруженной поверхностью

[0179] Результаты, представленные в предыдущих экспериментах, показывают, что полноразмерные и N-концевые участки MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 могут быть использованы для создания люминально загруженных экзосом. Для дальнейшего изучения потенциала этих белков для конструирования экзосом аминокислоты 1–30 MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 или аминокислоты 1–10 BASP1 были конденсированы с эндогенной трансмембранной областью CD40L, экспрессируемой в виде гомотримера. Были получены такие конструкции как для человеческих, так и для мышинных последовательностей CD40L, поскольку лиганды не показывают перекрестной реакции с родственным рецептором у других видов (**ФИГ. 28**). Экзосомы выделяли из клеток HEK293SF, стабильно трансфицированных одной из экспрессирующих конструкций CD40L, и инкубировали в В-клетках мыши или человека. Количества входного CD40L на экзосомах определяли количественно посредством ИФА CD40L (для оценки CD40L человека: система R&D, № по каталогу DCDL40, партия № P168248; и для измерения CD40L мыши: Abeam, № по каталогу abl 19517, партия № GR3218850-2), В-клетки определяли количественно с использованием В-клеточного маркера CD19, и активацию В-клеток измеряли по проценту гейтированных клеток, положительных на CD69. Кривые дозового титрования мыши (**ФИГ. 29А**) или человека (**ФИГ. 29В**) экзосомного CD40L в культурах, соответствующих видам, показал сравнимую активность между конструкциями на основе сравнения частицы за частицей (левые графики и таблица ниже) или по сравнению друг с другом и равными количествами рекомбинантного белка на молярной основе CD40L (правые графики и

таблица ниже). Сопоставимая активность наблюдалась при экспрессии конструкций CD40L в виде мономеров, они были лишь немного менее эффективными, чем тримерный CD40L, экспрессируемый на N-конце PTGFRN, каркаса с высокой плотностью отображения экзосомы (см., например, международную заявку на патент № PCT/US2018/048026) (ФИГ. 29С). Эти результаты демонстрируют, что MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 представляют собой разнообразные надежные каркасы, полезные для создания различных классов инженерных экзосом для применения в вариантах использования у человека и животных.

Пример 8. Разные типы клеток экспрессируют BASP1, MARCKS и/или MARCKSL1

[0180] Клеточные линии различных тканей (HEK293, 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, за исключением клеток HEK293, которые были выращены в химически определенных средах. 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 каждой клеточной культуры выделяли и экзосомы очищали с использованием способа ультрацентрифугирования с градиентом плотности Optiprep™, описанным выше. Каждый из очищенных препаратов экзосом анализировали посредством ЖХ-МС/МС в соответствии с описанием выше и количественно определяли количество совпадений спектра пептидов (PSM) для BASP1, MARCKS и MARCKSL1 и двух широко изученных экзосомных белков (CD81 и CD9). Тетраспанины CD81 и CD9 обнаруживались в большинстве очищенных экзосомных популяций, но в некоторых случаях были такими же или ниже, чем у люминальных экзосомных белков (например, сравн. CD9 с BASP1 или MARCKSL1) (ФИГ. 30). Это открытие указывает на то, что впервые идентифицированные люминальные экзосомные маркеры могут представлять собой подходящие гибридные белки для генерирования сконструированных экзосом из нескольких неродственных клеточных линий, полученных из разных тканей.

Пример 9. Клетки животного, отличного от человека, сверхэкспрессирующие BASP1, вырабатывают сконструированные с просветом экзосомы

[0181] Результаты примера 8 и демонстрируют, что многочисленные человеческие клетки естественным образом экспрессируют BASP1 и другие новые экзосомные белки, идентифицированные в примере 1. Для определения того, можно ли использовать BASP1 в качестве универсального каркасного белка экзосомы, клетки яичника китайского хомяка

(CHO) стабильно трансфицировали либо плазмидой, экспрессирующей полноразмерный BASP1, конденсированный с меткой FLAG и GFP («BASP1-GFP-FLAG»), плазмиду, экспрессирующую аминокислоты 1–30 BASP1, конденсированную с меткой FLAG и GFP («BASP1(1-30)-GFP-FLAG»), или плазмиду, экспрессирующую аминокислоты 1–8 BASP1, конденсированную с меткой FLAG и GFP («BASP1 (1–8)-GFP-FLAG»). Экзосомы выделяли из клеток CHO дикого типа и клеток CHO, трансфицированных одной из трех плазмид BASP1, используя способ, описанный в Примере 1. Как изображено на **ФИГ. 31А–В**, BASP1 и гибридные белки фрагмента BASP1 были успешно сверхэкспрессированы в клетках CHO и загружены в экзосомы, что было обнаружено посредством PAGE без окрашивания (**ФИГ. 31А**) и вестерн-блоттинга с антителом к FLAG (**ФИГ. 31В**). Данный результат демонстрирует, что клетки, принадлежащие животному, не являющемуся человеком, такие как клетки CHO, могут вырабатывать экзосомы, сверхэкспрессирующие фрагменты BASP1 человека, и что эта сверхэкспрессия может управлять загрузкой загружаемого белка в просвет экзосом с высокой плотностью. Этот результат указывает на то, что BASP1 является универсальным каркасным белком для создания сконструированных экзосом из множества различных типов и видов клеток.

Пример 10. Создание сконструированных с просветом экзосом

[0182] Клетки-продуценты, вырабатывающие сконструированные с просветом экзосомы, получают путем введения экзогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы или модификацию или фрагмент экзосомного белка. Экзосомный белок представляет собой гибридный белок, содержащий фрагменты BASP1, раскрытые в примере 4 выше, и белок-груз. Плазмида, кодирующая экзосомный белок, временно трансфицируется для индуцирования высокого уровня экспрессии экзосомного белка в просвете экзосомы.

[0183] Полинуклеотид, кодирующий экзосомный белок, модификацию или фрагмент экзосомного белка или экзогенную последовательность, кодирующую терапевтический пептид, загружаемый пептид или нацеливающий фрагмент, стабильно трансформируется в клетку-продуцент для получения сконструированных с просветом экзосом. Экзогенная последовательность, кодирующая терапевтический пептид, загружаемый пептид или нацеливающий фрагмент, вставляется в геномный сайт, кодирующий экзосомный белок, для выработки гибридного белка, содержащего терапевтический пептид или загружаемый пептид, присоединенный к экзосомному белку. Полинуклеотид, кодирующий модифицированный экзосомный белок, попадает в геномный сайт, кодирующий экзосомный белок.

[0184] Линия клеток-продуцентов создается путем стабильной трансфекции по меньшей

мере двух полинуклеотидов, каждый из которых кодирует экзосомный белок, модификацию или фрагмент экзосомного белка или экзогенный пептид (например, целевую группу, терапевтический пептид). Две или более экзогенные последовательности встраивают в несколько геномных сайтов, внутри или рядом с геномной последовательностью, кодирующей экзосомный белок, для генерирования сконструированной с просветом экзосомы, содержащей несколько модифицированных экзосомных белков. Каждый из множества модифицированных экзосомных белков нацелен в просвет экзосом.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0185] 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.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0186] Настоящее изобретение относится, *среди прочего*, к композициям экзосом, содержащим модифицированные экзогенные белки и пептиды, для использования при обогащении экзогенных белков в экзосомах. Настоящее раскрытие также обеспечивает методы и способы получения обогащенных экзосом. 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. Экзосома, содержащая целевой белок, в которой по меньшей мере часть целевого белка экспрессируется из экзогенной последовательности, а целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию.
2. Экзосома по п. 1, в которой целевой белок присутствует в экзосоме с более высокой плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме, причем другой целевой белок включает в себя обычный экзосомный белок или его вариант.
3. Экзосома по п. 2, в которой обычный экзосомный белок выбран из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадерина, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.
4. Экзосома по любому из пп. 1–3, в которой экзосома получена из клетки, генетически модифицированной для включения в нее экзогенной последовательности, причем клетка необязательно представляет собой клетку HEK293.
5. Экзосома по п. 4, в которой клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.
6. Экзосома по п. 4, в которой клетка содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки.
7. Экзосома по п. 6, в которой экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце геномной последовательности, кодирующей MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.
8. Экзосома по п. 6, в которой экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.
9. Экзосома по любому из пп. 1-8, в которой целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент, и терапевтический пептид.
10. Экзосома по п. 9, в которой терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.
11. Экзосома по п. 9, в которой терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.
12. Экзосома по п. 9, в которой терапевтический пептид представляет собой антитело или

его фрагмент или модификацию.

13. Экзосома по п. 9, в которой терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или его фрагмент или модификацию.
14. Экзосома по п. 9, в которой терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или модификацию.
15. Экзосома по любому из пп. 1–14, дополнительно содержащая второй целевой белок, в котором второй целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент.
16. Экзосома по любому из пп. 1–14, дополнительно содержащая второй целевой белок, причем второй целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент.
17. Экзосома по любому из пп. 1–15, в которой целевой белок содержит пептид (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118).
18. Экзосома по любому из пп. 1–15, в которой целевой белок содержит пептид (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).
19. Экзосома по любому из пп. 1–15, в которой целевой белок содержит пептид (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).
20. Экзосома по любому из пп. 17–19, в которой целевой белок содержит пептид с любой последовательностью из SEQ ID NO: 4–110.
21. Экзосома по любому из пп. 17–19, в которой целевой белок содержит пептид

- MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту SEQ ID NO: 116).
22. Экзосома по п. 21, в которой целевой белок содержит пептид SEQ ID NO: 110.
 23. Экзосома по п. 20, в которой целевой белок содержит пептид SEQ ID NO: 13.
 24. Экзосома по любому из пп. 1–23, в которой целевой белок содержит загружаемый пептид.
 25. Фармацевтическая композиция, содержащая экзосому по любому из пп. 1–24 и наполнитель.
 26. Фармацевтическая композиция по п. 25, по существу не содержащая макромолекул, причем макромолекулы выбраны из нуклеиновых кислот, экзогенных белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.
 27. Популяция клеток для выработки экзосомы по любому из пп. 1–24.
 28. Популяция клеток по п. 27, содержащая экзогенную последовательность, кодирующую целевой белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию.
 29. Популяция клеток по п. 28, дополнительно содержащая вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй целевой белок, где второй целевой белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию.
 30. Популяция клеток по п. 28, дополнительно содержащая вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй целевой белок, где второй целевой белок содержит транспортер АТФ, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или его фрагмент.
 31. Популяция клеток по любому из пп. 27–30, в которой экзогенную последовательность встраивают в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, при этом экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют целевой белок.
 32. Популяция клеток по любому из пп. 27–30 в которой экзогенная последовательность находится в плазмиде.
 33. Популяция клеток по любому из пп. 27–32, в которой экзогенная последовательность кодирует терапевтический пептид.
 34. Популяция клеток по п. 33, в которой терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.

35. Популяция клеток по п. 33, в которой терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.
36. Популяция клеток по п. 33, в которой терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию.
37. Популяция клеток по п. 33, в которой терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, транскрипционный фактор или его фрагмент или модификацию.
38. Популяция клеток по п. 33, в которой терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или модификацию.
39. Популяция клеток по п. 31, в которой экзогенная последовательность кодирует нацеливающий фрагмент.
40. Популяция клеток по п. 39, в которой нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки.
41. Популяция клеток по п. 30, в которой второй целевой белок дополнительно содержит нацеливающий фрагмент.
42. Популяция клеток по п. 41, в которой нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки.
43. Полипептид для модификации экзосом, содержащий последовательность (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118); (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu); или (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а

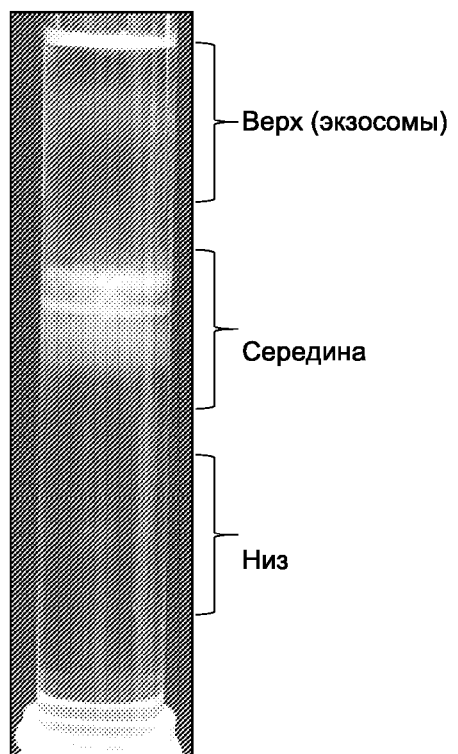
положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

44. Полипептид по п. 43, содержащий любую из последовательностей SEQ ID NO: 4–110.
45. Полипептид по п. 43, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13.
46. Полипептид по п. 43, содержащий последовательность SEQ ID NO: 110.
47. Полипептид по п. 43, содержащий последовательность MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 116).
48. Полипептид по любому из пп. 43–47, в котором полипептид конденсирован с загружаемым пептидом.
49. Полипептид по п. 48, в котором полипептид конденсирован с N-концом загружаемого пептида.
50. Полинуклеотидная конструкция, содержащая кодирующую последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп. 43–49.
51. Полинуклеотидная конструкция по п. 50, в которой кодирующая последовательность является кодон-оптимизированной.
52. Способ создания сконструированной экзосомы, включающий этапы:
 - a. введения в клетку конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, содержащей (i) первую последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или его фрагмент или модификацию, и (ii) вторую последовательность, кодирующую загружаемый пептид;
 - b. поддержания клетки в условиях, позволяющих клетке экспрессировать гибридный полипептид; и
 - c. получения сконструированной экзосомы, содержащей гибридный полипептид из указанной клетки.
53. Способ по п. 52, в котором первая последовательность содержит последовательность (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118); (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы состоящий из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu); или (iii)

(M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), где каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и где π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met), и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и где положение пять не является (+), а положение шесть не является (+) и (Asp или Glu).

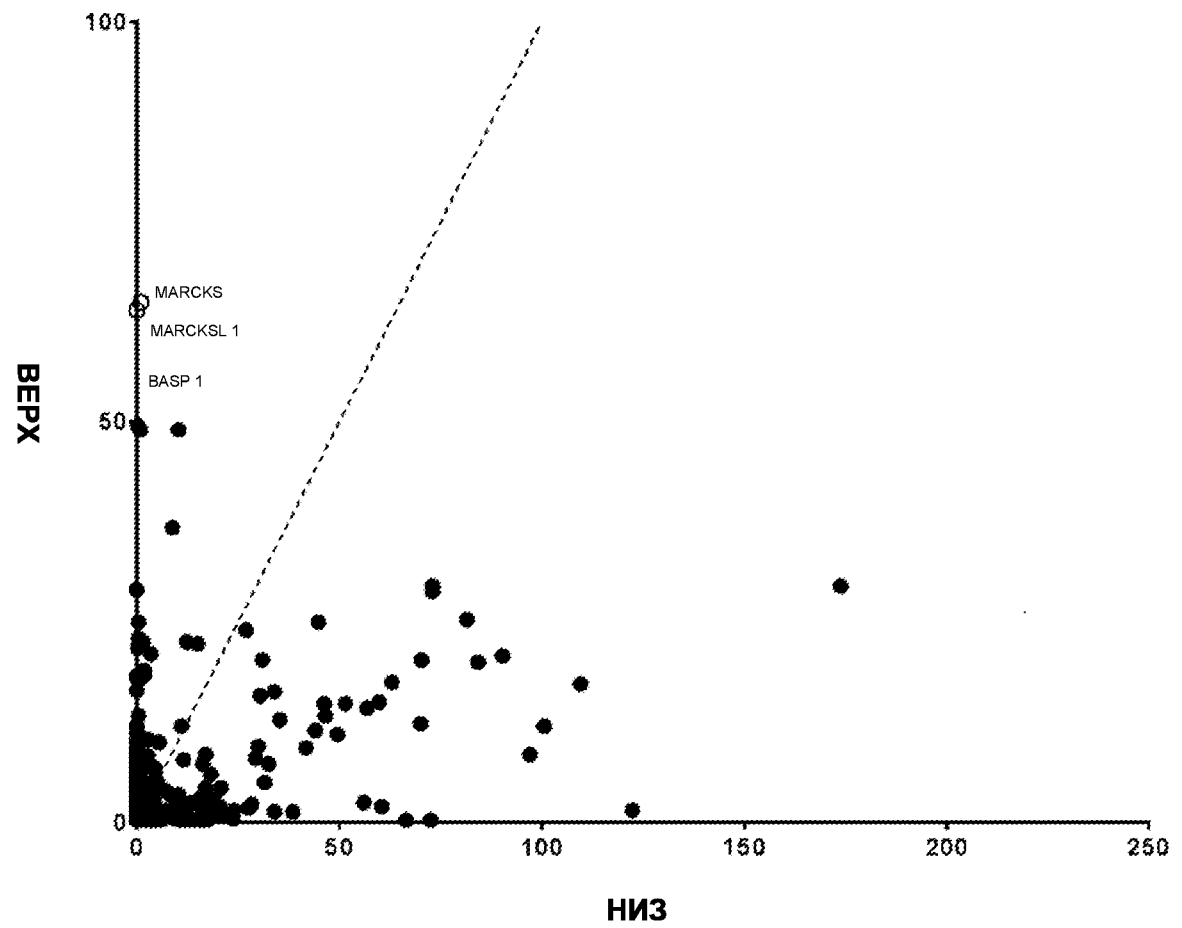
54. Способ по любому из пп. 52–53, в котором первая последовательность содержит любую из SEQ ID NO: 4–110.
55. Способ по п. 54, в котором первая последовательность содержит SEQ ID NO: 13.
56. Способ по п. 54, в котором первая последовательность содержит SEQ ID NO: 110.
57. Способ по п. 53, в котором первая последовательность содержит MGXKLSKKK, где X представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 116).
58. Способ по п. 52–57, в котором гибридный белок присутствует в просвете сконструированной экзосомы с более высокой плотностью, чем другой целевой белок другой экзосомы, причем другой целевой белок включает в себя обычный экзосомный белок или его вариант.
59. Способ по п. 58, в котором гибридный полипептид присутствует с более чем в 2 раза большей плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме.
60. Способ по п. 59, в котором гибридный полипептид присутствует с более чем 4 раза, 16 раз, 100 раз или 10 000 раз более высокой плотностью, чем другой целевой белок в другой экзосоме.

ФИГ. 1



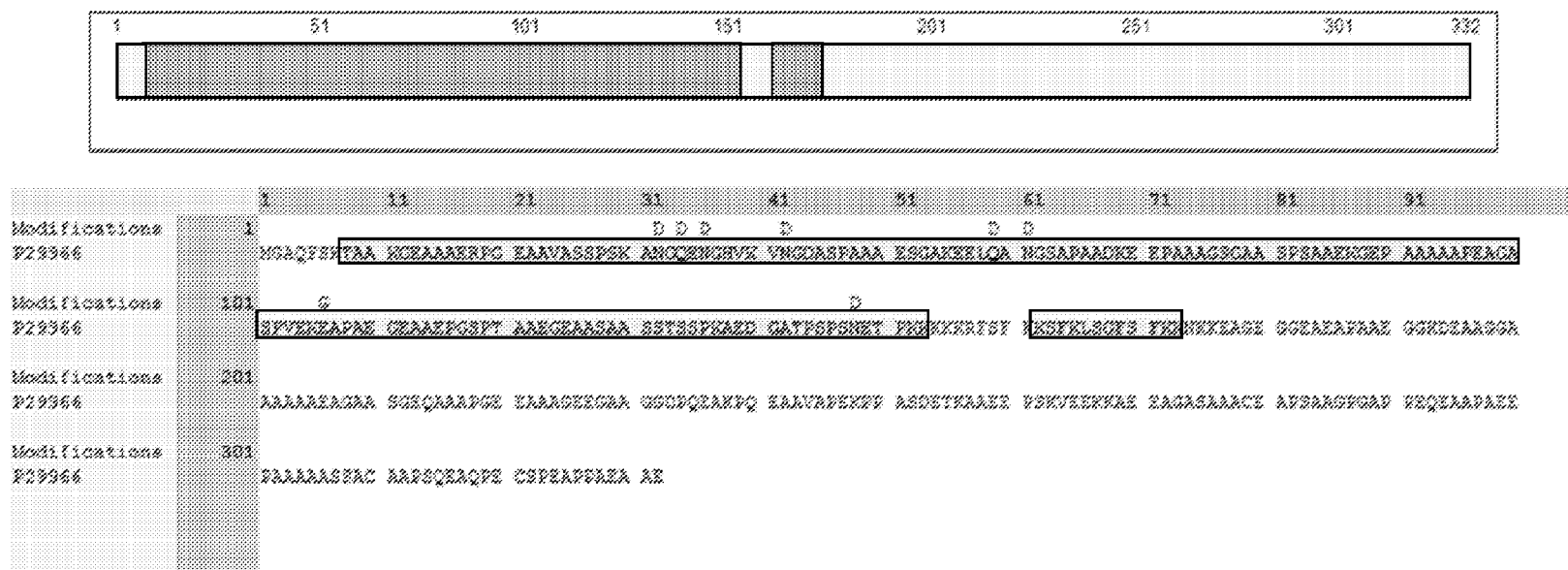
ФИГ. 2

ЗАМІНЮЮЦІЙ ЛІСТ (ПРАВИЛО 26)



ФИГ. 3

MARCKS (P29966)



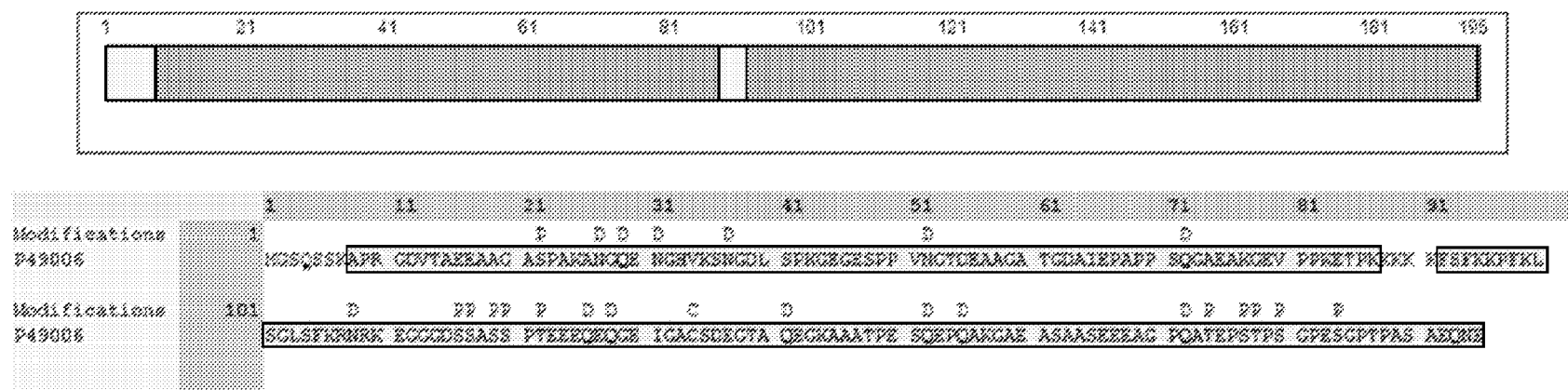
Модификации

D: дезамидированный (N, Q)

G: Glu-> пирo-Glu (N-конец)

ФИГ. 4

MARCKSL1 (P49006)



Модификации

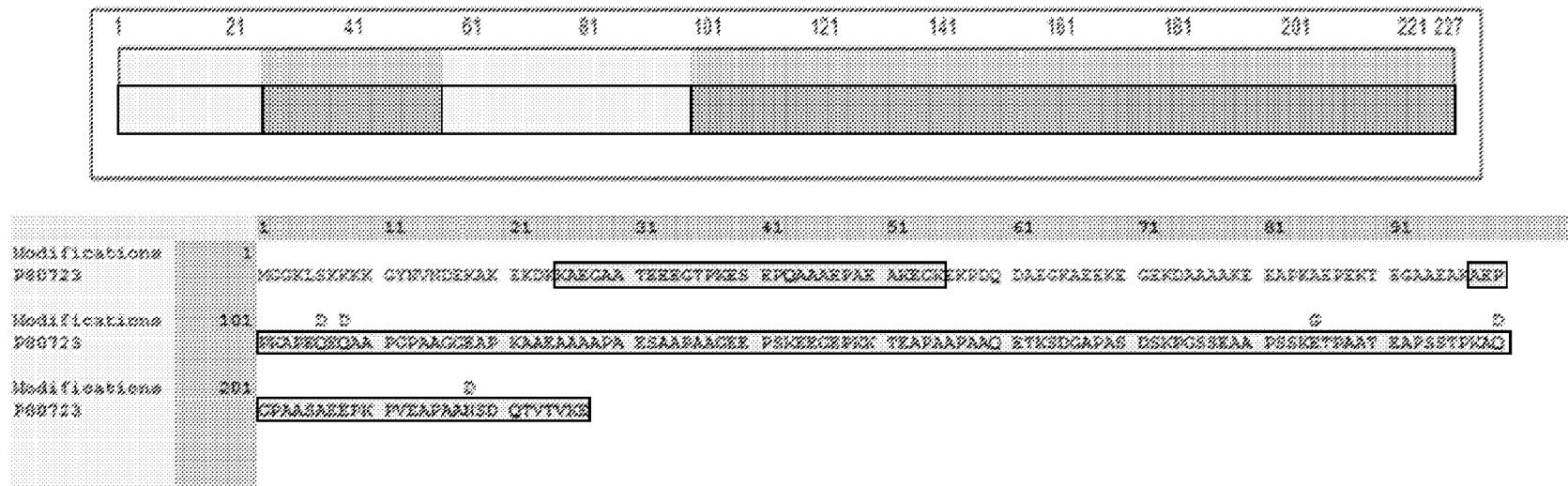
C: карбамидометил (C)

D: дезамидированный (N, Q)

P: Φοσφο (S, T)

ФИГ. 5

BASPI(P80723)

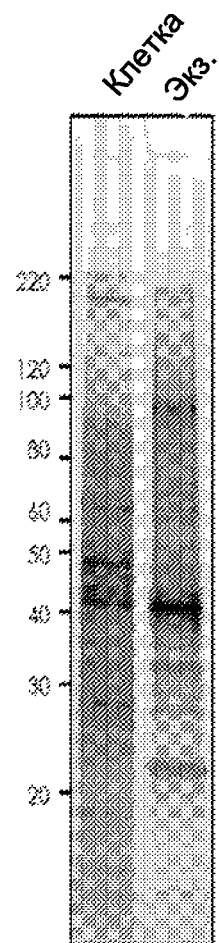


Модификации

D: дезамидированный (N, Q)

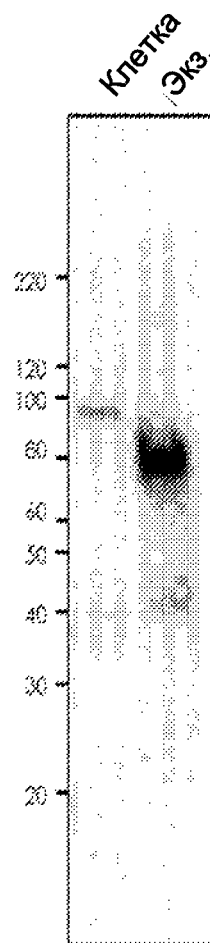
G: Glu-> пирро-Glu (N-конец)

ФИГ. 6А



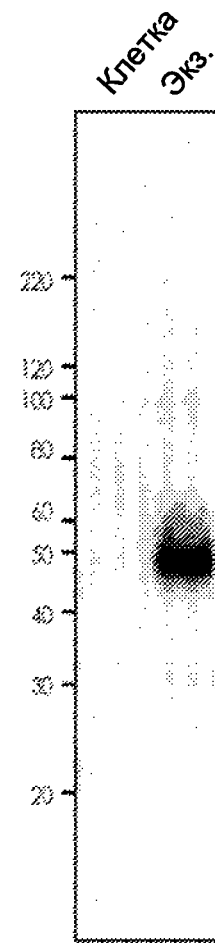
Общий белок

ФИГ. 6В



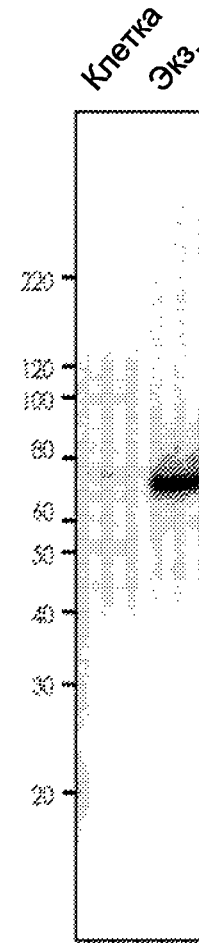
MARCKS

ФИГ. 6С



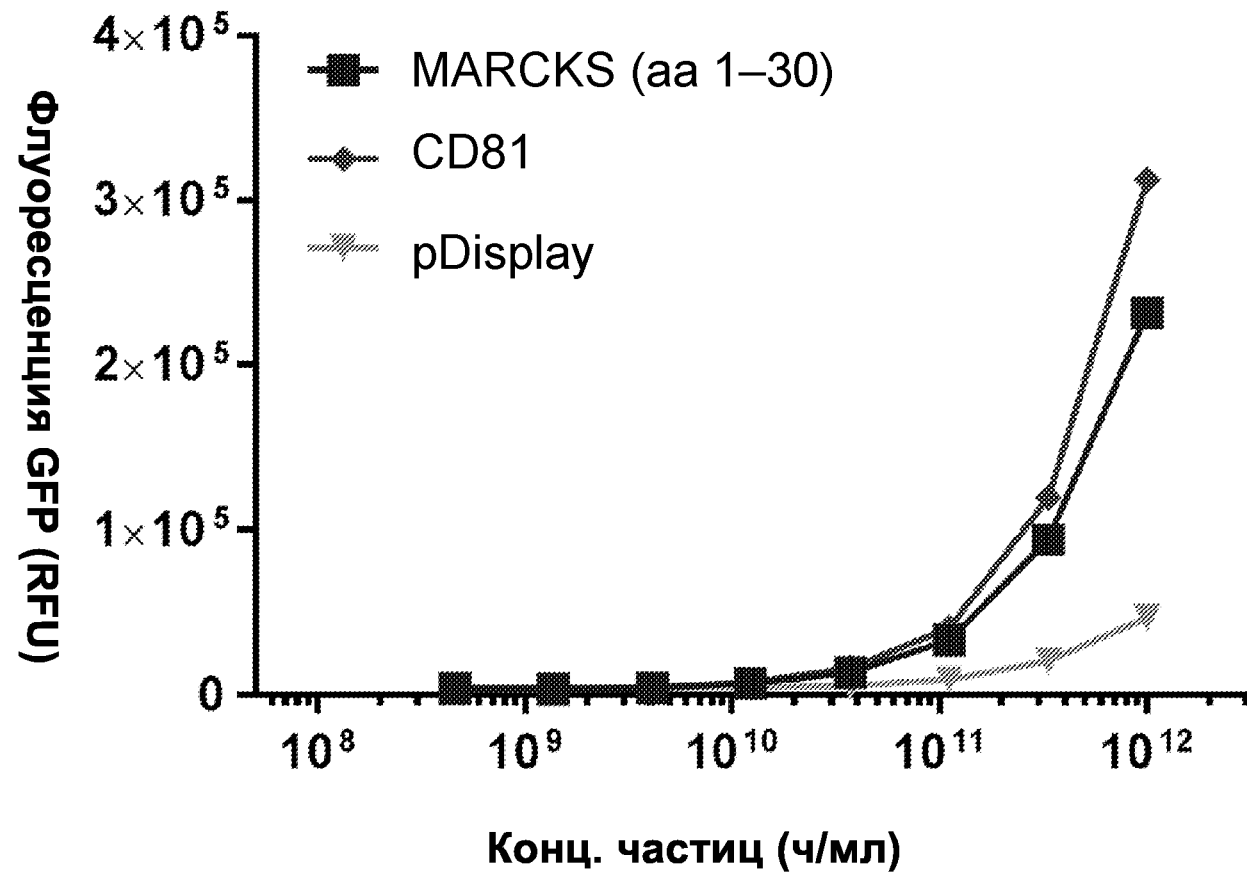
MARCKSL1

ФИГ. 6D

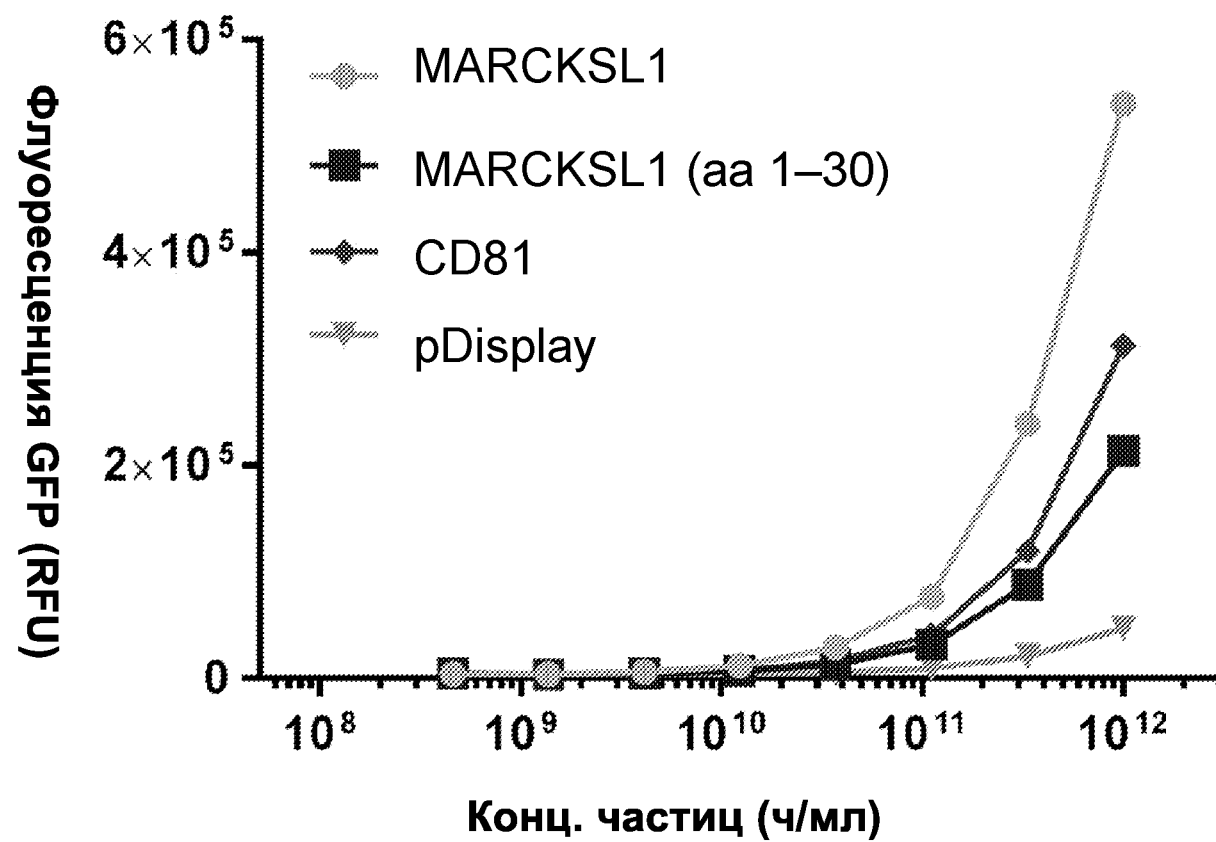


BASP1

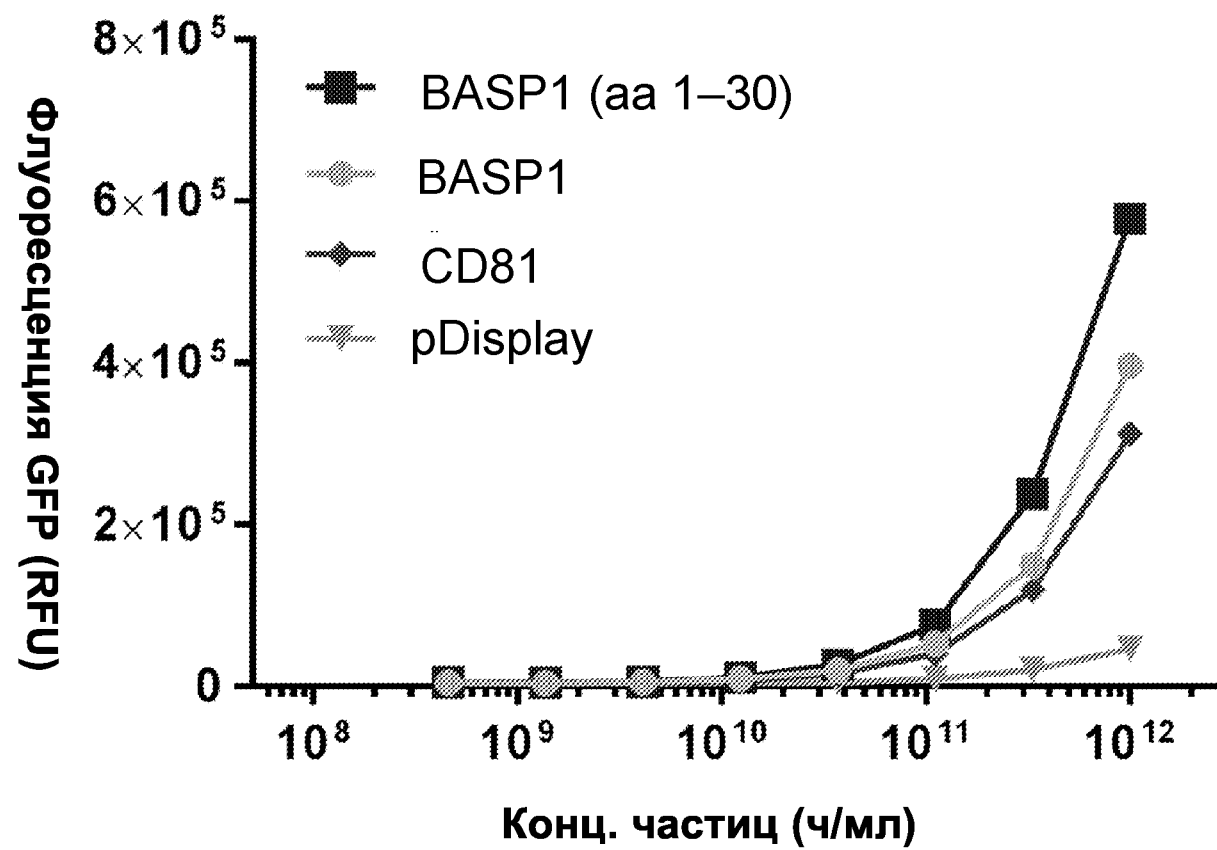
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

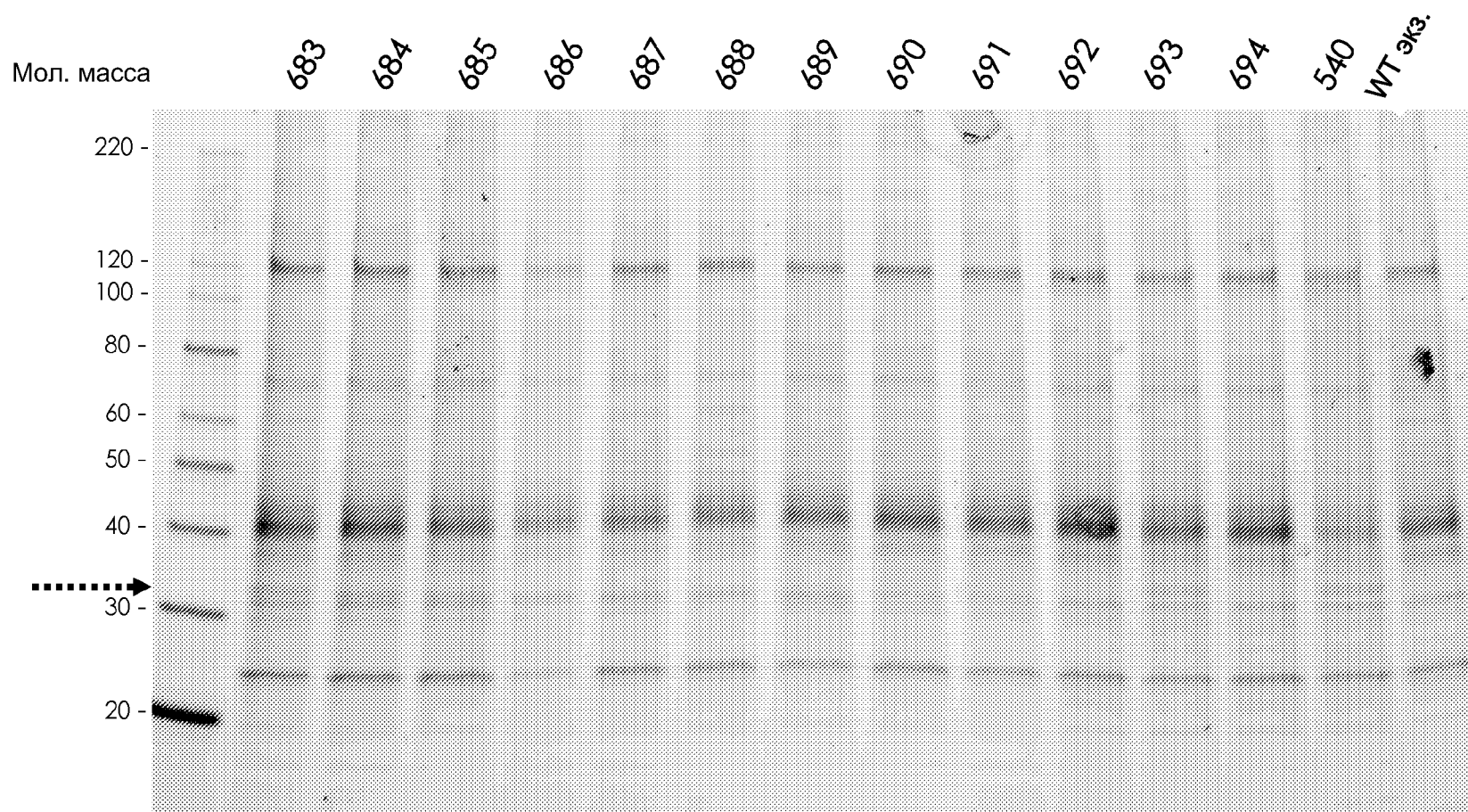
10/36

BASP1 (1-30)	FLAG	EGFP	pCB
MGGKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE	GAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		540
MAGKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE	GAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		692
MGAKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE	GAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		693
MAAKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE	GAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		694
MGGKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		683
MGGKLSKSKKKGYNVNDEKAKEKD	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		684
MGGKLSKSKKKGYNVNDEKAKE	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		685
MGGKLSKSKKKGYNVNDEK	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		686
MGGKLSKSKKKGYNVN	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		687
MGGKLSKSKKKGY	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		688
MGGKLSKSKK	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		689
MGGKLS	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		690
MGG	-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG		691

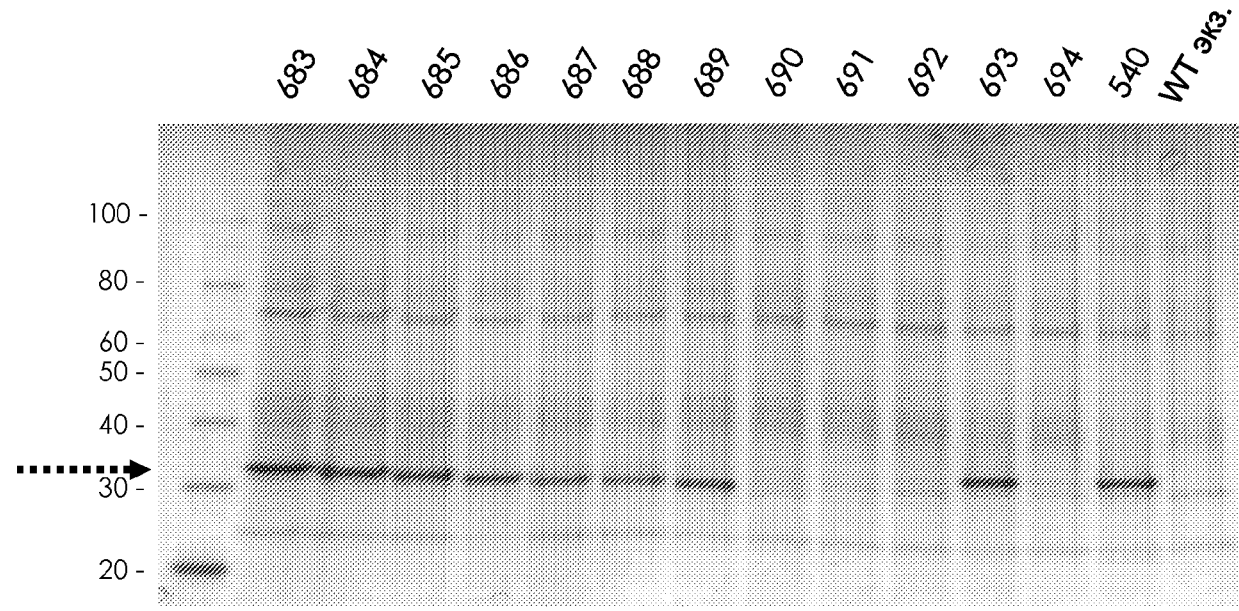
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13



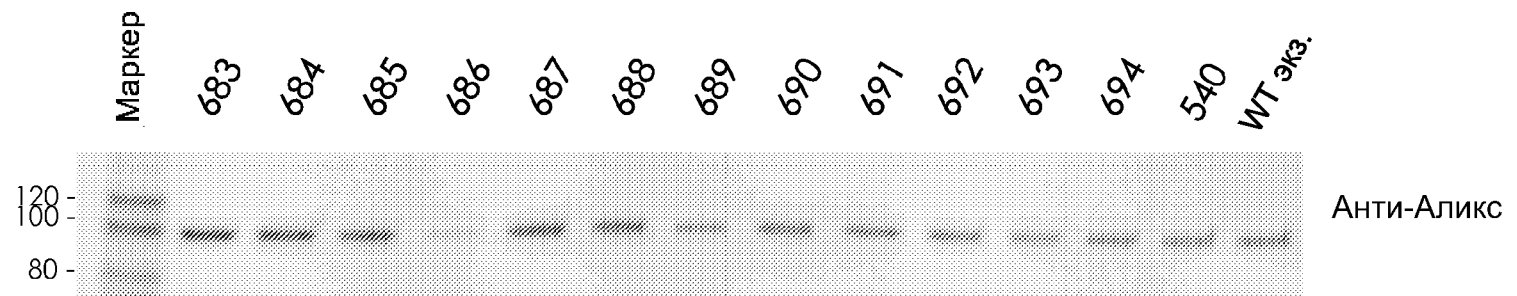
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

ФИГ. 14

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



ФИГ. 15

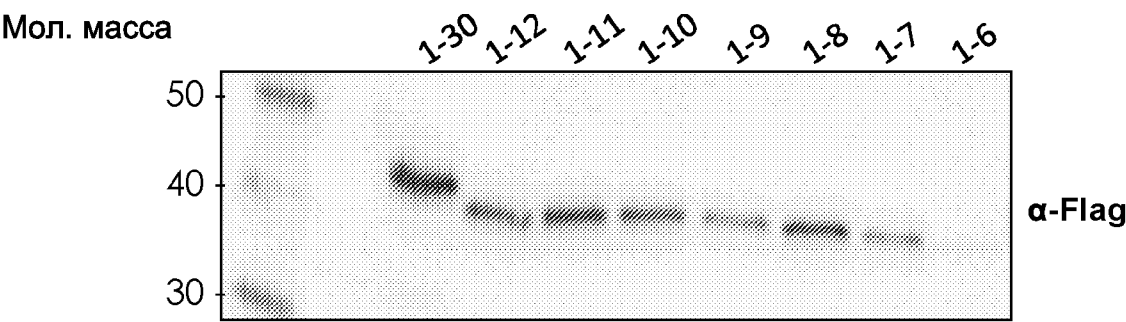


ФИГ. 16А

	BAS P1	FLAG	GFP
Положение а. к.:	1---5---10---15---20---25---30	-----	-----
BASP1, 1-30	MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-12	MGGKLSKKKKGY-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-11	MGGKLSKKKKG-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-10	MGGKLSKKKK-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-9	MGGKLSKKK-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG.	
BASP1, 1-8	MGGKLSKK-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-7	MGGKLSK-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-6	MGGKLS-----	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	

16/36

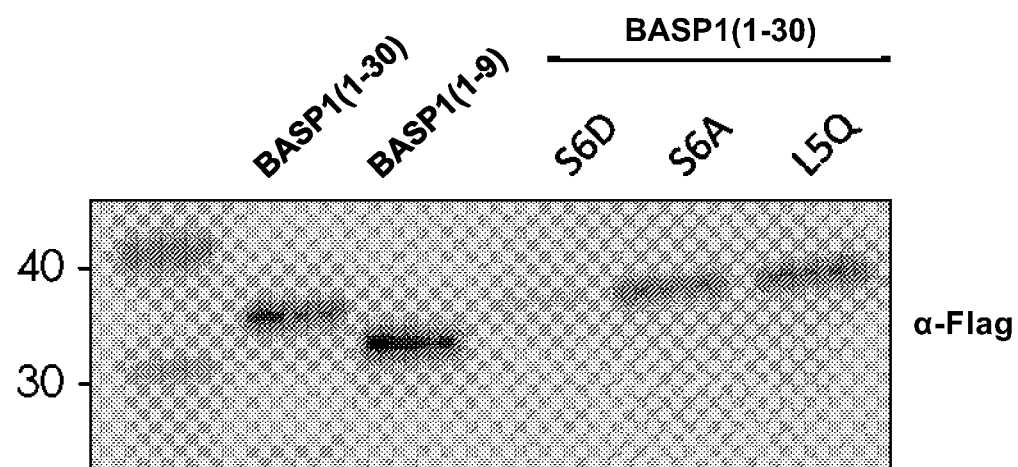
ФИГ.
16В



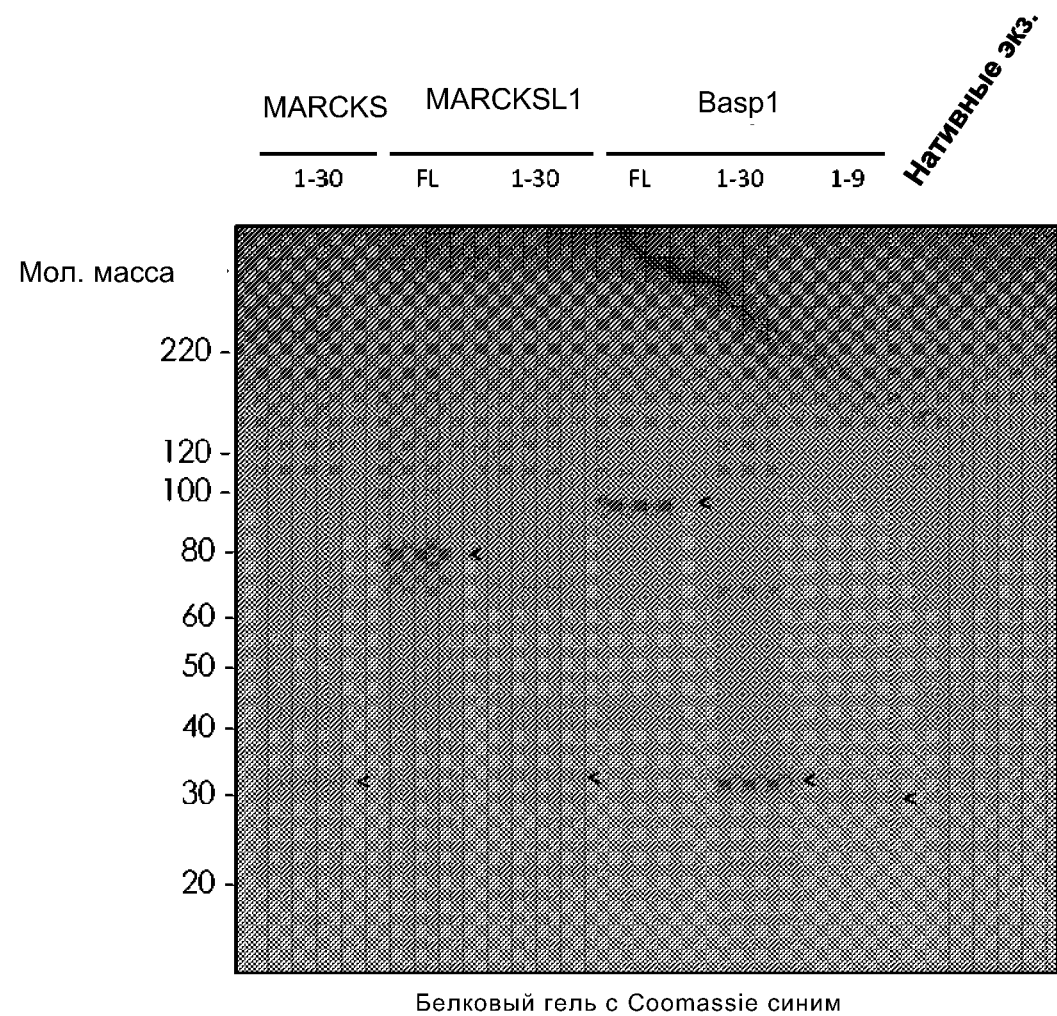
ФИГ. 17А

Положение а. к.:	1---5---10---15---20---25---30
BAS P1 1-30	MGGKLSK K K K G Y N V N D E K A K E K D K K A E G A A
BAS P1, 1-30-S6D	MGGK L <u>D</u> K K K K G Y N V N D E K A K E K D K K A E G A A
BAS P1, 1-30-S6A	MGGK L <u>A</u> K K K K G Y N V N D E K A K E K D K K A E G A A
BAS P1, 1-30-L5Q	MGGK <u>Q</u> S K K K K G Y N V N D E K A K E K D K K A E G A A

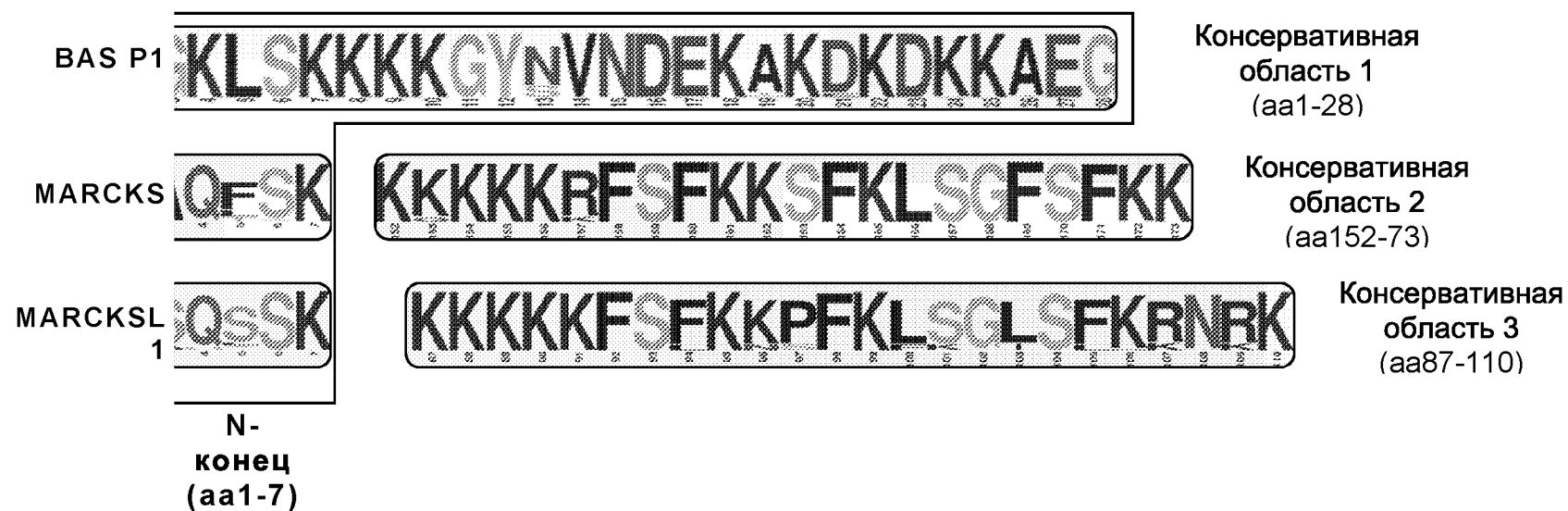
ФИГ. 17В



ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20А

Положение а. к.:

BASP1-30

MARCKS-MG-PSD

MARCKS-MA-PSD

MARCKS-MG-PSD-K6S

MARCKS-MG-PSD-K6A

1---5---10---15---20---25---30

| | | | | |

MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA

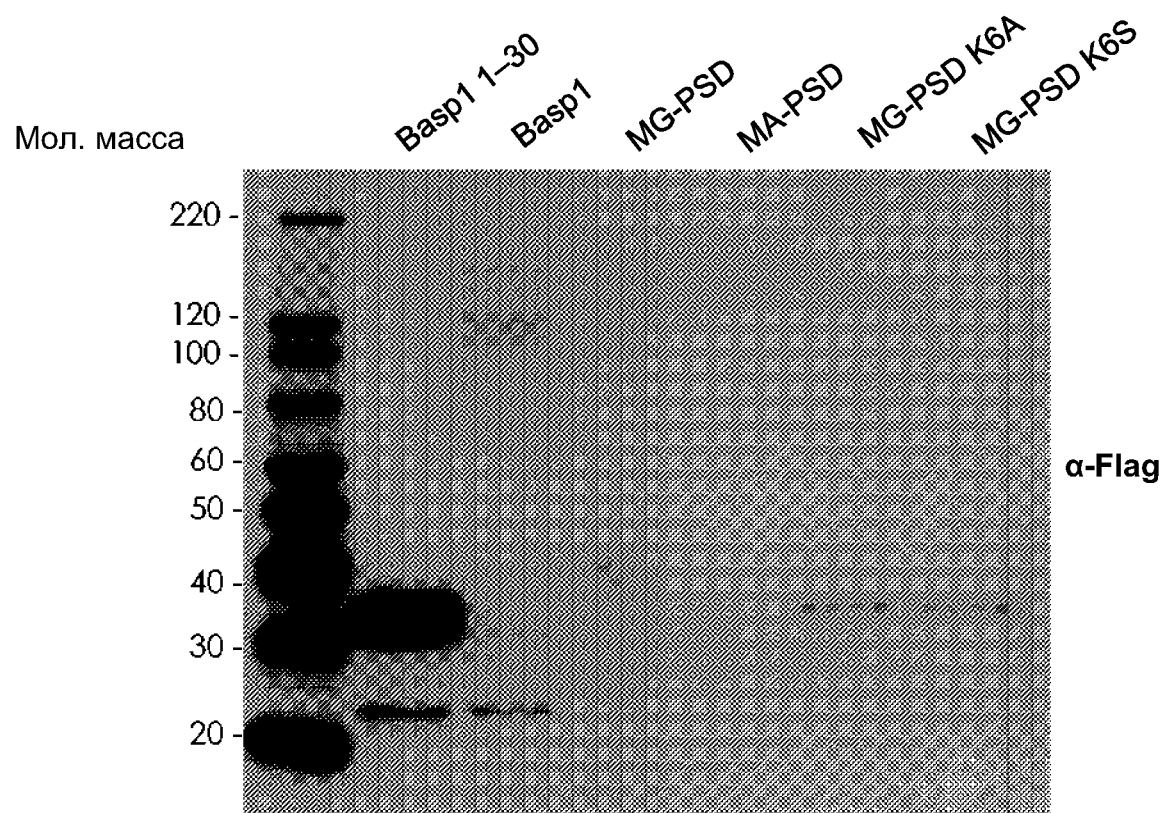
MGAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA

MAAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA

MGAKK**S**KKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA

MGAKK**A**KKRFSFKKPFKLSGFSFKKNKKEA

ФИГ. 20В



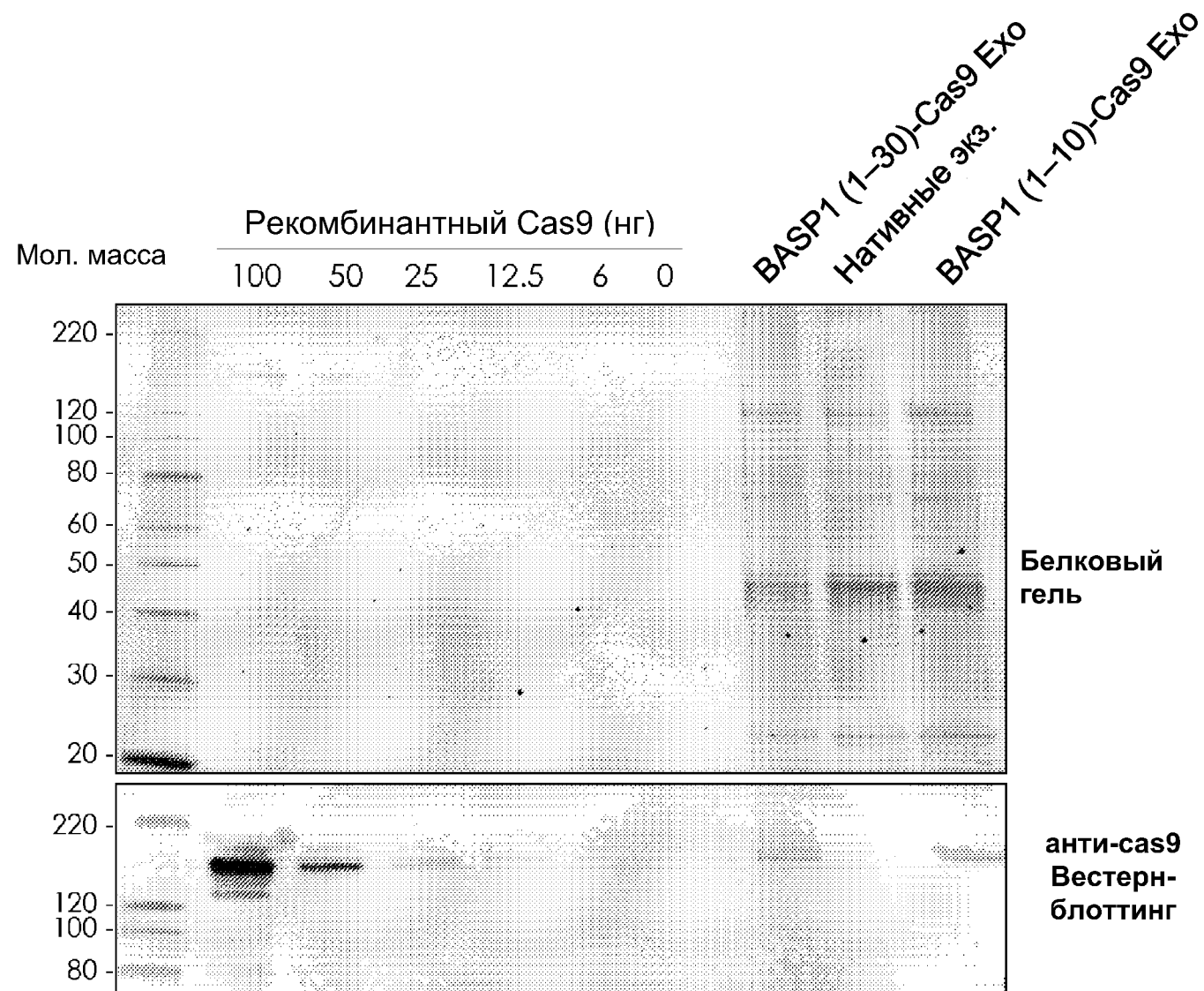
ФИГ. 21

Положение	1	2	3	4	5*	6*	7	8	Сокращения:
Мотив 1	M	G	GAS	KQ	LFSQ	SA	K	K	π – Pro, Gly, Ala, Ser ζ – Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg
Мотив 2	M	G	π	ζ	Фп	SAGN	[+]	[+]	Ф – Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met [+] – Lys, Arg, His
Мотив 3	M	G	π	x	Фп	π	[+]	[+]	[-] – Asp, Glu

*Положение 5 не может содержать [+]

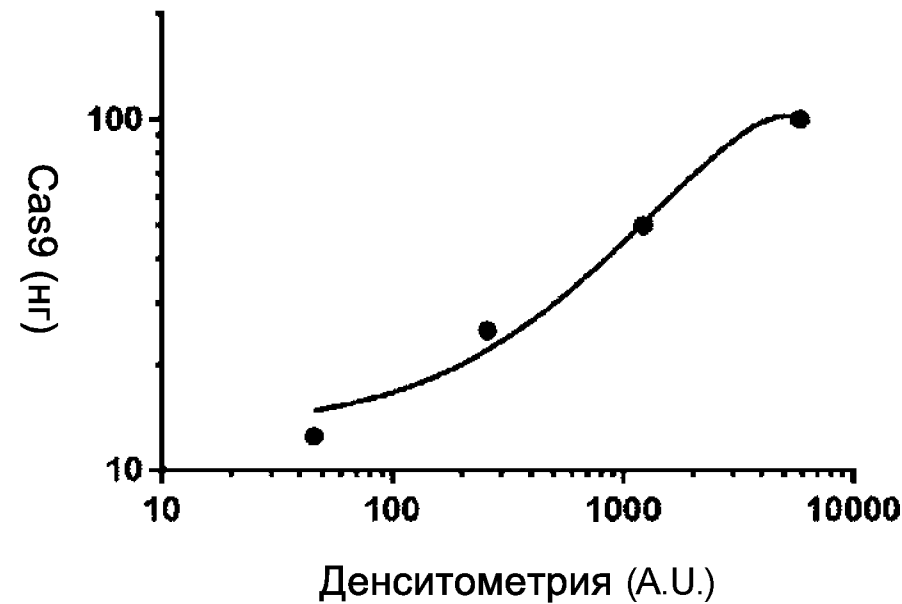
*Положение 6 не может содержать [-]

ФИГ. 22А



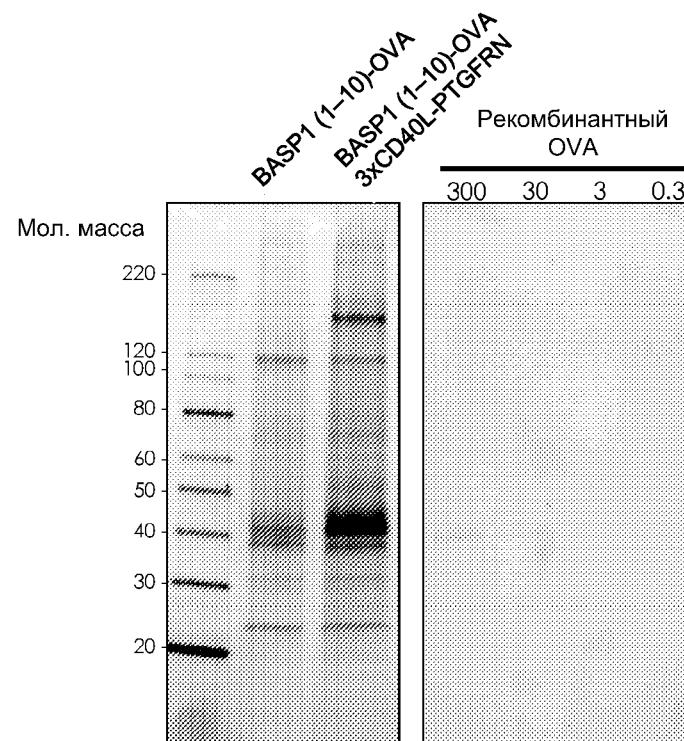
ФИГ. 22В

Стандартная кривая Cas9



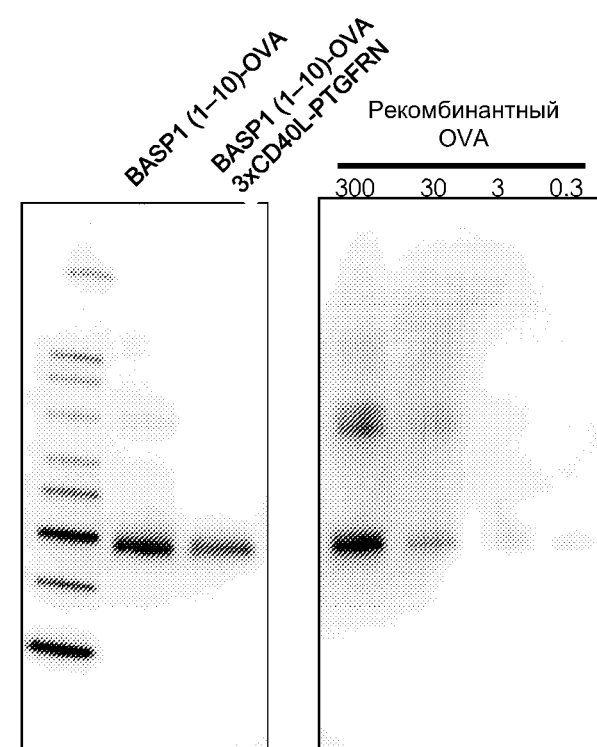
Образец	УЕ	нг Cas9	#EV	нг/EV	нг/Cas9	Cas9/EV
Basp1 (1–30) Cas9	232,4	23,44	2,00E+10	1,17E-09	2,71E-10	4,32
Basp1 (1–10) Cas9	330,8	24,95	2,00E+10	1,25E-09	2,71E-10	4,60

ФИГ. 23А



Белковый гель

ФИГ. 23В



анти-овальбумин вестерн-блот

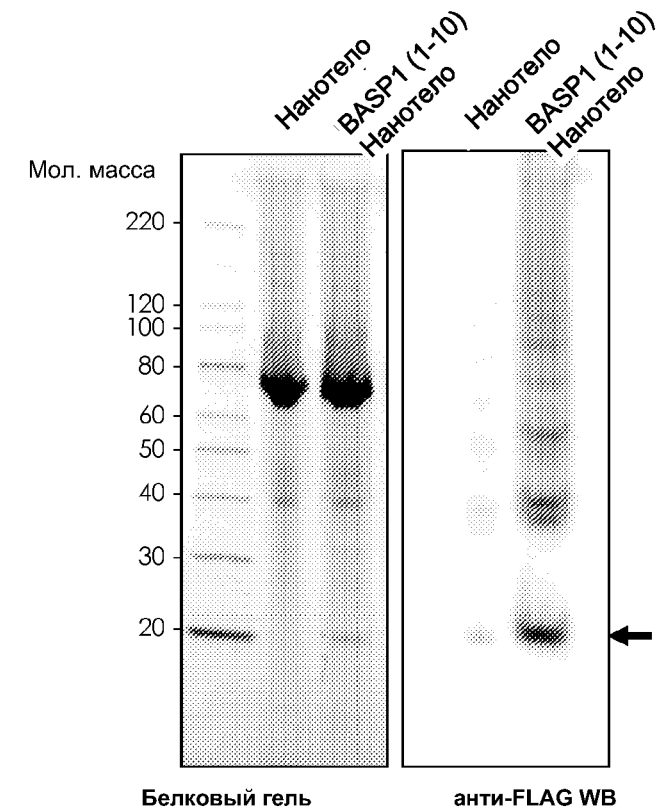
ФИГ. 24А

ЗАМЕНЯЮЩИИ ЛИСИ (ПРАВЫЮ 26)

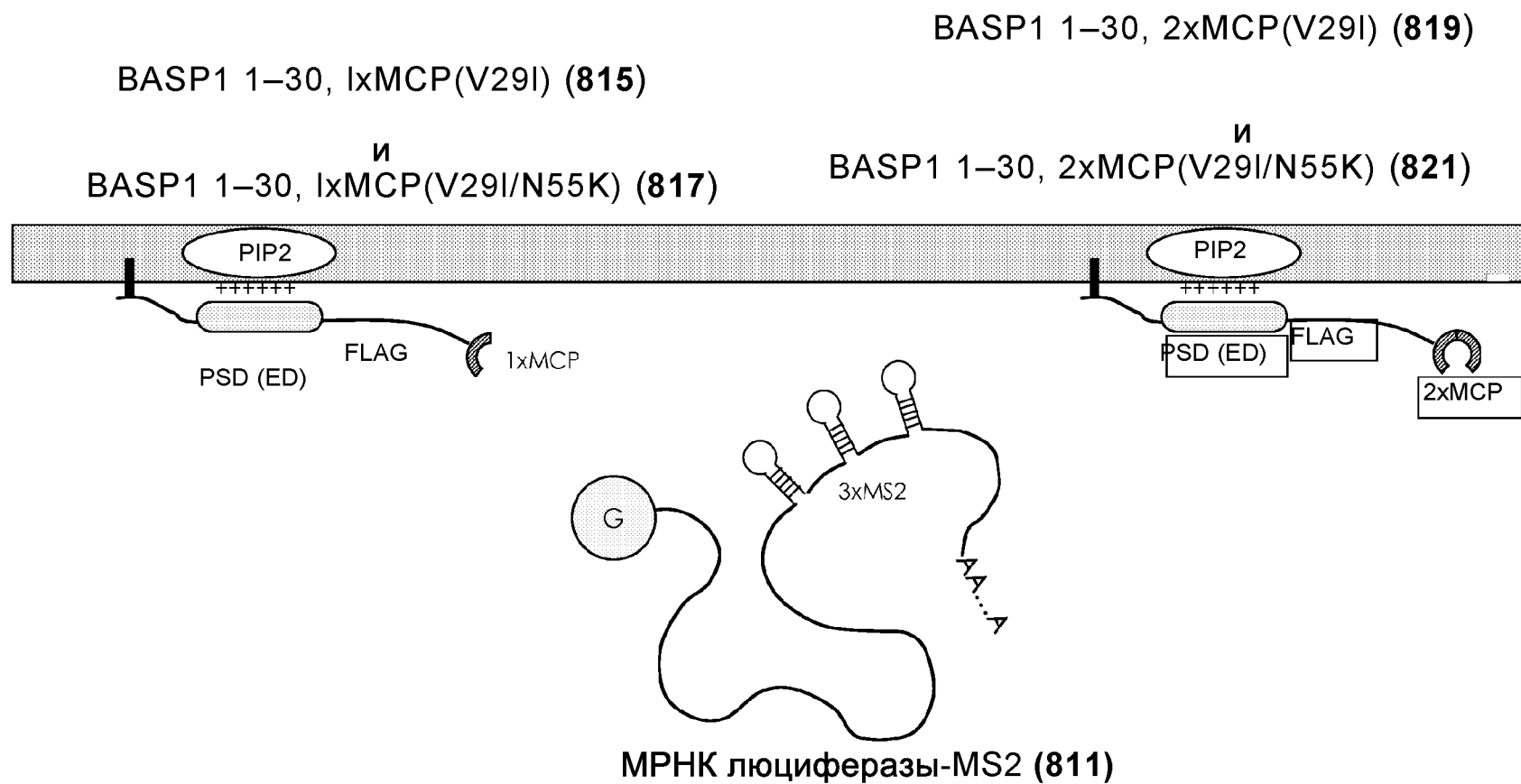
<u>BASP1(1-10)</u>		<u>FLAG</u>
<u>MGKLSK</u> KKK	SAGGSGGSTS	GSG <u>DYK</u> DDDD
<u>KGSGF</u> EMDQV	QLVESGGALV	QPGGSLRLSC
AASGFPVNRY	SMRWYRQAPG	KEREWVAGMS
SAGDRSSYED	SVKGRFTISR	DDARNTVYLQ
MNSLKPEDTA	VYYCENVNVGF	EYWGQGTQVT
VSS		

Прогнозируемая мол. масса 17 кДа

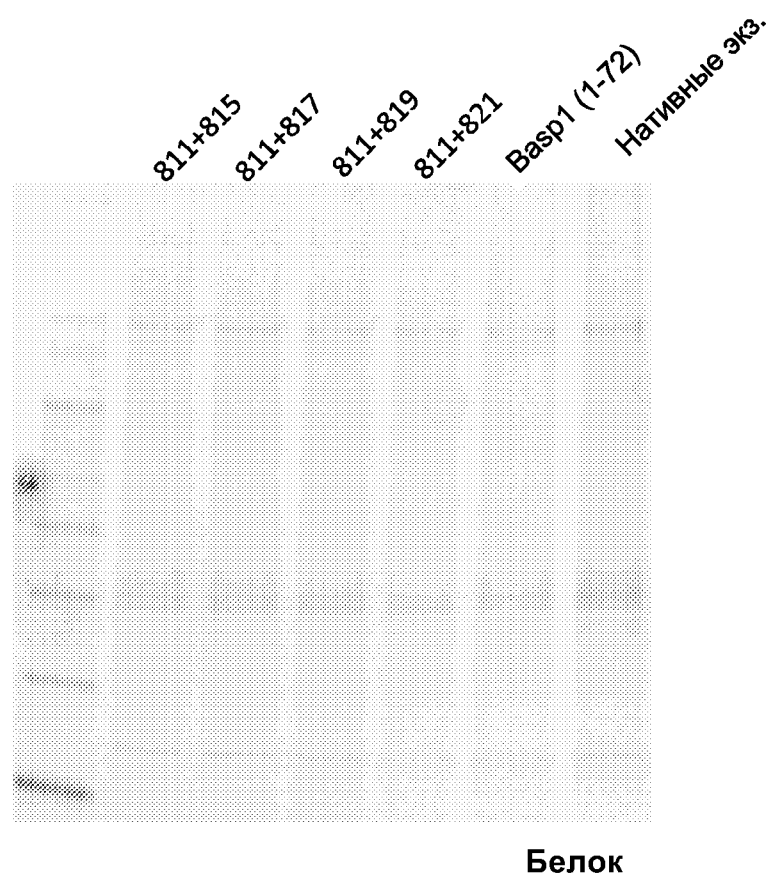
ФИГ. 24В



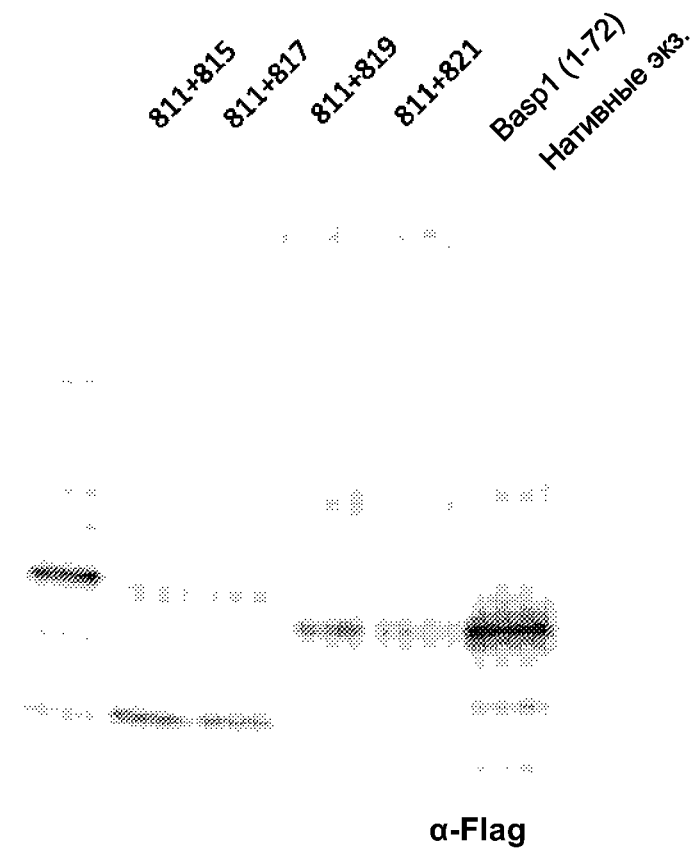
ФИГ. 25

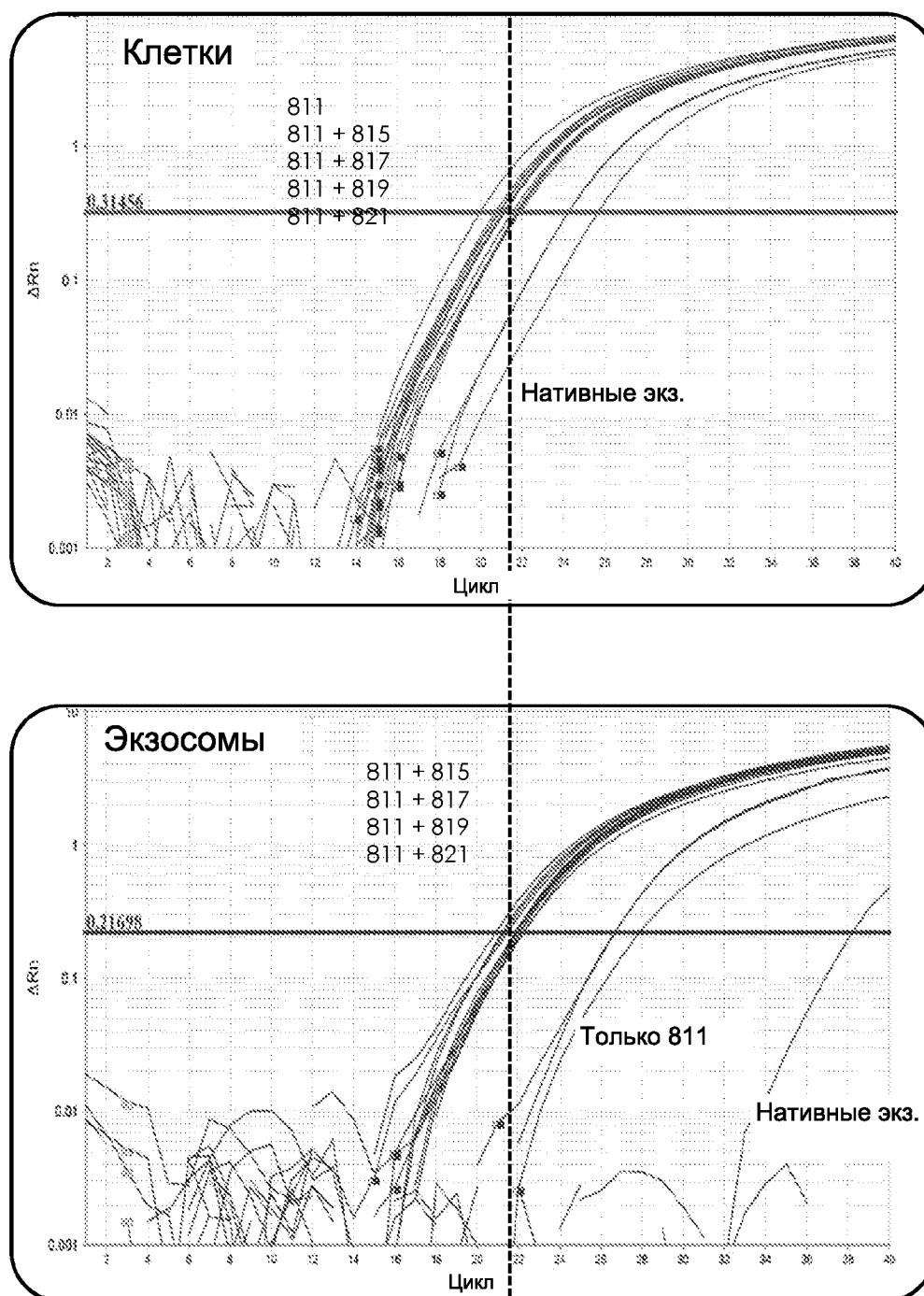


ФИГ. 26А



ФИГ. 26В





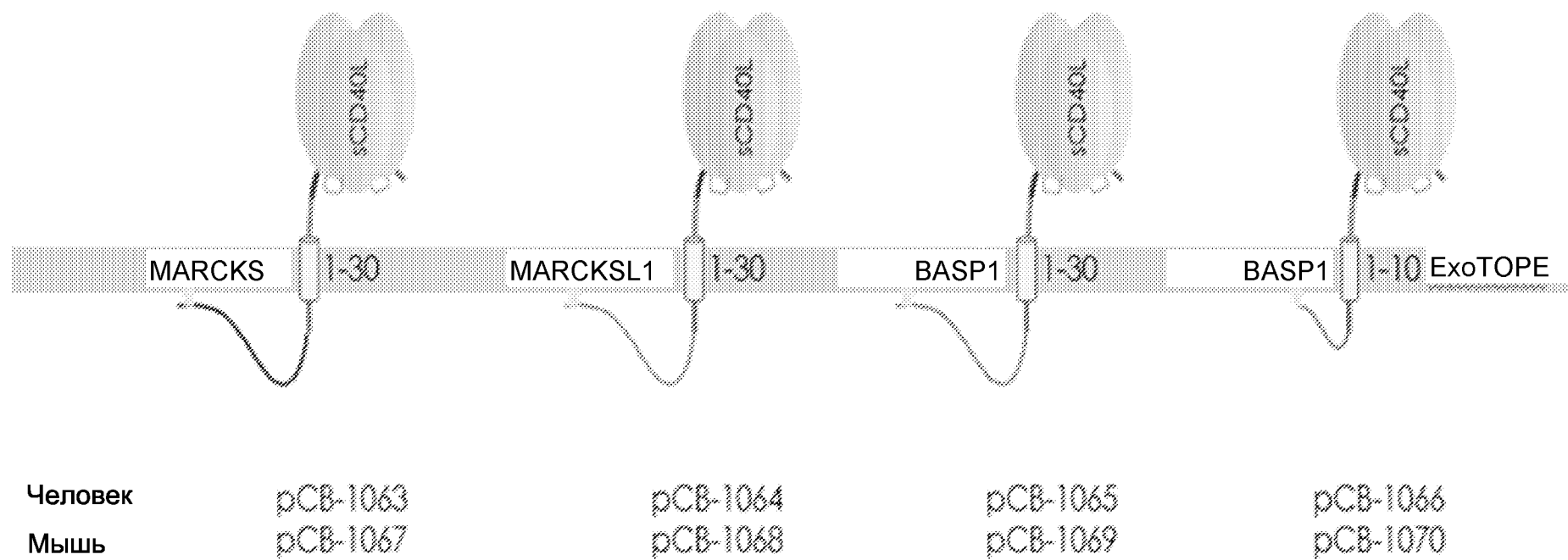
ФИГ. 27А

ФИГ. 27В

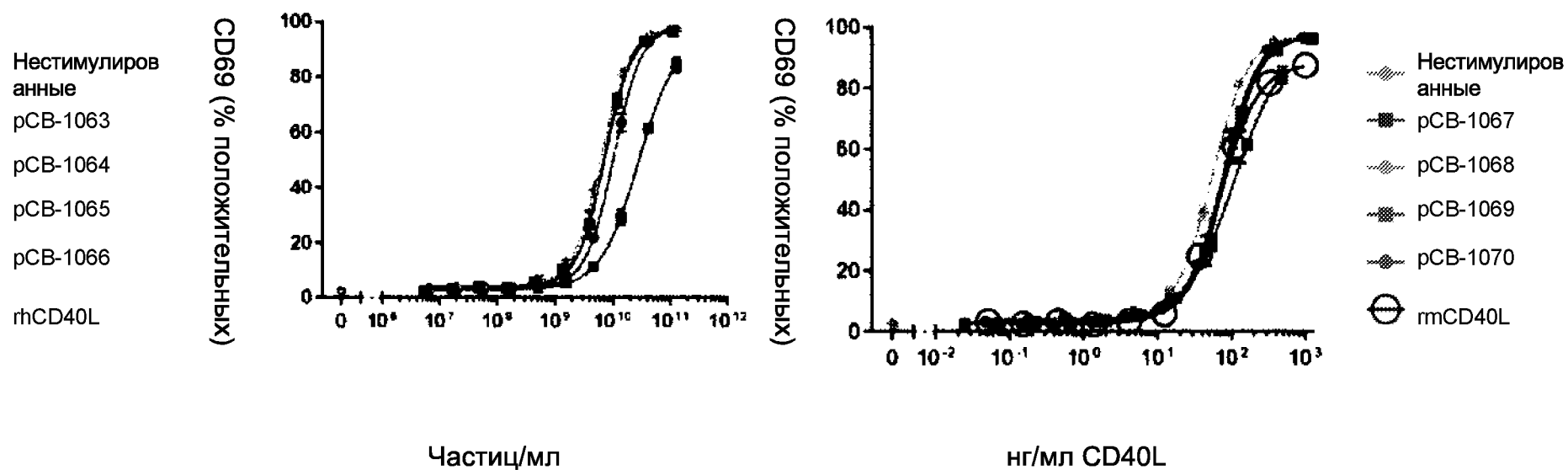
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

Конструкции	Клетки C _t	C _t EV	Кратное увеличение экзосом по сравнению с только 811
Нативные НЕК	24,6	38,2	4,2x10 ⁻⁴
811 (только мРНК)	21,3	27,0	1
811 + 815	20,6	21,7	39,4
811 + 817	21,8	22,1	29,9
811 + 819	21,2	21,9	34,3
811 + 821	20,9	21,1	59,7

ФИГ. 28

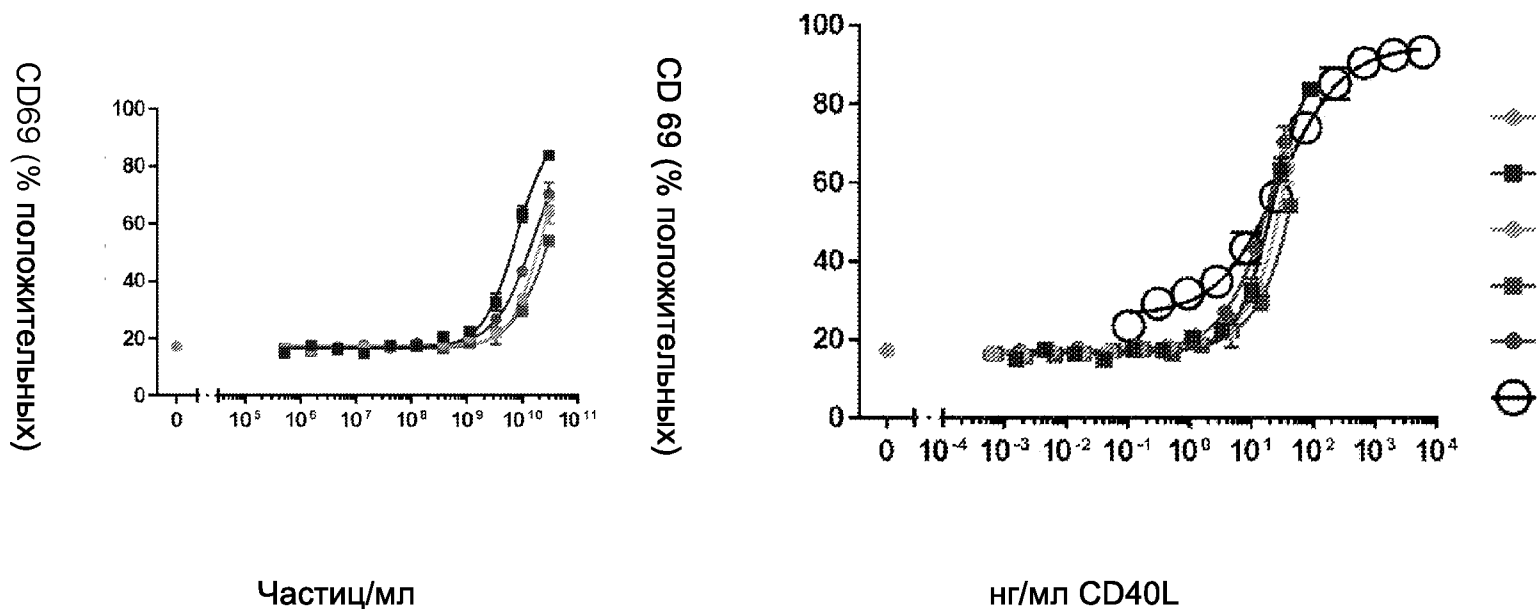


ФИГ. 29А



	pCB-1067	pCB-1068	pCB-1069	pCB-1070	rmCD40L
EC50 (нг/мл)	81,5	54,8	108,7	76,1	70,8
EC50 (ч/мл)	7,41E+09	6,18E+09	2,88E+10	1,06E+10	Н/Д

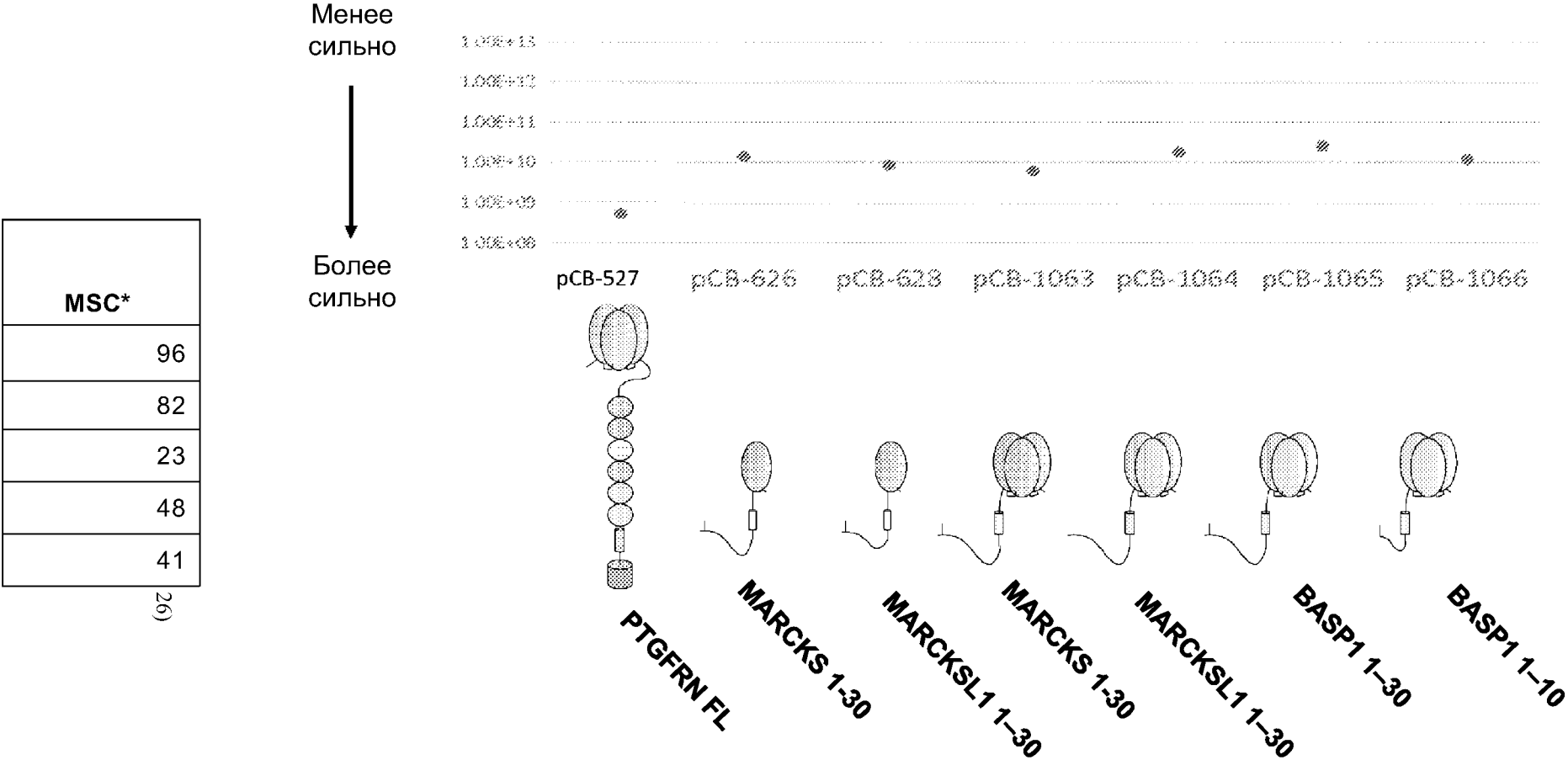
ФИГ. 29В



ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

	pCB-1063	pCB-1064	pCB-1065	pCB-1066	rhCD40L
EC50 (нг/мл)	18,55	23,02	36,51	13,59	19,34
EC50 (ч/мл)	6,23E+09	1,83E+10	2,56E+10	1,20E+10	Н/Д

ФИГ. 29С



ФИГ. 30

Количество пептидных спектральных совпадений (PSM)

Название гена	HEK293	HT1080	K562	MB231	Raji
BASP1	122	79	0	74	103
MARCKS	101	0	0	14	0
MARCKS L1	114	53	97	23	193
CD81	34	21	2	9	9
CD9	21	6	0	31	0

*Выполнено в отдельном эксперименте

ФИГ. 31

