

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191334** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.10

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.22

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/US2018/061679; 62/835,430

(32) 2018.11.16; 2019.04.17

(33) US

(86) PCT/US2019/033629

(87) WO 2020/101740 2020.05.22

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

(72) Изобретатель:

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

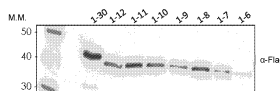
(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к терапевтическим экзосомам, обогащенным белками, которые присутствуют на просветной поверхности экзосом. В изобретении предложены способы производства экзосом, обогащенных белками, которые присутствуют на просветной поверхности экзосом, способ ассоциирования терапевтического пептида или белка с просветной поверхностью экзосом и способ применения, например способы терапевтического или диагностического применения. Способы производства включают создание экзосом со сконструированной просветной поверхностью, которые включают один или более из белков EV, например экзосомных белков в концентрациях, превышающих концентрации, наблюдаемые в экзосомах дикого типа, модификацию или фрагмент EV, например экзосомный белок или слитый белок EV, например экзосомный белок и полезную нагрузку, например биологически активную молекулу, такую как терапевтический белок.

ПОЛОЖЕНИЕ ЗАМЕНИТЕЛЕЙ: 1---5---10---15---20---25---30

	BASP1	FLAG	GFP
BASP1, 1-30	MGGLSKKKKKGYNVNDEKAKKKKAEAA	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-12	MGGLSKKKKKGY	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-11	MGGLSKKKKKG	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-10	MGGLSKKKK	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-9	MGGLSKKK	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-8	MGGLSKK	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-7	MGGLSK	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	
BASP1, 1-6	MGGLS	SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...	



A1

202191334

202191334

A1

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0001] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (название: 4000_041PC01_SL_ST25.txt, размер: 116344 байта; и дата создания: 22 мая 2019 г.), поданного в этой заявке, включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] В настоящем раскрытии предложены внеклеточные везикулы, *например* экзосомы, обогащенные каркасным белком, ассоциированным с просветной поверхностью внеклеточных везикул, который может быть пригодным в качестве агента для профилактики или лечения рака и других заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] 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.

[0003] Центральной особенностью экзосом является их способность содержать биологически активную полезную нагрузку в своем внутреннем пространстве или просвете. Хорошо известно, что экзосомы содержат эндогенную полезную нагрузку, включая mRNA, miRNA, ДНК, белки, углеводы и липиды, но способность направлять специфическую нагрузку необходимой терапевтической полезной нагрузки в настоящее время ограничена. Экзосомы могут быть загружены путем сверхэкспрессии необходимых терапевтических нагрузок в клетке-продуcente, однако эта загрузка часто имеет ограниченную эффективность вследствие стохастической локализации полезной нагрузки в центрах обработки экзосом клеткой. В качестве альтернативы очищенные экзосомы можно загружать *ex vivo*, например с помощью электропорации. Эти способы могут иметь низкую эффективность или ограничиваться небольшими полезными нагрузками, такими как siRNA. Следовательно, необходимы подходящие способы получения высокоэффективных

и четко определенных загруженных экзосом для лучшего обеспечения терапевтического применения и других путей применения технологий, основанных на экзосомах.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Один аспект настоящего раскрытия относится к новым способам загрузки внеклеточных экзосом (EV), *например* экзосом для терапевтического применения. В частности, в этих способах используются белковые маркеры, которые недавно были идентифицированы из просветной поверхности экзосом. В частности, была идентифицирована группа белков (*например* миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS); миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный 1 (MARCKSL1); и кислый растворимый белок 1 головного мозга (BASP1)), которые являются высокообогатенными на просветной поверхности экзосом. Кроме того, было продемонстрировано, что короткая последовательность аминоконца BASP1, *например* по меньшей мере семь аминокислот, является достаточной для управления высокоэффективной загрузкой молекул флуоресцентного белка в той же степени, что и полноразмерный белок BASP1. Этот фрагмент, состоящий по меньшей мере из семи аминокислот и менее десяти аминокислот, представляет собой значительный прогресс в области загрузки сконструированных EV и обеспечивает эффективную воспроизводимую загрузку любой биологически активной молекулы, *например* полезной нагрузки терапевтического белка, в просвет EV, *например* экзосом, без дополнительных стадий воздействия *ex vivo*. Загрузка EV, *например* экзосом, с использованием слитых белков, описанных в настоящем документе, приводит к образованию сконструированных EV, *например* сконструированных экзосом со значительно более высокими уровнями полезной нагрузки по сравнению с любым другим способом генной инженерии, описанным к настоящему времени.

[0005] Белки и пептидные последовательности, недавно идентифицированные из экзосом, используются в различных вариантах осуществления настоящего раскрытия. Например, некоторые варианты осуществления относятся к получению слитого белка путем конъюгирования EV, *например* экзосомного белка или фрагмента белка (*т.е.*, каркасного белка) и биологически активной молекулы (*например* терапевтически значимого белка), и получения EV, *например* экзосомы, содержащей слитый белок на просветной поверхности EV. Нативный полноразмерный белок или биологически активный фрагмент биологически активной молекулы (*например* терапевтически значимого белка) можно транспортировать на просветную поверхность EV, *например* экзосомы, путем конъюгирования с белками, обогатенными в экзосомах, или белковыми фрагментами.

[0006] Настоящее раскрытие дополнительно относится к получению или применению EV со сконструированным просветом, *например* экзосом со сконструированным просветом, разработанных для более эффективной загрузки или для загрузки биологически активной молекулы (*например* терапевтически значимого белка) в просвет EV, *например* экзосомы. Например, просветная поверхность EV может быть модифицирована, чтобы содержать более высокую концентрацию нативного полноразмерного, *например* экзосомного белка EV и/или фрагмента или модифицированного белка нативной EV, *например* экзосомного белка на просветной поверхности.

[0007] Некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия относятся к клетке-продуценту или способу получения клетки-продуцента для продуцирования таких EV со сконструированным просветом. Экзогенный полинуклеотид может быть временно или стабильно введен в клетку-продуцента для получения EV со сконструированным просветом, *например* экзосомы со сконструированным просветом, из клетки-продуцента.

[0008] Соответственно, в одном аспекте в настоящем раскрытии предложена EV, *например* экзосома, содержащая каркасный белок, при этом по меньшей мере часть каркасного белка экспрессируется из экзогенной последовательности, и каркасный белок представляет собой MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент, вариант, производное или модификацию.

[0009] В некоторых аспектах каркасный белок присутствует в EV, *например* экзосоме, с более высокой плотностью, чем другой каркасный белок в другой EV, *например* экзосоме, при этом другой каркасный белок содержит обычный белок EV, *например* экзосомный белок или его вариант. В некоторых вариантах осуществления обычный EV, *например* экзосомный белок выбирают из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B и их фрагментов.

[0010] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосома, продуцируется из клетки, генетически модифицированной для включения экзогенной последовательности, необязательно при этом клетка представляет собой клетку HEK293.

[0011] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.

[0012] В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' относительно геномной последовательности, кодирующей MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0013] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит слитый белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент, и терапевтический пептид.

[0014] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула содержит терапевтический пептид, выбранный из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтическое соединение) выбирают из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и небольших молекул. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или его модификацию.

[0015] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосома, дополнительно содержит второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосома, дополнительно содержит второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент.

[0016] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептидную последовательность, соответствующую паттерну (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118) или указанному паттерну без N-концевого (M). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или пептид без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или пептид без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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), Ф 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). См. R. Aasland et al., FEBS Letters 513 (2002): 141-144 касательно номенклатуры аминокислот.

[0017] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид любой из SEQ ID NO: 4-110. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) или пептид без N-концевого М, при этом Х представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид SEQ ID NO: 110 или соответствующий пептид без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит пептид SEQ ID NO: 13 или соответствующий пептид без N-концевого (М).

[0018] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит полезную нагрузку, *например* пептид.

[0019] В другом варианте осуществления в настоящем раскрытии предложена фармацевтическая композиция, содержащую EV по настоящему раскрытию, *например* экзосому, и наполнитель.

[0020] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по сути не содержит макромолекул, при этом макромолекулы выбирают из нуклеиновых кислот, экзогенных белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.

[0021] В еще одном варианте осуществления в настоящем раскрытии предложена популяция клеток для продуцирования EV, *например* экзосомы, предложенной в настоящем документе.

[0022] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит экзогенную последовательность, кодирующую каркасный белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно содержит вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно содержит вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент.

[0023] В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, при этом экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют каркасный белок. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность находится в плазмиде.

[0024] В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность кодирует биологически активную молекулу (*например* терапевтический пептид). В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид выбирают из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах осуществления биологически терапевтическое соединение выбирают из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и небольших молекул. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой нанотело. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, используемое в EV по настоящему раскрытию, может представлять собой любую антигенсвязывающую молекулу, известную в данной области техники, включая, *например* альтернативные форматы антител, конъюгаты антиген-лекарственное средство (ADC) или иммунотоксины.

[0025] В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их фрагмент или модификацию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или его 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 каркасный белок дополнительно содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки.

[0028] В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии предложен полипептид для модификации EV, *например* экзосомы, содержащий последовательность

- (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118) или соответствующую последовательность без N-концевого (M);
- (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой

аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu); или

- (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[0029] В некоторых вариантах осуществления полипептид каркаса содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 4-110 или любую из соответствующих последовательностей без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 13 или соответствующую последовательность без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 110 или соответствующую последовательность без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116), при этом X представляет собой любую аминокислоту или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[0030] В одном аспекте в настоящем раскрытии предложена полинуклеотидная конструкция, содержащая кодирующую последовательность, кодирующую полипептид, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность является кодон-оптимизированной.

[0031] В другом аспекте в настоящем раскрытии предложен способ получения сконструированной EV, *например* экзосомы, включающий стадии:

а. введения в клетку конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, содержащий

- (i) первую последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию, и
 - (ii) вторую последовательность, кодирующую полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, такую как терапевтический пептид;
- b. поддержания клетки в условиях, позволяющих клетке экспрессировать слитый полипептид; и
- c. получения сконструированной экзосомы, содержащей слитый полипептид, из указанной клетки.

[0032] 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) или соответствующую последовательность без N-концевого (M);
- (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu); или
- (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[0033] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 4-110 или любую из соответствующих последовательностей без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 13 или соответствующую

последовательность без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 110 или соответствующую последовательность без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) или соответствующую последовательность без N-концевого M, при этом X представляет собой любую аминокислоту.

[0034] В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид присутствует на просветной поверхности сконструированной EV, *например* сконструированной экзосомы, с более высокой плотностью, чем другой каркасный белок в другой EV, *например* экзосоме, при этом другой каркасный белок содержит обычный, *например* экзосомный белок EV или его вариант. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид присутствует с плотностью, которая более чем в 2 раза превышает плотность другого каркасного белка в другой EV, *например* экзосоме.

[0035] В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид присутствует с плотностью, которая более чем в 4 раза, 16 раз, 100 раз, 10000 раз превышает плотность другого каркасного белка в другой EV, *например* экзосоме.

[0036] Настоящее раскрытие направлено на выделенную внеклеточную везикулу (EV), содержащую биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, в которой каркасный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND и ED ассоциированы с просветной поверхностью EV посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд. В некоторых вариантах осуществления ND ассоциирован с просветной поверхностью EV посредством миристоилирования. В других вариантах осуществления ND имеет Gly на N-конце.

[0037] В некоторых вариантах осуществления ED содержит по меньшей мере три Lys, по меньшей мере четыре Lys, по меньшей мере пять Lys, по меньшей мере шесть Lys или по меньшей мере семь Lys. В других вариантах осуществления ED связан с ND с помощью пептидной связи. В некоторых вариантах осуществления ED содержит (Lys)_n, при этом n является целым числом от 1 до 10. В других вариантах осуществления ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию.

[0038] В других вариантах осуществления ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой глицин, представленный как Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; и где X6 представляет собой основную

аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

[0039] В других вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложена выделенная внеклеточная везикула (EV), содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, в которой каркасный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой глицин, представленный Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; где X6 представляет собой основную аминокислоту, и где ED связан с X6 с помощью пептидной связи и содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED. В некоторых вариантах осуществления ED не содержит трансмембранный домен или цитоплазматический домен вируса. В некоторых вариантах осуществления X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В других вариантах осуществления X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met. В некоторых вариантах осуществления X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser.

[0040] В некоторых вариантах осуществления ND каркасного белка содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где

G представляет собой Gly;

«:» представляет собой пептидную связь;

X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;

X3 представляет собой аминокислоту;

X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;

X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и

X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

[0041] В некоторых вариантах осуществления X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0042] В некоторых вариантах осуществления ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или несколько аминокислот.

[0043] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на выделенную внеклеточную везикулу (EV), содержащую биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, в которой каркасный белок содержит ND—ED, при этом:

ND содержит G:X2:X3:X4:X5:X6; где:

G представляет собой Gly;

«:» представляет собой пептидную связь;

X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;

X3 представляет собой аминокислоту;

X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Glu и Met;

X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;

X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His;

«—» представляет собой необязательный линкер, содержащий одну или несколько аминокислот; и

ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), которые связаны с X6 с помощью пептидной связи или одной или нескольких аминокислот, или (ii) по меньшей мере один лизин, который напрямую связан с X6 с помощью пептидной связи.

[0044] В других вариантах осуществления X2 выбран из группы, состоящей из Gly и Ala. В некоторых вариантах осуществления X3 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления X4 представляет собой Leu или Glu. В некоторых вариантах осуществления X5 выбран из группы, состоящей из Ser и Ala. В некоторых вариантах осуществления X6 представляет собой Lys. В других вариантах осуществления X2 представляет собой Gly, Ala или Ser; X3 представляет собой Lys или Glu, X4 представляет собой Leu, Phe, Ser и Glu, X5 представляет собой Ser или Ala; и X6 представляет собой Lys.

[0045] В некоторых вариантах осуществления ND и ED связаны с помощью линкера, содержащего одну или несколько аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию.

[0046] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 157), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 158), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 159), (iv) GGKLAKK (SEQ

ID NO: 160) или (v) любой из комбинации. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 161), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 162), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 163), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 164), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 165), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 166), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 167), (viii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 168) и (ix) любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления длина каркасного белка составляет по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот.

[0047] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 169), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 170), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 171), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 172), (v) GGKLSKKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 173), (vi) GGKLSKKKKKSGGGS (SEQ ID NO: 174), (vii) GGKLSKKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 175), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 176), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 177), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 178) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 179).

[0048] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок не содержит Met на N-конце. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим. В некоторых вариантах

осуществления аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина.

[0049] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или приблизительно 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 (MARKS), SEQ ID NO: 2 (MARCKSL1) или SEQ ID NO: 3 (BASP1).

[0050] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула находится на просветной поверхности или в просвете EV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен находится между доменом ED каркасного белка и биологически активной молекулой. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит экстравазикальный домен. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула связана с экстравазикальным доменом.

[0051] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с биологически активной молекулой с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления домен ND связан с доменом ED с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или несколько аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер.

[0052] В других вариантах осуществления биологически активная молекула содержит белок, полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение, вирус, ионофор, носитель для ионофора, фрагмент, который образует канал или пору, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления белок содержит рекомбинантный пептид, природный пептид, синтетический пептид, антитело, слитый белок или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления белок содержит фермент, цитокин, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, парвовирус, ретровирус, аденовирус или любую их комбинацию.

[0053] В других вариантах осуществления EV дополнительно содержит второй каркасный белок. В некоторых вариантах осуществления второй каркасный белок содержит полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид

IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид переносчика АТФ, полипептид аминопептидазы N (ANPEP), полипептид представителя 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), полипептид неприлизина (MME), полипептид нейропилина-1 (NRP1) или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой ингибитор регулятора отрицательной контрольной точки или ингибитор партнера по связыванию регулятора отрицательной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления регулятор отрицательной контрольной точки выбирают из группы, состоящей из: цитотоксического белка 4, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4), белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), гена 3, активируемого лимфоцитами (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), супрессора Т-клеточной активации V-домена Ig (VISTA), аденозинового рецептора A2a (A2aR), иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой иммуногенный белок.

[0054] В других вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой токсин, анатоксин или нетоксичный мутант токсина. В некоторых вариантах осуществления токсин представляет собой дифтерийный токсин. В некоторых вариантах осуществления анатоксин представляет собой столбнячный анатоксин. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой нетоксичный мутант дифтерийного токсина.

[0055] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления положительная костимулирующая молекула представляет собой представителя суперсемейства рецепторов ФНО. В некоторых вариантах осуществления представителя суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептора Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой представителя суперсемейства ФНО. В некоторых вариантах осуществления представителя суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНО α , ФНО-С, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL,

BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GTR и EDA-2. В некоторых вариантах осуществления положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28. В некоторых вариантах осуществления активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.

[0056] В других вариантах осуществления цитокин выбирают из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-10, IL-12 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления белок содержит Т-клеточный рецептор (TCR), Т-клеточный корецептор, белок главного комплекса гистосовместимости (MHC), лейкоцитарный антиген человека (HLA) или их производное. В некоторых вариантах осуществления белок содержит опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротейна (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE), опухолевого белка p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), лиганда белка программируемой клеточной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, рецептора фолиевой кислоты альфа, CE7R, IL-3, раково-тестикулярного антигена, gp100 MART-1 и апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО.

[0057] В других вариантах осуществления EV представляет собой экзосому.

[0058] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на фармацевтическую композицию, содержащую EV по настоящему раскрытию и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на клетку, которая продуцирует EV по настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на набор, содержащий EV по настоящему раскрытию и инструкции по применению.

[0059] В других вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на способ получения EV, включающий культивирование клетки по настоящему раскрытию в подходящих условиях и получение EV. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к способу заякорения биологически активной молекулы к внеклеточной везикуле, включающему связывание биологически активной молекулы с каркасным белком, раскрываемым в настоящем документе.

[0060] В других вариантах осуществления настоящее раскрытие направлено на способ предупреждения или лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение EV по настоящему раскрытию, при этом заболевание ассоциировано с антигеном. В некоторых вариантах осуществления EV вводят парентерально, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутриопухолево, интраназально, подкожно или внутрибрюшинно.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0061] E1. EV, *например* экзосома, содержащая каркасный белок, при этом по меньшей мере часть каркасного белка экспрессируется из экзогенной последовательности, и каркасный белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию.

[0062] E2. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E1, при этом каркасный белок присутствует в EV, *например* экзосоме, с более высокой плотностью, чем другой каркасный белок в другой EV, *например* экзосоме, при этом другой каркасный белок содержит обычный, *например* экзосомный белок EV или его вариант.

[0063] E3. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E2, при этом обычный белок EV, *например* экзосомный белок, выбирают из группы, состоящей из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента.

[0064] E4. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E3, при этом EV, *например*, экзосома, продуцируется из клетки, генетически модифицированной для включения экзогенной последовательности, необязательно при этом клетка представляет собой клетку HEK293.

[0065] E5. EV, *например* экзосома, по вариантам осуществления E1-E4, при этом клетка содержит плазмиду, содержащую экзогенную последовательность.

[0066] E6. EV, *например* экзосома по вариантам осуществления E1-E5, при этом клетка содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки

[0067] E7. EV, *например* экзосома по вариантам осуществления E1-E6, при этом экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' относительно геномной последовательности, кодирующей MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0068] E8. EV, *например* экзосома по вариантам осуществления E1-E7, при этом экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0069] E9. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E8, при этом каркасный белок представляет собой слитый белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент, и терапевтический пептид.

[0070] E10. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E9, при этом терапевтический пептид выбирают из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.

[0071] E11. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E9, при этом терапевтическое соединение выбирают из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.

[0072] E12. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E9, при этом терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию.

[0073] E13. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E9, при этом терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их фрагмент или модификацию.

[0074] E14. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E9, при этом терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или вариант.

[0075] E15. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E14, дополнительно содержащая второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент.

[0076] E16. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E14, дополнительно содержащая второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент.

[0077] E17. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E16, при этом каркасный белок содержит пептид последовательности (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118) или соответствующую последовательность без N-концевого (M).

[0078] E18. EV, *например* экзосома по любому варианту осуществления E1-E17, при этом каркасный белок содержит пептид последовательности (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[0079] E19. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E18, при этом каркасный белок содержит пептид последовательности (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[0080] E20. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E18 или E19, при этом каркасный белок содержит пептид любой из SEQ ID NO: 4-110 или любую соответствующую последовательность без N-концевого (M).

[0081] E21. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E18 или E19, при этом каркасный белок содержит пептид MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) или соответствующую последовательность без N-концевого M, при этом X представляет собой любую аминокислоту.

[0082] E22. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E20, при этом каркасный белок содержит пептид SEQ ID NO: 110 или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[0083] E23. EV, *например* экзосома по варианту осуществления E20, при этом каркасный белок содержит пептид SEQ ID NO: 13 или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[0084] E24. EV, *например* экзосома по любому из вариантов осуществления E1-E24, при этом каркасный белок дополнительно содержит полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, такую как пептид.

[0085] E25. Фармацевтическая композиция, содержащая EV, *например* экзосому по любому из вариантов осуществления E1-E24, и наполнитель.

[0086] E26. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления E25, по сути не содержащая макромолекул, при этом макромолекулы выбирают из нуклеиновых кислот, экзогенных белков, липидов, углеводов, метаболитов и их комбинации.

[0087] E27. Популяция клеток для продуцирования EV, *например* экзосомы по любому из вариантов осуществления E1-E24.

[0088] E28. Популяция клеток по варианту осуществления E27, содержащая экзогенную последовательность, кодирующую каркасный белок, содержащий MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию.

[0089] E29. Популяция клеток по варианту осуществления E28, дополнительно содержащая вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию.

[0090] E30. Популяция клеток по варианту осуществления E28, дополнительно содержащая вторую экзогенную последовательность, кодирующую второй каркасный белок, при этом второй каркасный белок содержит PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент.

[0091] E31. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления E27-E30, при этом экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, при этом экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют каркасный белок.

[0092] E32. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления E27-E30, при этом экзогенная последовательность находится в плазмиде.

[0093] E33. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления E27-E32, при этом экзогенная последовательность кодирует биологически активную молекулу, *например* терапевтический пептид.

[0094] E34. Популяция клеток по варианту осуществления E33, при этом терапевтический пептид выбирают из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением.

[0095] E35. Популяция клеток по варианту осуществления E33, при этом терапевтическое соединение выбирают из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.

[0096] E36. Популяция клеток по варианту осуществления E33, при этом терапевтический пептид представляет собой антитело или его фрагмент или модификацию.

[0097] E37. Популяция клеток по варианту осуществления E33, при этом терапевтический пептид представляет собой фермент, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их фрагмент или модификацию.

[0098] E38. Популяция клеток по варианту осуществления E33, при этом терапевтический пептид представляет собой антимикробный пептид или его фрагмент или модификацию.

[0099] E39. Популяция клеток по варианту осуществления E28, при этом экзогенная последовательность кодирует нацеливающий фрагмент.

[00100] E40. Популяция клеток по варианту осуществления E39, при этом нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки

[00101] E41. Популяция клеток по вариантам осуществления E29 или E30, при этом второй каркасный белок дополнительно содержит нацеливающий фрагмент.

[00102] E42. Популяция клеток по варианту осуществления E41, при этом нацеливающий фрагмент специфичен для органа, ткани или клетки

[00103] E43. Полипептид для модификации EV, *например* экзосомы, содержащей последовательность

- (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118) или соответствующую последовательность без N-концевого (M);
- (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu); или
- (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[00104] E44. Полипептид по варианту осуществления E43, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-110 или любую из соответствующих последовательностей без N-концевого M.

[00105] E45. Полипептид по варианту осуществления E43, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13 или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[00106] E46. Полипептид по варианту осуществления E43, содержащий последовательность SEQ ID NO: 110 или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[00107] E47. Полипептид по варианту осуществления E43, содержащий последовательность MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) или соответствующую последовательность без N-концевого M, при этом X представляет собой любую аминокислоту.

[00108] E48. Полипептид по любому из вариантов осуществления E43-E47, при этом полипептид сливают с полезной нагрузкой, *например* биологически активной молекулой, такой как пептид.

[00109] E49. Полипептид по варианту осуществления E48, при этом полипептид слит с N-концом пептида.

[00110] E50. Полинуклеотидная конструкция, содержащая кодирующую последовательность, кодирующую полипептид по любому из вариантов осуществления E43-E49.

[00111] E51. Полинуклеотидная конструкция по варианту осуществления E50, при этом кодирующая последовательность является кодон-оптимизированной.

[00112] E52. Способ получения сконструированной EV, *например* экзосомы, содержащий стадии:

- a. введения в клетку конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, содержащей (i) первую последовательность, кодирующую MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент или модификацию, и (ii) вторую последовательность, кодирующую полезную нагрузку, *например*, биологически активную молекулу такой как пептид;
- b. поддержания клетки в условиях позволяющих клетке экспрессировать слитый полипептид; и
- c. получения сконструированной EV, *например* экзосомы, содержащей слитый полипептид, из указанной клетки.

[00113] E53. Способ по варианту осуществления E52, при этом первая последовательность содержит последовательность

- (i) (M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 118) или соответствующую последовательность без N-концевого (M);
- (ii) (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu); или

- (iii) (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или соответствующую последовательность без N-концевого (M), при этом каждое положение в скобках соответствует аминокислоте, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu).

[00114] E54. Способ по любому из вариантов осуществления E52 или E53, при этом первая последовательность содержит SEQ ID NO: 4-110 или любую из соответствующих последовательностей без N-концевого M.

[00115] E55. Способ по варианту осуществления E54, при этом первая последовательность содержит SEQ ID NO: 13 или соответствующую последовательность без N-концевого M

[00116] E56. Способ по варианту осуществления E55, при этом первая последовательность содержит SEQ ID NO: 110 или соответствующую последовательность без N-концевого M.

[00117] E57. Способ по варианту осуществления E53, при этом первая последовательность содержит MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 116) или соответствующую последовательность без N-концевого M, при этом X представляет собой любую аминокислоту.

[00118] E58. Способ по любому из вариантов осуществления E52-E57, при этом слитый полипептид присутствует на просветной поверхности сконструированной EV, *например* экзосомы, с более высокой плотностью, чем другой каркасный белок в другой EV, *например* экзосоме, при этом другой каркасный белок содержит обычный, *например* экзосомный белок EV или его вариант.

[00119] E59. Способ по варианту осуществления E58, при этом слитый полипептид присутствует с плотностью, которая более чем в 2 раза превышает плотность другого каркасного белка в другой EV, *например*, экзосоме.

[00120] E60. Способ по варианту осуществления E59, при этом слитый полипептид присутствует с плотностью, которая более чем в 4 раза, 16 раз, 100 раз, 10000 раз превышает плотность другого каркасного белка в другой EV, *например* экзосоме.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00121] На фигурах изображены различные аспекты настоящего раскрытия только в целях иллюстрации. Специалист в данной области техники легко поймет из последующего обсуждения, что альтернативные структур и способов, проиллюстрированных в настоящем документе, могут использоваться без отклонения от принципов настоящего раскрытия, описанных в настоящем документе.

[00122] На **Фиг. 1A** представлены последовательности слитых белков, содержащих фрагмент BASP1, слитый с меткой FLAG[®] и GFP (SEQ ID NO: 135-142 соответственно в порядке появления). На **Фиг. 1B** изображены результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] для экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих один из слитых белков на Фиг. 1A. Для обеих Фиг. 1A и 1B, положения аминокислот, *например* BASP1, 1-30, относятся к фрагменту BASP-1, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00123] На **Фиг. 2A** изображены последовательности из фрагмента BASP1 (1-30) (SEQ ID NO: 4) и его модификаций (1-30-S6D, 1-30-S6A и 1-30-L5Q), слитых с меткой FLAG[®] и GFP (SEQ ID NO: 143-145 соответственно, в порядке появления).

[00124] На **Фиг. 2B** изображены результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] для экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих один из слитых белков на Фиг. 2A. Для обеих Фиг. 2A и 2B, положения аминокислот, *например* BASP1, 1-30, относятся к фрагменту BASP-1, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00125] На **Фиг. 3** представлено изображение геля с окрашенным COOMASSIE[®] белком с образцами экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих полноразмерные MARCKSL1, BASP1 или аминокислоты 1-30 из MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, при этом все они слиты с FLAG[®]-GFP. Белые стрелки на изображении указывают полосы, соответствующие слитым белкам. Для Фиг. 3, положения аминокислот, *например* BASP1, 1-30, относятся к фрагменту BASP-1, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00126] На **Фиг. 4** изображено выравнивание белковой последовательности 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).

[00127] На **Фиг. 5A** изображены последовательности аминокислот 1-30 BASP1 («BASP1-30») (SEQ ID NO: 4) и слитых белков, содержащих аминокислоты 1-3 MARCKS или его модификации, слитые с доменом PSD MARCKS или его модификацией («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. Положения аминокислот, *например* аминокислот 1-30 BASP1 или аминокислот 1-3 MARCKS, относятся к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00128] На **Фиг. 5B** изображены результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] очищенных экзосом из клеток, стабильно экспрессирующих слитые белки, содержащие аминокислотные последовательности Фиг. 5A и FLAG[®].

[00129] На **Фиг. 6** изображены три разные консенсусные последовательности (все три последовательности представлены SEQ ID NO: 118), полученные в результате функциональных исследований MARCKS, MARCKSL1 и BASP1, и потребности в аминокислотах каждой из последовательностей для загрузки полезной нагрузки в просвет экзосом посредством прикрепления к просветной поверхности.

[00130] На **Фиг. 7A** изображены результаты вестерн-блоттинга общего белка (вверху) и антитела к Cas9 (внизу) нативных экзосом или экзосом, очищенных из клеток, стабильно экспрессирующих Cas9, слитый с аминокислотами 1-10 или 1-30 BASP1, а также уменьшающееся количество рекомбинантного Cas9. Положения аминокислот, *например* аминокислот 1-10 BASP или аминокислот 1-30 BASP1, относятся к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00131] На **Фиг. 7B** на верхней панели изображена стандартная кривая, полученная в результате денситометрии Cas9 на основе результатов вестерн-блоттинга Фиг. 7A. На нижней панели дополнительно представлены количества Cas9, загруженные на каждую очищенную экзосому в виде слитых белков, конъюгированных с 1-30 аминокислотами или 1-10 аминокислотными фрагментами BASP1 (2-30 аминокислот или 2-10 аминокислотных фрагментов BASP1 после процессинга (*т.е.*, отщепления первого Met)), рассчитанные на основе стандартной кривой.

[00132] На **Фиг. 8А** представлены изображения геля с белками экзосом, очищенных из клеток, стабильно трансфицированных конструкцией, экспрессирующей N-концевое слияние BASP1 (аминокислоты 1-10) с овальбумином («BASP1 (1-10) -OVA»), или клеток, стабильно трансфицированных двумя конструкциями, при этом одна экспрессирует N-концевое слияние BASP1 (аминокислоты 1-10) с овальбумином, а другая экспрессирует CD40L, слитый с трансмембранным белком PTGFRN («BASP1 (1-10)-OVA; 3XCD40L-PTGFRN»). На **Фиг. 8А** дополнительно представлено изображение загрузки геля с белка при уменьшении количества рекомбинантного OVA. Нумерация аминокислот, *например*, аминокислот 1-10, относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00133] На **Фиг. 8В** изображены результаты вестерн-блоттинга антитела к овальбумину образцов из **Фиг. 8А**.

[00134] На **Фиг. 8С** изображены результаты вестерн-блоттинга, сравнивающие рекомбинантный овальбумин и овальбумин, слитый с ехoТОРЕ. На **Фиг. 8D** изображена диаграмма экзосомы, содержащей (i) ехoТОРЕ, связанный с овальбумином на просветной стороне экзосомы, и (ii) иммуностимулятор в просвете экзосомы.

[00135] На **Фиг. 9А** изображена последовательность нанотела верблюдовых, направленного против GFP, слитого с аминокислотами 1-10 BASP1 и меткой FLAG[®] (SEQ ID NO: 150). Нумерация аминокислот, *например* аминокислот 1-10 BASP1, относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00136] На **Фиг. 9В** изображен гель с белками и результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] очищенных экзосом из клеток, стабильно экспрессирующих слитый белок из **Фиг. 10А** («BASP1 (1-10)-нанотело») или белок, лишенный последовательности BASP1 («нанотело»). Нумерация аминокислот, *например* BASP1 (1-10)-нанотела, относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00137] На **Фиг. 10** изображена схема системы загрузки mRNA экзосомы, содержащей (i) BASP1 (1-30), слитый 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) mRNA люциферазы, содержащей 3х петли шпильки MS2 («mRNA люциферазы-MS2» или «811»; SEQ ID NO: 115). Нумерация аминокислот, *например* BASP1 (1-30), относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00138] На **Фиг. 11А** изображен гель с белками экзосом, содержащий конструкции загрузки mRNA, описанные на **Фиг. 10**, mRNA люциферазы (811) в комбинации с различными слитыми белками BASP1 (815, 817 или 819).

[00139] На **Фиг. 11В** изображены результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] образцов на **Фиг. 11А**.

[00140] На **Фиг. 12А** изображены результаты RT-qPCR для количества mRNA люциферазы в клетках (сверху) или экзосомах (снизу), содержащих конструкции загрузки mRNA, изображенные на **Фиг. 10**.

[00141] На **Фиг. 12В** изображена таблица количественной оценки количества mRNA люциферазы в очищенных экзосомах из образцов на **Фиг. 12А**, включая кратное обогащение в результате стохастической загрузки mRNA люциферазы.

[00142] На **Фиг. 13** изображены схематические диаграммы тримеров CD40L, слитых с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1, чтобы обеспечить экспонирование на внешней поверхности трансмембранных белков, заякоренных к просветной поверхности экзосомы. Нумерация аминокислот, *например* MARCKS 1-30, MARCKSL1 1-30, BASP1 1-30, BASP1 1-10 ExoTOPE, относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00143] На **Фиг. 14А** изображены результаты активации В-клеток мыши в культурах, инкубированных с экзосомами с поверхностной экспрессией CD40L, слитыми с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1.

[00144] На **Фиг. 14В** изображены результаты активации В-клеток человека в культурах, инкубированных с экзосомами с поверхностной экспрессией CD40L, слитыми с N-концевыми фрагментами MARCKS, MARCKSL1 и BASP1.

[00145] На **Фиг. 14С** изображена диаграмма относительной эффективности для экзосом с различным поверхностным дисплеем CD40L при слиянии с N-концевыми последовательностями MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или полноразмерного PTGFRN. Нумерация аминокислот, *например* BASP1 1-30, относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

[00146] На **Фиг. 15** изображено количество совпадений спектра пептидов (PSM) просветных белков (MARCKS, MARCKSL1 и BASP 1) и обычных белков EV, *например* экзосомных белков (CD81 и CD9), в экзосомах, очищенных из различных клеточных линий различного происхождения (HEK293SF, почки ; HT1080, соединительная ткань; K562,

костный мозг; MDA-MB-231, молочная железа; Raji, лимфобласт; мезенхимальные стволовые клетки (MSC), костный мозг).

[00147] На **Фиг. 16** изображен гель с белками (слева) и результаты вестерн-блоттинга антитела к FLAG[®] (справа) только экзосом, полученных из клеток яичника китайского хомячка (CHO), или из клеток, сверхэкспрессирующих BASP1 или N-концевые фрагменты BASP1 (1-30 или 1-8), слитые с FLAG[®]-GFP. Нумерация аминокислот, *например* BASP1 (1-30), относится к фрагменту, который изначально кодируется генной конструкцией. Первый Met отщепляется во время процессинга.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00148] Настоящее раскрытие направлено на внеклеточные везикулы (EV), *например* экзосомы, содержащие по меньшей мере одну биологически активную молекулу, связанную с EV, *например* экзосомой, посредством каркасного белка, при этом каркасный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND и/или ED ассоциированы с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы, при этом ED содержит (i) лизиновый повтор в ED или (ii) лизиновый повтор при комбинировании с ND, *например*, К на С-конце в ND и К на N-конце в ED, при этом ND и ED связаны напрямую, *т.е.*, с помощью пептидной связи. В настоящем раскрытии также предложено минимальное количество аминокислот, которые способны заякорить полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, на просветной поверхности EV, *например* экзосомы, *например* от семи до 15, от семи до 14, от семи до 13, от семи до 12, от семи до 11, от семи до 10, от семи до 9 или от семи до 8 аминокислотных фрагментов. ND может быть ассоциирован с просветной поверхностью EV, *например* экзосомой, посредством миристоилирования, в то время как ED может быть ассоциирован с просветной поверхностью EV, *например* экзосомой, посредством ионного взаимодействия, *например* посредством притягивающего электростатического взаимодействия. В настоящем раскрытии представлены неограничивающие примеры различных аспектов.

[00149] Прежде чем настоящее раскрытие будет описано более подробно, следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретными описанными композициями или стадиями процессов, поскольку таковые, конечно, могут варьироваться. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого раскрытия, каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других аспектов без отклонения от объема или сущности настоящего раскрытия. Любой изложенный способ

может выполняться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[00150] Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, которые могут быть определены со ссылкой на описание в целом. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология применяется только для описания конкретных аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[00151] Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

I. Определения

[00152] Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем раскрытии. В контексте настоящего документа следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже.

[00153] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или несколько; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Следует также отметить, что в формулу настоящего изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как «исключительно, только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования отрицательного ограничения.

[00154] Кроме того, в контексте настоящего изобретения «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В»; «А» (отдельно)

и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[00155] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по сути из».

[00156] Единицы, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ).

[00157] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. При приведении диапазона значений следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его часть между указанными верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут независимо включаться в этот диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в который включены любой из пределов, ни один из пределов либо оба предела, также охватывается настоящим раскрытием.

[00158] Таким образом, считается, что диапазоны, указанные в настоящем 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.

[00159] Если не указано иное, ссылка на соединение, которое имеет один или несколько стереоцентров, означает каждый стереоизомер и все их комбинации стереоизомеров.

[00160] Если значение указано явно, следует понимать, что значения, которые имеют приблизительно такое же количество или количество, как и указанное значение, также находятся в пределах объема настоящего раскрытия. При раскрытии комбинации, каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и находится в пределах объема настоящего раскрытия. И наоборот, если по отдельности раскрываются различные элементы или группы элементов, также раскрываются их комбинации. Если любой элемент настоящего раскрытия раскрывается как имеющий множество альтернатив, также в настоящем документе раскрываются примеры этого раскрытия, в которых каждая альтернатива исключена по отдельности или в любой комбинации с другими

альтернативами; более чем один элемент настоящего раскрытия может иметь такие исключения, и тем самым раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[00161] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5'- до 3'-конца. Нуклеотиды обозначаются их общеизвестными однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Соответственно, А представляет собой аденин, С представляет собой цитозин, G представляет собой гуанин, Т представляет собой тимин, U представляет собой урацил.

[00162] Аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от amino до карбокси. Аминокислоты обозначаются в настоящем документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[00163] В контексте настоящего документа термин «**приблизительно**» применяется для обозначения примерно, приблизительно, около или в области. Если около термин «приблизительно» применяется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «приблизительно» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[00164] В контексте настоящего документа термин «**примерно**» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично указанному референтному значению. В определенных аспектах термин «примерно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного референтного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[00165] Термины «**введение**», «**осуществление введения**» и их грамматические варианты относятся к введению композиции, такой как EV (*например* экзосома) по настоящему раскрытию, в организм субъекта фармацевтически приемлемым путем. Введение композиции, такой как EV (*например* экзосома) по настоящему раскрытию, в организм субъекта любым подходящим путем, включая внутриопухолево, перорально, пульмонально, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно, или подкожно), ректально, внутрилимфатически, интратекально, периокулярно или местно. Введение включает в себя самовведение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту

выполнять свою предполагаемую функцию. Например, если подходящим путем является внутривенный, композицию вводят путем введения композиции или агента в вену субъекта.

[00166] В контексте настоящего документа термин «**агонист**» относится к молекуле, которая связывается с рецептором и активирует рецептор, вызывая биологический ответ. Рецепторы могут активироваться либо эндогенным, либо экзогенным агонистом. Неограничивающие примеры эндогенных агонистов включают гормоны, нейромедиаторы и циклические динуклеотиды. Неограничивающие примеры экзогенных агонистов включают лекарственные средства, малые молекулы и циклические динуклеотиды. Агонист может представлять собой полный, частичный или обратный агонист.

[00167] В контексте настоящего документа термин «**антагонист**» относится к молекуле, которая блокирует или подавляет опосредованный агонистом ответ, а не сам вызывает биологический ответ при связывании с рецептором. Многие антагонисты достигают своей эффективности за счет конкуренции с эндогенными лигандами или субстратами в структурно определенных сайтах связывания рецепторов. Неограничивающие примеры антагонистов включают альфа-блокаторы, бета-блокаторы и блокаторы кальциевых каналов. Антагонист может представлять собой конкурентный, неконкурентный или внеконкурентный антагонист.

[00168] В контексте настоящего документа термин «**внеклеточная везикула**» или «**EV**» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство (просвет). Внеклеточные везикулы включают все связанные с мембраной везикулы, которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они происходят. Обычно внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 нм до 1000 нм и могут содержать различные полезные нагрузки во внутреннем пространстве (*т.е.*, в просвете), при экспонировании на внешней поверхности или на просветной поверхности внеклеточной везикулы, и/или проходя через мембрану. Полезная нагрузка может содержать *например*, нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В качестве примера и не ограничиваясь этим внеклеточные везикулы включают апоптотические тельца, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым или косвенным воздействием (*например* путем серийной экструзии или обработки щелочными растворами), пузырьковые органеллы и везикулы, продуцируемые живыми клетками (*например*, прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов и/или культивируемых клеток. В некоторых аспектах EV содержит каркасный белок, раскрываемый в настоящем документе.

[00169] В контексте настоящего изобретения термин «**экзосома**» относится к полученной из клетки небольшой (от 20 до 300 нм в диаметре, более предпочтительно от 40 до 200 нм в диаметре) внеклеточной везикуле (EV), содержащей мембрану, которая окружает внутреннее пространство (просвет), и которая, в некоторых аспектах, создается из клетки (*например* клетки-продуцента), например, путем прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или путем слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. Экзосома представляет собой разновидность внеклеточной везикулы (EV). В некоторых аспектах экзосома содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например* биологически активную молекулу, такую как 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. В некоторых аспектах экзосома содержит каркасный белок по настоящему раскрытию. В некоторых аспектах экзосомы по настоящему раскрытию продуцируются клетками, которые экспрессируют один или несколько трансгенных продуктов.

[00170] В контексте настоящего документа термин «**экзосомный просветный белок**» относится к каркасному белку, *т.е.*, белку, прикрепленному к просветной поверхности EV, *например* экзосомы, или ассоциированному с ней, такому как MARCKS, MARKSL1, BASP1 или их любому функциональному фрагменту, их любому варианту, их любому производному или их любой комбинации, и который подходит для применения в качестве каркаса для нацеливания полезной нагрузки, *например* биологически активной молекулы (*например* терапевтических белков) на просветную поверхность EV, *например* экзосом.

[00171] В контексте настоящего документа термин «**нановезикула**» относится к небольшой (диаметром от 20 до 250 нм, *например* от 30 до 150 нм) клеточной везикуле, содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая образуется из клетки (*например* клетки-продуцента) путем прямого или косвенного воздействия, так что нановезикула не будет продуцирована указанной клеткой-продуцентом без указанного воздействия. Соответствующие воздействия на клетку-продуцента для получения нановезикул включают, но не ограничиваясь ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. Получение нановезикул в некоторых случаях может приводить к разрушению клетки-продуцента. В некоторых аспектах популяции нановезикул, описанные в настоящем документе, по сути

не содержат везикул, которые происходят из клеток-продуцентов путем прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В некоторых аспектах нановезикула содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например* терапевтический агент), приемник (*например* нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (*например* нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (*например* простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Сразу после получения нановезикулы из клетки-продуцента в соответствии с воздействиями, она может быть выделена из клетки-продуцента на основе своего размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В некоторых аспектах нановезикула содержит каркасный белок, раскрываемый в настоящем документе.

[00172] В контексте настоящего документа термин «**EV со сконструированным просветом**» относится к EV, *например* экзосоме с просветной поверхностью мембраны или просвету EV, *например* экзосоме, модифицированной по своему составу, так что просветная поверхность или просвет сконструированной EV, *например* экзосомы, отличается от таковой EV, *например* экзосомы, до модификации, или встречающейся в природе EV, *например* экзосомы.

[00173] Конструирование может происходить непосредственно в просвете (*т.е.*, пустоте внутри EV) или в мембране EV (*например* экзосоме), в частности, на просветной поверхности EV, так что просвет и/или просветная поверхность EV, *например* экзосомы, изменяется. Например, мембрана модифицирована по своему составу белка, липида, малой молекулы, углевода и *т.д.*, так что просветная поверхность EV, *например* экзосомы, модифицируется. Аналогичным образом можно изменить содержимое просвета. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной путем генной инженерии. В некоторых аспектах EV со сконструированным просветом, *например* экзосома со сконструированным просветом, содержит экзогенный белок (*т.е.*, белок, который EV, *например* экзосома, не экспрессирует в естественных условиях) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на просветной поверхности или просвета EV, *например* экзосомы, или может представлять собой точку заякорения (прикрепления) для фрагмента, экспонированного на внутреннем слое EV, *например* экзосомы. В других аспектах EV со сконструированным просветом, *например* экзосома со сконструированным просветом, включает более высокую экспрессию природного белка EV, *например* белка экзосомы

(например каркасного белка) или его фрагмента или варианта, которые могут экспонироваться в просвете EV, например экзосомы, или могут представлять собой точку заякорения (прикрепления) для фрагмента, экспонированного на просветной поверхности EV, например экзосомы.

[00174] В контексте настоящего документа термин «**EV со сконструированной поверхностью**» относится к EV с внешней поверхностью EV, модифицированной в своем составе, так что внешняя поверхность сконструированной EV отличается от таковой EV до модификации или встречающейся в природе EV.

[00175] В контексте настоящего документе термин «**экзосома со сконструированной поверхностью**» относится к экзосоме с внешней поверхностью экзосомы, модифицированной в своем составе, так что внешняя поверхность сконструированной экзосомы отличается от таковой экзосомы до модификации или встречающейся в природе экзосомы.

[00176] Термин «**модифицированный**» при использовании в контексте EV, например экзосом, описанных в настоящем документе, относится к изменению или конструированию EV, например экзосомы и/или ее клетки-производителя, так что модифицированная EV, например экзосома, отличается от встречающейся в природе EV, например экзосомы. В некоторых аспектах модифицированная EV, например экзосома, описанная в настоящем документе, содержит мембрану, которая отличается по составу белка, липида, малой молекулы, углевода и т.д. по сравнению с мембраной встречающейся в природе EV, например экзосомы. Например, мембрана содержит более высокую плотность или количество природных белков EV, например белков экзосомы, и/или мембрана содержит белки, которые в природе не встречаются в EV, например экзосомах. В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют внешнюю поверхность EV, например экзосомы (например EV со сконструированной поверхностью и экзосом, описанных в настоящем документе). В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют просветную поверхность EV, например экзосомы (например EV со сконструированным просветом и экзосом, описанных в настоящем документе).

[00177] Например, просвет изменен по своему составу белка, липида, малой молекулы, углевода и т.д. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной с помощью генной инженерии.

[00178] В контексте настоящего документа термин «**модификация**» белка, *например*, как в терминах «модифицированный белок» или «модификация белка» или их грамматических вариантах 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. В некоторых аспектах модифицированный белок сохраняет по меньшей мере одну физиологическую функцию немодифицированного белка.

[00179] В контексте настоящего документа термин «**фрагмент**» белка (*например* биологически активной молекулы, такой как терапевтический белок, или каркасный белок, раскрываемый в настоящем документе) относится к белку, который является более коротким, чем встречающаяся в природе последовательность, *например* с N- и/или C-концевой делецией по сравнению с встречающимся в природе белком.

[00180] В контексте настоящего документа термин «**функциональный фрагмент**» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка, описанного в настоящем документе, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, сохраняет способность заякорять биологически активную молекулу на просветной поверхности EV, *например* экзосомы.

[00181] Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом в данном смысле, можно выполнить любыми известными в данной области техники способами определения содержания белка EV, *например* экзосом, включая вестерн-блоты, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, *например*, такими как GFP. В определенном аспекте фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 сохраняет, *например* по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99%, или по меньшей мере около 100% способность встречающихся в природе MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 заякорять полужную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, на просветной или на внешней поверхности EV, *например* экзосомы. В определенном аспекте способность варианта MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагмента MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% способность MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 соответственно заякорять полезную нагрузку, *например*

биологически активную молекулу, на просветной или на внешней поверхности EV, *например* экзосомы. Эту способность можно оценить, например, флуоресцентно меченными вариантами в анализах, описанных в экспериментальном разделе.

[00182] Термин «**производное**» в контексте настоящего документа относится к EV, *например* экзосоме, компоненту (*например* белку или липиду), каркасному белку по настоящему раскрытию или полезной нагрузке, *например* биологически активной молекуле (*например* полипептиду, полинуклеотиду, липиду, углеводу, антителу или их фрагменту), который был химически или ферментативно модифицирован.

[00183] В контексте настоящего документа термин «**вариант**» белка относится к белку, который имеет определенную структурную (*например* идентичность аминокислотной последовательности) и функциональную идентичность с другим белком при сравнении (*например* путем выравнивания последовательностей) с помощью способа, известного в данной области техники. Например, вариант белка может включать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки считывания или перестройку в другом белке. В некоторых аспектах вариант белка сохраняет по меньшей мере одну физиологическую функцию невариантного белка.

[00184] В конкретном аспекте вариант представляет собой вариантный белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность с полноразмерными зрелыми MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагментом MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[00185] В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов MARCKS составляют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичность последовательности с MARCKS в соответствии с SEQ ID NO: 1 или с его функциональным фрагментом, как определено, *например*, путем попарного выравнивания с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша.

[00186] В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов MARCKSL1 составляют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичность последовательности с MARCKSL1 в соответствии с SEQ ID NO: 2 или с его функциональным фрагментом, как определено, *например*, путем попарного выравнивания с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша.

[00187] В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов BASP1 составляют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере

около 95% или по меньшей мере около 99% идентичность последовательности с BASP1 в соответствии с SEQ ID NO: 3 или с его функциональным фрагментом, как определено, *например*, путем попарного выравнивания с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша.

[00188] В некоторых аспектах вариант каркасного белка (*например* MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), функциональный фрагмент каркасного белка или вариант функционального фрагмента каркасного белка представляет собой производное.

[00189] В каждом из вышеуказанных случаев вариант или вариант фрагмента каркасного белка (*например* вариант MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP1) сохраняет способность заякорять полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу на просветной или на внешней поверхности EV, *например* экзосомы.

[00190] Упоминание любого белка, представленного в настоящем документе, охватывает функциональный вариант белка. Термин «**функциональный вариант**» белка относится к варианту белка, который сохраняет способность заякорять биологически активную молекулу на просветной или на внешней поверхности EV, *например* экзосомы. В определенном аспекте способность функционального варианта MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагмента MARCKS, MARCKSL1 или BASP1 составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% способность MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 соответственно заякорять полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, на просветной или на внешней поверхности EV, *например* экзосомы.

[00191] Встречающиеся в природе варианты называются «**аллельными вариантами**» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего данный локус в хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьироваться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в настоящее раскрытие. В качестве альтернативы не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с помощью методик мутагенеза или прямым синтезом.

[00192] Используя известные способы белковой инженерии и технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или несколько аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В работе Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, сообщается о

вариантах белков KGF, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Аналогично гамма-интерферон проявлял в десять раз более высокую активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков с карбоксиконца этого белка. (Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.)

[00193] Более того, имеется множество свидетельств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, аналогичную активности встречающегося в природе белка. Например, в работе Gayle и сотрудников (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) проведен обширный мутационный анализ человеческого цитокина IL-1a. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a, в которых в среднем изменяли 2,5 аминокислоты на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации были исследованы во всех возможных положениях аминокислот. Исследователи обнаружили, что «[основная часть] молекулы может быть изменена с небольшим влиянием на [связывание или биологическую активность]». (См. Реферат). Фактически, только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей продуцировали белок, который значительно отличался по активности от белка дикого типа.

[00194] Как указано выше, варианты или производные включают, *например*, модифицированные полипептиды. В некоторых аспектах варианты или производные, *например* полипептидов, полинуклеотидов, липидов, гликопротеинов, являются результатом химической модификации и/или эндогенной модификации. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in vivo*. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in vitro*. В других аспектах вариант или производные являются результатом внутриклеточной модификации в клетках-продуцентах.

[00195] Модификации, присутствующие в вариантах и производных, включают, *например* ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилирование, иодирование,

миристоилирование, окисление, пегилирование (работа Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например аргинилирование и убиквитинирование.

[00196] Термин «**аминокислотная замена**» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или референтной последовательности (*например* последовательности дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или референтной последовательности (*например* в последовательности полипептида дикого типа), например, с помощью химического пептидного синтеза или рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. В некоторых аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, которая присутствует в природе или изначально в положении n, и Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замен могут быть описаны в соответствии со схемой An (YZ), при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y и Z представляют собой альтернативные заменяющие аминокислотные остатки, которые могут заменить A.

[0002] В контексте настоящего документе термин «**антитело**» охватывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью полученный синтетическим путем, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, гомологичный связывающему домену иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывается и распознает антиген. Подразумевается, что использование термина «антитело» включает полные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и, кроме того, включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например* scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', and F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или

функцию. В некоторых аспектах настоящего раскрытия полезная нагрузка представляет собой биологически активную молекулу, представляющую собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антитело (*например* биологически активная молекула по настоящему раскрытию) представляет собой нанотело.

[0003] Термины «**конъюгат антитело-лекарственное средство**» и «**ADC**» используются взаимозаменяемо и относятся к антителу, связанному, *например*, ковалентно с терапевтическим агентом (иногда называемым в настоящем документе агентом, лекарственным средством или активным фармацевтическим ингредиентом) или агентами. В некоторых аспектах настоящего раскрытия полезная нагрузка представляет собой биологически активную молекулу, представляющую собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0004] «**Консервативная аминокислотная замена**» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменяется другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0005] В контексте настоящего документе термин «**консервативный**» относится к нуклеотидами или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности соответственно, которые встречаются неизменными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются сравнительно консервативными, представляют собой такие, которые консервативны в наиболее родственных последовательностях по сравнению с нуклеотидами или аминокислотами, встречающимися в других местах в последовательности.

[0006] В некоторых аспектах две или более последовательности являются **«полностью консервативными»** или **«идентичными»**, если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются **«высококонсервативными»**, если они на по меньшей мере 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу.

[0007] В некоторых аспектах две или более последовательности являются **«высококонсервативными»**, если они на приблизительно 70% идентичны, приблизительно 80% идентичны, приблизительно 90% идентичны, приблизительно 95% идентичны, приблизительно 98% идентичны или приблизительно 99% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются **«консервативными»**, если они на по меньшей мере 30% идентичны, по меньшей мере 40% идентичны, по меньшей мере 50% идентичны, по меньшей мере 60% идентичны, по меньшей мере 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются **«консервативными»**, если они на приблизительно 30% идентичны, приблизительно 40% идентичны, приблизительно 50% идентичны, приблизительно 60% идентичны, приблизительно 70% идентичны, приблизительно 80% идентичны, приблизительно 90% идентичны, приблизительно 95% идентичны, приблизительно 98% идентичны или приблизительно 99% идентичны друг другу. Консервативность последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или характеристике.

[0008] В контексте настоящего документа термин **«гомология»** относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например* между молекулами нуклеиновой кислоты (*например* молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Обычно термин «гомология» подразумевает эволюционные отношения между двумя молекулами. Таким образом, две гомологичные молекулы будут иметь общего эволюционного предка. В контексте настоящего раскрытия термин «гомология» охватывает как идентичность, так и сходство.

[0009] В некоторых аспектах полимерные молекулы считаются **«гомологичными»** друг другу, если по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% мономеров в молекуле идентичны (точно такой же мономер) или подобны (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[0010] В контексте настоящего раскрытия замены (даже если они называются аминокислотными заменами) осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты, *т.е.*, замена аминокислотного остатка на альтернативный аминокислотный остаток осуществляется путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту, кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[0011] В контексте настоящего документа термин «**идентичность**» относится к общей консервативности мономера между полимерными молекулами, *например* между молекулами полипептидов или молекулами полинуклеотидов (*например* молекулами ДНК и/или молекулами РНК). Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных определителей, *например* белок А идентичен белку В, подразумевает, что последовательности идентичны на 100% (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, *например*, на «70% идентичные» эквивалентно описанию их как имеющих, *например* «70% идентичность последовательностей».

[0012] Например, вычисление процентной идентичности двух полипептидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (*например*, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй полипептидных последовательностей для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В определенных аспектах длина выравниваемой последовательности для сравнительных целей составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от длины референтной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих аминокислотных положениях.

[0013] Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма.

[00197] 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). Средство поиска основного локального выравнивания NCBI (BLAST) [Altschul 20 et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990)] доступно из нескольких источников, включая Национальный центр биологической информации (NCBI, Бетесда, Мэриленд), и в Интернете для использования в связи с программами анализа последовательностей blastp, blastn, 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 НИИ (Национальный институт здравоохранения).

[0014] Другими подходящими программами являются, *например* Needle, Stretcher, Water или Matcher, часть пакета программ биоинформатики EMBOSS, которые также доступны в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa. Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[0015] Каждая из различных областей в одной полинуклеотидной или полипептидной целевой последовательности, которая выравнивается с полинуклеотидной или полипептидной референтной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[0016] В некоторых аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) к второй аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) рассчитывается как $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков (или азотистых оснований), оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании путем визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности к второй

последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности к первой последовательности.

[0017] Специалисту в данной области техники будет понятно, что получение выравнивания последовательностей для вычисления процента идентичности последовательностей не ограничивается сравнениями бинарных последовательностей, обусловленными исключительно данными первичной последовательности. Также будет понятно, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательностей с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (*например* кристаллографические структуры белков), функциональные данные (*например* местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, *например*, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, может быть проведено автоматически или вручную.

[0018] В контексте настоящего документа термин «сходство» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например* между полинуклеотидными молекулами (*например* молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Расчет процентного сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как и расчет процентной идентичности, за исключением того, что при расчете процентного сходства учитываются консервативные замены, как понимается в данной области техники. Понятно, что процент сходства зависит от используемой шкалы сравнения, *т.е.*, от того, сравниваются ли аминокислоты, *например*, в соответствии с их эволюционной близостью, зарядом, объемом, гибкостью, полярностью, гидрофобностью, ароматичностью, изоэлектрической точкой, антигенностью или их комбинациями.

[00198] В контексте настоящего документа термин «клетка-продуцент» относится к клетке, используемой для создания EV, *например* экзосомы. Клетка-продуцент может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro*, или клетку *in vivo*. Клетка-продуцент включает, но не ограничиваясь ими, клетку, которая, как известно, эффективна в создании EV, *например* экзосом, *например* клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) и мезенхимальные стволовые клетки (MSC), клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, клетки RPTEC/TERT1. В определенных аспектах клетка-продуцент не является

антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, В-клеткой, тучной клеткой, макрофагом, нейтрофилом, клеткой Купфера-Бровича, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

[00199] В контексте настоящего документе термины «**выделить**», «**выделенный**» и «**выделение**» или «**очищать**», «**очищенный**» и «**очищение**», а также «**извлеченный**» и «**извлекать**» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию приготовления (*например*, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных EV, *например* экзосом, которые прошли один или несколько процессов очистки, *например*, отбор или обогащение желаемого препарата EV, *например* экзосомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выделение или очистка, используемые в настоящем документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) EV, *например* экзосом, из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления композиция выделенной EV, *например* экзосомы не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, в качестве альтернативы, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества.

[00200] В других вариантах осуществления композиция выделенной EV, *например* экзосомы имеет количество и/или концентрацию желаемых EV, *например* экзосом в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других аспектах композиция выделенной EV, *например* экзосомы, обогащена по сравнению с исходным материалом (*например*, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,9%, по меньшей мере около 99,99%, по меньшей мере около 99,999%, по меньшей мере около 99,9999% или более чем приблизительно 99,9999% по сравнению с исходным материалом.

[00201] В некоторых аспектах препараты выделенной EV, *например* экзосомы, по сути не содержат остаточных биологических продуктов (*например* контаминантов). В некоторых аспектах препараты выделенной EV, *например* экзосомы, на приблизительно 100%, на по меньшей мере около 99%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 94%, на по меньшей мере около 93%, на по меньшей мере около 92%, на по меньшей мере около 91% или на по меньшей мере около 90% не содержат какого-либо контаминирующего биологического материала. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. В определенных аспектах препараты выделенной EV, *например* экзосомы, на приблизительно 100%, на по меньшей мере около 99%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 94%, на по меньшей мере около 93%, на по меньшей мере около 92%, на по меньшей мере около 91% или на по меньшей мере около 90% не содержат каких-либо макромолекул, *например* каких-либо нуклеиновых кислот, белков, липидов и/или углеводов. Термин «по сути не содержащий остаточных биологических продуктов» может также означать, что EV, *например* экзосомы, не содержит обнаружимых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только EV, *например* экзосомы.

[00202] Термин «**наполнитель**» или «**носитель**» относится к инертному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Термины «**фармацевтически приемлемый носитель**» или «**фармацевтически приемлемый наполнитель**» и их грамматические варианты охватывают все агенты, 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 пригодны при приготовлении фармацевтической композиции и обычно безопасны, нетоксичны и желательны.

[0019] В контексте настоящего документа термин «**полезная нагрузка**» относится к любой молекуле, которая может быть заякорена к каркасу по настоящему раскрытию и впоследствии заякорена к мембране EV, *например* экзосоме, по настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка прикреплена к просветной поверхности мембраны EV, *например* экзосомы. Термин полезная нагрузка охватывает биологически активные молекулы, *например* молекулы, которые могут оказывать

терапевтический и/или профилактический эффект, а также диагностические молекулы. Соответственно, термин полезная нагрузка также включает обнаруживаемые фрагменты, такие как радионуклиды, флуоресцентные молекулы, контрастные агенты, метки или молекулярные объекты, которые могут быть распознаны обнаруживаемым фрагментом, например лигандами или метками.

[0020] В контексте настоящего документа термин «полезная нагрузка» эквивалентен термину «груз» и взаимозаменяем с ним. Соответственно, термины «белок груза» или «пептид груза» относятся к конкретным типам молекул полезной нагрузки (белок и пептиды, соответственно), прикрепленным к каркасу по настоящему раскрытию.

[0021] Термин «**биологически активная молекула**» в контексте настоящего описания относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к EV, *например* экзосоме, посредством каркаса по настоящему раскрытию, при этом молекула может оказывать терапевтический или профилактический эффект у субъекта, нуждающегося в этом, или влиять на гомеостаз клетки или ткани у субъекта. Неограничивающие примеры биологически активных молекул, которые могут быть введены в EV, *например* в экзосому и/или клетку-продуцента, включают, *например* терапевтические агенты, такие как нуклеотиды (*например* нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например* молекулы ДНК или mRNA, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как miRNA, dsDNA, lncRNA и siRNA), аминокислоты (*например* аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или который нарушают трансляцию), полипептиды (*например* ферменты или антитела), липиды, углеводы, вирусы и вирусные частицы (*например* аденоассоциированные вирусы и вирусные частицы, ретровирусы, аденовирусы и т.д.) и малые молекулы (*например* лекарственные средства и токсины на основе малых молекул), включая агонисты STING на основе малых молекул, включая циклические динуклеотиды, такие как ML-RR S2 и 3'-3' cAIMPdFSH). В определенных аспектах полезная нагрузка содержит антиген. В определенных аспектах биологически активная молекула, *например* терапевтический агент, *например* терапевтический агент для применения у человека, сохраняет биологическую функцию, *например* терапевтическую функцию, при слиянии с каркасным белком, раскрываемым в настоящем документе. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 5 аминокислот, по меньшей мере 6 аминокислот, по меньшей мере 7 аминокислот, по меньшей мере 8 аминокислот, по меньшей мере 9 аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30

аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 55 аминокислот, по меньшей мере 60 аминокислот, по меньшей мере 65 аминокислот, по меньшей мере 70 аминокислот, по меньшей мере 75 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, по меньшей мере 150 аминокислот, по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 250 аминокислот, по меньшей мере 300 аминокислот, по меньшей мере 350 аминокислот, по меньшей мере 400 аминокислот или по меньшей мере 500 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 5 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 10 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 50 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 100 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 5 аминокислот, *например* 5-500, 5-450, 5-400, 5-350, 5-300, 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-90, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 5-30, 5-20, 5-15 или 5-10 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 10 аминокислот, *например* 10-500, 10-450, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20 или 10-15 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 50 аминокислот, *например* 50-500, 50-450, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100, 50-90, 50-80, 50-50 или 50-60 аминокислот. В некоторых аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере 100 аминокислот, *например* 100-500, 100-450, 100-400, 100-350, 100-300, 100-250, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других аспектах биологически активная молекула может иметь по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140, по меньшей мере 150, по меньшей мере 160, по меньшей мере 170, по меньшей мере 180, по меньшей мере 190, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400 или по меньшей мере 500 нуклеотидов. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере два нуклеотида, *например* 2-1000, 2-900, 2-500, 2-300 или 2-50. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 10 нуклеотидов,

например 10-1000, 10-900, 10-500, 10-300 или 10-50. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 15 нуклеотидов, например 15-1000, 15-900, 15-500, 15-300 или 15-50. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 20 нуклеотидов, например 20-1000, 20-900, 20-500, 20-300 или 20-50. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 50 нуклеотидов, например 50-1000, 50-900, 50-500, 50-300 или 50-100. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 100 нуклеотидов, например 100-10000, 100-9000, 100-5005, 100-3000 или 100-500. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 200 нуклеотидов, например 200-10000, 200-9000, 200-5000, 200-3000 или 200-500. В других аспектах биологически активная молекула имеет по меньшей мере 500 нуклеотидов, например 500-10000, 500-9000, 500-5000 или 500-3000. В контексте настоящего документа термин «**антиген**» относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает у него иммунный ответ (клеточный или гуморальный). В некоторых аспектах молекулы полезной нагрузки ковалентно связаны с EV, *например* экзосомой. В других аспектах полезная нагрузка содержит адъювант.

[0022] «**Рекомбинантный**» полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученному с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессируемые в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего раскрытия, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были разделены, фракционированы или частично или по сути очищены с помощью любой подходящей методики. Полипептиды, раскрываемые в настоящем документе, могут быть получены рекомбинантным путем с использованием способов, известных в данной области техники. В качестве альтернативы белки и пептиды, раскрываемые в настоящем документе, могут быть синтезированы химическим путем. В некоторых аспектах настоящего раскрытия каркасный белки, присутствующие в EV, *например* экзосомах, получают рекомбинантным путем с помощью сверхэкспрессии каркасных белков в клетках-продуцентах, так что уровни каркасных белков в полученных EV, *например* экзосомах, значительно увеличиваются по сравнению с уровнями каркасных белков, присутствующих в EV, *например* экзосомах, клеток-продуцентов, не сверхэкспрессирующих такие каркасные белки.

[00203] В контексте настоящего документа термины «**якорь**» или «**заякоривание**» биологически активной молекулы на просветной или внешней поверхности EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию посредством каркасного белка относятся к ковалентному присоединению биологически активной молекулы к части каркасной

молекулы, расположенной на просветной или внешней поверхности EV (*например* экзосомы) соответственно.

[00204] Термины «ассоциированный», «ассоциация» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к первому фрагменту, *например* первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второму фрагменту, *например* второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности соответственно. Первый фрагмент может быть непосредственно присоединен или расположен рядом со вторым фрагментом, или в качестве альтернативы промежуточный фрагмент может ковалентно присоединять первый фрагмент ко второму фрагменту. В некоторых вариантах осуществления термин «ассоциированный» включает миристоилирование, ионное взаимодействие или любую их комбинацию.

[00205] Термин «связанный» или «слитый» в контексте настоящего описания относится к слиянию первого фрагмента со вторым фрагментом на С-конце или N-конце с помощью пептидной связи или с помощью линкера из одной или нескольких аминокислот. Термин «связанный» или «слитый» также включает вставку всего первого фрагмента (или второго фрагмента), *например*, между любыми двумя точками, *например*, аминокислотами, во втором фрагменте (или первом фрагменте, соответственно). В одном аспекте первый фрагмент связан со вторым фрагментом с помощью пептидной связи или линкера. Первый фрагмент может быть связан со вторым фрагментом с помощью фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей), или нуклеотид или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей), или любой химический фрагмент (для полипептидных или полинуклеотидных цепей или любых химических молекул). Термин «связанный» также может быть обозначен дефисом (-). В некоторых аспектах каркасный белок на EV, *например* экзосоме, может быть связан или слит с полезной нагрузкой, *например* с биологически активной молекулой.

[00206] В контексте настоящего документа термин «субъект-млекопитающее» включает всех млекопитающих, включая людей, домашних животных (*например* собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (*например* коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (*например* обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т.п.).

[00207] Термины «индивидуум», «субъект, хозяин» и «пациент» и их варианты используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого требуется диагностика, лечение или терапия, в частности, человеку. Способы, описанные в настоящем документе, применимы как для лечения

человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых аспектах субъект представляет собой млекопитающее, и в других аспектах субъект представляет собой человека.

[00208] В контексте настоящего документа термин **«по сути не содержит»** означает, что образец, содержащий EV, *например* экзосомы, содержит менее 10% макромолекул, *например* контаминантов, в процентной концентрации масса/объем (масс./об.). Некоторые фракции могут содержать менее чем приблизительно 0,001%, менее чем приблизительно 0,01%, менее чем приблизительно 0,05%, менее чем приблизительно 0,1%, менее чем приблизительно 0,2%, менее чем приблизительно 0,3 %, менее чем приблизительно 0,4%, менее чем приблизительно 0,5%, менее чем приблизительно 0,6%, менее чем приблизительно 0,7%, менее чем приблизительно 0,8%, менее чем приблизительно 0,9%, менее чем приблизительно 1%, менее чем приблизительно 2%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 6%, менее чем приблизительно 7%, менее чем приблизительно 8%, менее чем приблизительно 9% или менее чем приблизительно 10% (масс./об.) макромолекул.

[00209] В контексте настоящего документа термин **«макромолекула»** означает нуклеиновые кислоты, экзогенная белки, липиды, углеводы, метаболиты (например, полимерные метаболиты) или их комбинации.

[00210] В контексте настоящего документа термин **«обычный белок EV»** означает белок, о котором ранее было известно, что он обогащен в EV.

[00211] В контексте настоящего документа термин **«обычный белок EV, например экзосомный белок»** означает белок, ранее известный как обогащенный в экзосомах, включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним. Во избежание сомнений, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент или вариант не являются обычными белками EV, *например* экзосомными белками.

[00212] В контексте настоящего документа термин **«фармацевтическая композиция»** относится к одному или нескольким соединениям, описанным в настоящем документе, таким как, *например* EV, такая как экзосома по настоящему раскрытию, смешанная или перемешанная с одним или несколькими другими химическими компонентами или суспендированная в них, такими как фармацевтически приемлемые носители и наполнители. Одна из целей фармацевтической композиции состоит в том, чтобы облегчить введение субъекту препаратов EV, *например* экзосом.

[00213] В контексте настоящего документа термин **«полинуклеотид»** относится к полимерам нуклеотидов любой длины, включая рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды,

их аналоги или их смеси. Этот термин относится к первичной структуре молекулы. Таким образом, термин включает трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту («ДНК»), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту («РНК»). Он также включает модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термин «полинуклеотид» включает полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезоксид-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), включая tRNA, rRNA, hRNA, siRNA и mRNA, сплайсированные или несплайсированные, любой другой тип полинуклеотида, который представляет собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие нормуклеотидные скелеты, например полиамид (*например* пептидные нуклеиновые кислоты «PNA») и полиморфоинополимеры, а также другие синтетические полимеры нуклеиновых кислот, специфичные для последовательности при условии, что полимеры содержат нуклеиновые основания в конфигурации, которая допускает спаривание оснований и стэкинг оснований, как встречается в ДНК и РНК. В определенных аспектах полинуклеотид содержит mRNA. В другом аспекте mRNA представляет собой синтетическую mRNA. В некоторых аспектах синтетическая mRNA содержит по меньшей мере одно неприродное нуклеиновое основание. В некоторых аспектах все нуклеиновые основания определенного класса были заменены неприродными нуклеиновыми основаниями (*например* все уридины в полинуклеотиде, раскрываемом в настоящем документе, могут быть заменены неприродным нуклеиновым основанием, *например* 5-метоксиуридином). В некоторых аспектах настоящего раскрытия биологически активная молекула представляет собой полинуклеотид.

[00214] Термины «**полипептид**», «**пептид**» и «**белок**» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Указанные термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или искусственно; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие воздействия или модификации, такие как конъюгация с метящим компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты, такие как гомоцистеин, орнитин, п-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а также другие модификации, известные в данной области техники. В некоторых аспектах настоящего раскрытия полезная нагрузка, *например* биологически активная молекула, присоединенная к EV,

например экзосоме, представляет собой полипептид, *например* антитело или его производное, такое как ADC, PROTAC, токсин, слитый белок или фермент.

[00215] Термин «**полипептид**» в контексте настоящего документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой одну полипептид или может представлять собой мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. Чаще всего дисульфидные связи обнаруживаются в многоцепочечных полипептидах. Термин «полипептид» также может применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. В некоторых аспектах «пептид» может иметь менее или равную 50 аминокислотам, *например* приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. В некоторых аспектах длина «пептида» может составлять по меньшей мере от приблизительно 2 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 3 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 4 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 5 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 10 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 15 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 20 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 25 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 30 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 35 до приблизительно 50, по меньшей мере от приблизительно 40 до приблизительно 50 или по меньшей мере от приблизительно 45 до приблизительно 50 аминокислот.

[00216] В контексте настоящего документа термин «**каркасный белок по настоящему раскрытию**» или его грамматические варианты относится к

- (i) белку (экспрессируемому естественным путем, синтезируемый химическим или ферментативным путем или продуцируемому рекомбинантно), который располагается на просветной поверхности EV, *например* экзосом, такому как MARCKS, MARKSL1 или BASP1;
- (ii) любому функциональному фрагменту (i);
- (iii) любому функциональному фрагменту (i)-(ii);
- (iv) любому производному (i)-(iii);

- (v) любому пептиду, соответствующему домену, или их комбинации, полученной из белка в (i), который может связываться с просветной поверхностью EV, *например* экзосомами, или молекулой, содержащей такой пептид;
 - (vi) любому пептиду, полученному из мотива, полученного из белка в (i), который может связываться с просветной поверхностью EV, *например* экзосомами, или молекулой, содержащей такой пептид;
 - (vii) молекуле от (i) до (vi), содержащей по меньшей мере одну не встречающуюся в природе аминокислоту;
 - (viii) или любую их комбинацию,
- которая подходит для использования в качестве каркаса для нацеливания (прикрепления) полезных нагрузок, *например* биологически активных молекул (*например* терапевтических белков) к просветной поверхности EV, *например* экзосом.

[00217] В контексте настоящего документа термин «**EV, *например* экзосома по настоящему раскрытию**» или грамматические варианты относится к EV, *например* экзосоме, которая содержит по меньшей мере один каркасный белок по настоящему раскрытию.

[00218] В контексте настоящего документа термин «**клетка-производитель по настоящему раскрытию**» или грамматические варианты относится к клетке, которая может продуцировать EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию.

II. Белки внеклеточных везикул, *например* экзосомные белки

[00219] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к идентификации, применению и модификации белков EV, *например* экзосомных белков (каркасных белков), которые значительно обогащены в просветных поверхностях EV, *например* экзосомы. Такие белки EV или экзосомные белки (каркасные белки) могут быть идентифицированы путем анализа с использованием высокоочищенной EV, *например* экзосом, с помощью масс-спектрометрии или других способов, известных в данной области техники.

[00220] Каркасные белки по настоящему раскрытию включают различные просветные белки или мембранные белки, такие как трансмембранные белки (*т.е.*, белки, проходящие через мембрану EV через одну или несколько трансмембранных спиралей), интегральные белки и периферические белки (*т.е.*, белки на просветной поверхности, взаимодействующие с поверхностью посредством электростатических взаимодействий, и/или заякоряющие фрагменты), обогащенные на мембранах EV, *например* экзосом. В частности, каркасные белки по настоящему раскрытию включают, но не ограничиваясь ими,

- (1) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS);
- (2) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный 1 (MARCKSL1); и
- (3) кислый растворимый белок 1 головного мозга (BASP1).

[00221] Один или несколько белков EV, *например* экзосомных белков, идентифицированных в настоящем документе (каркасных белков), могут быть выборочно использованы в зависимости от клетки-производителя, условий продуцирования, способов очистки или предполагаемого применения экзосом.

[00222] Белки EV, *например* экзосомные белки, обогащенные в просвете (*например* на просветной поверхности мембраны EV) определенных EV, *например* экзосом, с определенным диапазоном размеров, нацеливающим фрагментом, плотностью заряда, полезной нагрузкой *и т.д.* могут быть идентифицированы и использованы в некоторых аспектах настоящего раскрытия.

[00223] В некоторых аспектах более одного белка EV, *например* экзосомного белка, раскрываемого в настоящем документе (*например* каркасных белков, таких как MARCKS, MARKSL1, BASP1, любого их функционального фрагмента, варианта или производного, или любой их комбинации) могут использоваться одновременно или последовательно для создания и выделения терапевтических EV, *например* экзосом, по настоящему раскрытию.

III. EV, *например* экзосомы со сконструированной поверхностью

[00224] Внеклеточные везикулы (EV), *например* экзосомы, обычно имеют диаметр от 20 до 1000 нм. Экзосомы, которые представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, обычно имеют диаметр 100-200 нм. EV, *например* экзосомы, состоят из ограничивающего липидного бислоя и разнообразного набора белков и нуклеиновых кислот (Maas, S.L.N., *et al.*, *Trends. Cell Biol.* 27(3):172-188 (2017)). EV, *например* экзосомы, проявляют преимущественное поглощение в отдельных типах клеток и тканях, и их тропизм можно регулировать путем добавления на их поверхность белков, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности целевых клеток (Alvarez-Erviti, L., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 29(4):341-345 (2011)).

[00225] В отличие от антител, EV, *например* экзосомы, могут вмещать большое количество молекул, прикрепленных к их поверхности, от тысяч до десятков тысяч молекул на EV, *например* экзосому. Конъюгаты или комплексы, содержащие EV, *например* экзосомы, и полезные нагрузки, *например* биологически активные молекулы (*например* терапевтические молекулы), таким образом, представляют собой платформу для доставки высокой концентрации терапевтического или диагностического соединения к отдельным

типам клеток, в то же время ограничивая общее системное воздействие соединения, которое, в свою очередь, снижает нецелевую токсичность. Кроме того, EV, *например* экзосомы, предлагают возможность размещения нескольких полезных нагрузок, *например* биологически активных молекул, в разных компартментах. Например, EV, *например* экзосома, может содержать, *например* нацеливающие фрагменты, прикрепленные к внешней поверхности EV, которые будут направлять EV в определенную целевую клетку (*например* раковую клетку) или целевую ткань (*например* печень или головной мозг), один или несколько терапевтических фрагментов (*например* лекарственные средства) и/или один или несколько обнаруживаемых фрагментов (*например* контрастные реагенты или радионуклиды).

[00226] EV, *например* экзосома, также может содержать различные полезные нагрузки, *например* терапевтические фрагменты (*например* лекарственные средства) и/или обнаруживаемые фрагменты (*например* контрастные реагенты или радионуклиды), прикрепленные к просветной поверхности EV. Кроме того, EV, *например* экзосома, также может содержать одну или несколько полезных нагрузок, *например* биологически активные молекулы (*например* терапевтические агенты, диагностические реагенты, адъюванты и т.д.) в просвете EV, *например* экзосомы.

[00227] Таким образом, EV, *например* экзосомы, обеспечивают формат доставки, который объединяет несколько полезных нагрузок, *например* биологически активные молекулы, с одинаковыми или разными функциями в одном носителе для доставки и с очень высокой плотностью.

[00228] EV, *например* экзосомы, описанные в настоящем документе, представляют собой внеклеточные везикулы с диаметром приблизительно 20-300 нм. В определенных вариантах осуществления EV, *например* экзосома по настоящему раскрытию имеет диаметр приблизительно 20-290 нм, 20-280 нм, 20-270 нм, 20-260 нм, 20-250 нм, 20-240 нм, 20-230 нм, 20-220 нм, 20-210 нм, 20-200 нм, 20-190 нм, 20-180 нм, 20-170 нм, 20-160 нм, 20-150 нм, 20-140 нм, 20-130 нм, 20-120 нм, 20-110 нм, 20-100 нм, 20-90 нм, 20-80 нм, 20-70 нм, 20-60 нм, 20-50 нм, 20-40 нм, 20-30 нм, 30-300 нм, 30-290 нм, 30-280 нм, 30-270 нм, 30-260 нм, 30-250 нм, 30-240 нм, 30-230 нм, 30-220 нм, 30-210 нм, 30-200 нм, 30-190 нм, 30-180 нм, 30-170 нм, 30-160 нм, 30-150 нм, 30-140 нм, 30-130 нм, 30-120 нм, 30-110 нм, 30-100 нм, 30-90 нм, 30-80 нм, 30-70 нм, 30-60 нм, 30-50 нм, 30-40 нм, 40-300 нм, 40-290 нм, 40-280 нм, 40-270 нм, 40-260 нм, 40-250 нм, 40-240 нм, 40-230 нм, 40-220 нм, 40-210 нм, 40-200 нм, 40-190 нм, 40-180 нм, 40-170 нм, 40-160 нм, 40-150 нм, 40-140 нм, 40-130 нм, 40-120 нм, 40-110 нм, 40-100 нм, 40-90 нм, 40-80 нм, 40-70 нм, 40-60 нм, 40-50 нм, 50-300 нм, 50-290 нм, 50-280 нм, 50-270 нм, 50-260 нм, 50-250 нм, 50-240 нм, 50-230 нм, 50-220 нм, 50-210 нм, 50-

200 нм, 50-190 нм, 50-180 нм, 50-170 нм, 50-160 нм, 50-150 нм, 50-140 нм, 50-130 нм, 50-120 нм, 50-110 нм, 50-100 нм, 50-90 нм, 50-80 нм, 50-70 нм, 50-60 нм, 60-300 нм, 60-290 нм, 60-280 нм, 60-270 нм, 60-260 нм, 60-250 нм, 60-240 нм, 60-230 нм, 60-220 нм, 60-210 нм, 60-200 нм, 60-190 нм, 60-180 нм, 60-170 нм, 60-160 нм, 60-150 нм, 60-140 нм, 60-130 нм, 60-120 нм, 60-110 нм, 60-100 нм, 60-90 нм, 60-80 нм, 60-70 нм, 70-300 нм, 70-290 нм, 70-280 нм, 70-270 нм, 70-260 нм, 70-250 нм, 70-240 нм, 70-230 нм, 70-220 нм, 70-210 нм, 70-200 нм, 70-190 нм, 70-180 нм, 70-170 нм, 70-160 нм, 70-150 нм, 70-140 нм, 70-130 нм, 70-120 нм, 70-110 нм, 70-100 нм, 70-90 нм, 70-80 нм, 80-300 нм, 80-290 нм, 80-280 нм, 80-270 нм, 80-260 нм, 80-250 нм, 80-240 нм, 80-230 нм, 80-220 нм, 80-210 нм, 80-200 нм, 80-190 нм, 80-180 нм, 80-170 нм, 80-160 нм, 80-150 нм, 80-140 нм, 80-130 нм, 80-120 нм, 80-110 нм, 80-100 нм, 80-90 нм, 90-300 нм, 90-290 нм, 90-280 нм, 90-270 нм, 90-260 нм, 90-250 нм, 90-240 нм, 90-230 нм, 90-220 нм, 90-210 нм, 90-200 нм, 90-190 нм, 90-180 нм, 90-170 нм, 90-160 нм, 90-150 нм, 90-140 нм, 90-130 нм, 90-120 нм, 90-110 нм, 90-100 нм, 100-300 нм, 110-290 нм, 120-280 нм, 130-270 нм, 140-260 нм, 150-250 нм, 160-240 нм, 170-230 нм, 180-220 нм или 190-210 нм. Размер EV, *например* экзосомы, описанной в настоящем документе, может быть измерен в соответствии со способами, описанными *выше*.

[00229] В некоторых аспектах EV, *например* экзосома, по настоящему раскрытию содержит билипидную мембрану («EV, *например* экзосому, мембрану»), содержащую внутреннюю поверхность и внешнюю поверхность. В некоторых вариантах осуществления внутренняя поверхность обращена к внутреннему кору (*т.е.*, просвету) EV, *например* экзосомы. В определенных аспектах внешняя поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или целевой клетки.

[00230] В некоторых аспектах мембрана EV, *например* экзосомы, содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых аспектах мембрана EV, *например* экзосома, содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерин, холестерин и фосфатидилсерин.

[00231] В некоторых аспектах мембрана EV, *например* экзосомы, содержит внутренний листок и внешний листок. Состав внутреннего и внешнего листка может быть определен с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники, *см.*, *например*, Kuypers *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1985 819:170. В некоторых аспектах состав наружного листка составляет примерно 70-90% холинфосфолипидов, примерно 0-15% кислых фосфолипидов и примерно 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутреннего листка составляет

примерно 15-40% холинфосфолипидов, примерно 10-50% кислых фосфолипидов и примерно 30-60% фосфатидилэтаноламина.

[00232] В одном аспекте настоящее раскрытие относится к созданию и применению EV, *например* экзосом со сконструированным просветом. Экзосомы со сконструированным просветом имеют внутреннее пространство (просветную поверхность EV), модифицированное по своему составу, *например* модифицированное по отношению к составу экзосом, встречающихся в природе. Например, состав просветной поверхности может быть модифицирован путем изменения содержания белка, липидов или гликанов в компонентах просветной стороны мембраны EV, *например* экзосомы. В некоторых аспектах просветная поверхность EV, *например* экзосом, может содержать один или несколько рекомбинантно экспрессируемых белков, *например* каркасных белков по настоящему раскрытию, *например*, экзосомного просветного белка, которые не являются естественными для EV, *например* экзосом. Соответственно, в настоящем раскрытии предложены композиции, которые позволяют заякорять полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, к EV, *например* экзосоме, включая связывание полезной нагрузки, *например* биологически активной молекулы, с каркасным белком, *например*, экзосомным просветным белком по настоящему раскрытию. В настоящем раскрытии также предложен способ заякорения полезной нагрузки, *например* биологически активной молекулы, к EV, *например* экзосоме, включая связывание биологически активной молекулы, с каркасным белком, *например* экзосомным просветным белком по настоящему раскрытию.

[00233] В некоторых аспектах каркасные белки, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию присоединяются к просветной поверхности EV, *например* экзосомы, посредством липидирования. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию является ацилированным жиром. В некоторых аспектах каркасный белок является миристоилированным.

[00234] Миристоилирование представляет собой модификацию липидирования, при которой миристоильная группа, полученная из миристиновой кислоты, ковалентно присоединена с помощью амидной связи к альфа-аминогруппе N-концевого глицина. Миристиновая кислота представляет собой 14-углеродную насыщенную жирную кислоту (14:4) с систематическим названием н-тетрадекановая кислота. Эта модификация может быть добавлена как котрансляционно, так и посттрансляционно. Во время котрансляционного добавления миристоильной группы N-концевой глицин модифицируется после расщепления N-концевого остатка метионина во вновь формирующемся растущем полипептиде. Это происходит примерно в 80%

миристоилированных белков. Посттрансляционное миристоилирование обычно происходит после расщепления каспазы, что приводит к обнажению внутреннего остатка глицина, который затем становится доступным для добавления миристиновой кислоты. В дополнение к котрансляционному или посттрансляционному миристоилированию (проводится либо *in vivo* либо *in vitro*, например ферментативно), миристоилирование каркасных белков, например экзосомных просветных белков по настоящему раскрытию также может происходить посредством химического синтеза, например путем присоединения, в качестве стадии синтеза, миристиновой кислоты к каркасному белку во время химического синтеза.

[00235] В некоторых вариантах осуществления липидное заякорение на биологических мембранах не является пальмитоилированием (*т.е.*, присоединением пальмитоиновой кислоты, как правило, к цистеину и, реже, к серину или треонину). В других вариантах осуществления липидное заякорение на биологических мембранах представляет собой пренилирование (присоединение пренильных групп) или связывание гликозилфосфатидилинозитола (связывание GPI). Пренилированные белки представляют собой белки с ковалентно присоединенными гидрофобными изопреновыми полимерами (*т.е.*, разветвленным пятиуглеродным углеводородом) в цистеиновых остатках белка. Связанные с GPI белки присоединяются к сложной молекулярной группе GPI посредством амидной связи с С-концевой карбоксильной группой белка. Присоединение GPI происходит за счет действия комплекса GPI-трансамидазы. Цепи жирных кислот фосфатидилинозита вставлены в мембрану и, таким образом, являются тем, что заякоряет белок на мембране.

[00236] В некоторых вариантах осуществления EV, например экзосомы со сконструированным просветом получают химическими и/или физическими способами, такими как индуцированное PEG слияние и/или ультразвуковое слияние.

[00237] В других вариантах осуществления EV например экзосомы со сконструированным просветом получают с помощью генной инженерии. Экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать композиции с модифицированным просветом. В некоторых вариантах осуществления EV, например экзосомы со сконструированным просветом имеют белок EV, например экзосомный белок (например каркасный белок, например экзосомный просветный белок, такой как MARCKS, MARKSL1, BASP1 или их комбинацию) с более высокой или более низкой плотностью или включают модификацию или фрагмент белка EV, например экзосомного белка (например

любой его функциональный фрагмент, вариант или производное, или любую их комбинацию).

[00238] Например, EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей белок EV, *например* экзосомный белок, или модификацию или фрагмент белка EV, *например* экзосомный белок (*например* каркасный белок, например экзосомный просветный белок, такой как MARCKS, MARKSL1, BASP1, любой его функциональный фрагмент, вариант или производное, или любую их комбинацию). EV, *например* экзосомы, включая белки, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать композиции поверхностных белков (каркасных белков) с модификацией просвета.

[00239] Различные модификации или фрагменты белка EV, *например* экзосомного белка (*например* каркасного белка, например экзосомного просветного белка, такого как MARCKS, MARKSL1, BASP1, любого его функционального фрагмента, варианта или производного, или любой их комбинации), могут использоваться для вариантов осуществления настоящего раскрытия. Например, можно использовать белки, модифицированные для более эффективного нацеливания на просветные поверхности EV, *например* экзосомы. Также можно использовать белки, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на просветные поверхности EV, *например* экзосомы.

[00240] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему изобретению содержит белок MARCKS или его фрагмент, вариант или производное. Белок MARCKS (номер доступа в Uniprot P29966) также известен как субстрат протеинкиназы C, белок с молекулярной массой 80 кДа, легкая цепь. Полноразмерный белок MARCKS человека имеет длину 332 аминокислоты и содержит кальмодулин-связывающий домен в аминокислотных остатках 152-176. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по настоящему раскрытию содержит зрелый белок MARCKS (*т.е.*, без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию происходит из зрелого белка MARCKS, *т.е.*, он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка MARCKS, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке.

[00241] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию содержит белок MARKSL1 (номер доступа в Uniprot P49006), также известный как MARCKS-подобный белок 1, и субстрат макрофагальной миристоилированной богатой аланином С-киназы. Полноразмерный белок MARKSL1 человека имеет длину 195 аминокислот. Белок MARKSL1 имеет эффекторный домен,

участвующий в связывании липидов и кальмодулина в аминокислотных остатках 87-110. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по настоящему раскрытию содержит зрелый белок MARCKSL1 (*т.е.*, без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию происходит из зрелого белка MARCKSL1, *т.е.*, он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка MARCKSL1, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке.

[00242] В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию содержит белок BASP1 (номер доступа в Uniprot P80723), также известный как кислый белок, обогащенный в нервной ткани, с молекулярной массой 22 кДа, или белок нейрональной аксональной мембраны NAP-22. Полноразмерная последовательность человеческого белка BASP1 (изомер 1) имеет длину 227 аминокислот. В изомере, полученном альтернативным сплайсингом, отсутствуют аминокислоты с 88 по 141 из изомера 1. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию содержит зрелый белок BASP1 (*т.е.*, без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию происходит из зрелого белка BASP1, *т.е.*, он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка BASP1, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке.

[00243] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен», при этом ND и/или ED ассоциированы с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы. В контексте настоящего документа термин «ассоциированный с» относится к взаимодействию между каркасным белком по настоящему раскрытию с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы, которое не включает ковалентное связывание с компонентом мембраны. Например, каркасы по настоящему раскрытию могут быть ассоциированы с просветной поверхностью EV, *например* посредством липидного якоря (*например* миристиновой кислоты) и/или многоосновного домена, который электростатически взаимодействует с отрицательно заряженной головкой фосфолипидов мембраны. В других аспектах каркасный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с просветной поверхностью EV, а ED ассоциирован с просветной поверхностью EV посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или по меньшей мере семь смежных лизинов (Lys) подряд.

[00244] В других аспектах ED дополнительно содержит одну или несколько областей низкой сложности, *например* мотив PEST. Последовательность PEST представляет собой пептидную последовательность, которая богата пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T). В некоторых аспектах ED дополнительно содержит отрицательно заряженные остатки (например, Glu) и множество Ser и Thr, которые претерпевают временное фосфорилирование (таким образом, оба добавляют отрицательные заряды к областям вне ED).

[00245] В некоторых аспектах ND ассоциирован с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы, посредством липидирования, *например* посредством миристоилирования. В некоторых вариантах осуществления ND имеет Gly на N-конце. В некоторых вариантах осуществления N-концевой Gly является миристоилированным. В некоторых аспектах ND не содержит Met на N-конце. В других вариантах осуществления ND содержит Gly, который является миристоилированным, и не содержит Met на N-конце.

[00246] В некоторых аспектах ED ассоциирован с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления ED ассоциирован с просветной поверхностью EV, *например* экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатического взаимодействия.

[00247] В некоторых аспектах ED содержит (i) основную аминокислоту (*например* лизин) или (ii) две или более основных аминокислот (*например* лизин) рядом друг с другом в полипептидной последовательности. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой лизин (Lys; K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H). В некоторых вариантах осуществления основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, при этом n является целым числом от 1 до 10.

[00248] В других аспектах ED содержит по меньшей мере лизин, а ND содержит лизин на C-конце, если N-конец ED напрямую связан с лизином на C-конце ND, *т.е.*, лизин находится на N-конце ED и слит с лизином на C-конце ND. В других вариантах осуществления ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов, когда N-конец ED связан с C-концом ND посредством линкера, *например* одной или нескольких аминокислот.

[00249] В некоторых аспектах ED содержит K, KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию. В настоящем раскрытии также предложено, что в некоторых аспектах лизиновые повторы могут быть заменены аргининами. В других аспектах, аргининовые повторы в ED или в каркасных белках

обеспечивают более низкую эффективность загрузки по сравнению с эффективностью лизина.

[00250] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок, пригодный для настоящего раскрытия, требует по меньшей мере двух лизинов или по меньшей мере трех лизинов, повторяющихся подряд в ED или в ED вместе с ND, *т.е.*, лизин на С-конце ND и К на N-конце ED. В некоторых вариантах осуществления ED содержит К, КК, ККК, КККК (SEQ ID NO: 151), ККККК (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; и где X6 представляет собой основную аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислоту X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых вариантах осуществления аминокислоту X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит Met на N-конце, *например* миристоилированный.

[00251] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит ND и ED, при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; где X6 представляет собой основную аминокислоту, аминокислоту X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser, X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met, X3 представляет собой аминокислоту, а аминокислоту X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser, где ED содержит по меньшей мере одну аминокислоту, например по меньшей мере один Lys, и где каркасный белок не является (i) аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотой последовательностью, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[00252] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой глицин, представленный Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; где X6 представляет собой основную аминокислоту, и где ED связан с X6 с помощью пептидной связи и

содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит Met на N-конце, *например* миристоилированный. В других аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[00253] В некоторых вариантах осуществления ND каркасного белка, например экзосомного просветного белка содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где

- a. G представляет собой Gly;
- b. «:» представляет собой пептидную связь;
- c. X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- d. X3 представляет собой аминокислоту;
- e. X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- f. X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и
- g. X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

[00254] В некоторых аспектах каркасный белок, например, экзосомный просветный белок не содержит Met на N-конце, *например* миристоилированный. В других аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121. В некоторых аспектах аминокислоту X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[00255] В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или несколько аминокислот. В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например* синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, *например* алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкера могут быть связаны в тандеме. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предупреждают/ослабляют стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно в некоторых вариантах осуществления линкер может содержать один или несколько сайтов,

расщепляемых протеазой, которые могут располагаться внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности. Когда ND и ED соединены линкером, ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов.

[00256] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около два, по меньшей мере около три, по меньшей мере около четыре, по меньшей мере около пять, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95 или по меньшей мере около 100 аминокислот.

[0023] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$, при этом n представляет собой любое целое число от 1 до 100, а m представляет собой любое целое число от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$, при этом x представляет собой целое число от 1 до 4, y представляет собой 0 или 1, а z представляет собой целое число от 1 до 50. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность G_n , при этом n может представлять собой целое число от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$, при этом n является целым числом от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$, при этом n является целым числом от 1 до 100.

[0024] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, *т.е.*, не встречающимся в природе. В одном варианте осуществления пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (*например* природные или не встречающиеся в природе пептиды), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не связан в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (*например* содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция).

[0025] В других аспектах пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. В других аспектах пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе аминокислоты, встречающиеся в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В других аспектах пептидный линкер может содержать природную полипептидную последовательность.

[0026] В настоящем раскрытии также предложена выделенная внеклеточная везикула (EV), *например* экзосома, содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, например экзосомным просветным белком, при этом каркасный белок содержит ND—ED, при этом:

- a. ND содержит G:X2:X3:X4:X5:X6; где:
 - i. G представляет собой Gly;
 - ii. «:» представляет собой пептидную связь;
 - iii. X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
 - iv. X3 представляет собой аминокислоту;
 - v. X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Glu и Met;
 - vi. X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
 - vii. X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His;
- b. «—» представляет собой необязательный линкер; а также
- c. ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), при этом N-концевой лизин связан с X6 с помощью пептидной связи или одной или нескольких аминокислот, или (ii) по меньшей мере один лизин, который напрямую связан с X6 с помощью пептидной связи. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит Met на N-конце, *например* миристоилированный. В других аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[0027] В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбран из группы, состоящей из Gly и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X3 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X4 представляет собой Leu или Glu. В некоторых аспектах

аминокислоту X5 выбран из группы, состоящей из Ser и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X2 представляет собой Gly, Ala или Ser; аминокислота X3 представляет собой Lys или Glu, аминокислота X4 представляет собой Leu, Phe, Ser или Glu, аминокислота X5 представляет собой Ser или Ala; и аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах — линкер содержит пептидную связь или одну или несколько аминокислот.

[0028] В некоторых аспектах ED в каркасном белке, например экзосомном просветном белке содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 153); RRRRR (SEQ ID NO: 154), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 155), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 156) или любую их комбинацию.

[0029] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 157), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 158), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 159), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 160) или (v) любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит аминокислотную последовательность, имеющую Met на N-конце последовательности в (i)-(v). В других аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118 или 122-150, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[0030] В некоторых аспектах ND в каркасном белке, например, экзосомном просветном белке содержит аминокислотную последовательность (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 203), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 204), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 205), (iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 206) или (v) любую их комбинацию, а ED в каркасном белке содержит (a) K, (b) KK, (c) KKK, (d) KKKG (SEQ ID NO: 207), (e) KKKGY (SEQ ID NO: 208), (f) KKKGYN (SEQ ID NO: 209), (g) KKKGYNV (SEQ ID NO: 210), (h) KKKGYNVN (SEQ ID NO: 211), (i) KKKGYS (SEQ ID NO: 212), (k) KKKGYG (SEQ ID NO: 213), (l) KKKGYGG (SEQ ID NO: 214), (m) KKKGS (SEQ ID NO: 215), (n) KKKGSG (SEQ ID NO: 216), (o) KKKGSG (SEQ ID NO: 217), (p) KKKGSGS (SEQ ID NO: 218), (q) KKKS (SEQ ID NO: 219), (r) KKKSG (SEQ ID NO: 220), (s) KKKSGG (SEQ ID NO: 221), (t) KKKSGGS (SEQ ID NO: 222), (u) KKKSGGSG (SEQ ID NO: 223), (v) KKS GGSGG (SEQ ID NO: 224), (w) KKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 225), (x) KRFSFKKS (SEQ ID NO: 226) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит аминокислотную последовательность, имеющую Met на N-конце последовательности в (i)-(v). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей

SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[0031] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка, например экзосомного просветного белка по настоящему раскрытию состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 157), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 158), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 159), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 160) или (v) любой их комбинации.

[0032] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит аминокислотную последовательность (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 161), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 162), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 163), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 164), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 165), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 166), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 167), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 168) или (ix) любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный белок не содержит аминокислотную последовательность, имеющую Met на N-конце последовательности в (i)-(ix). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[0033] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка, например экзосомного просветного белка по настоящему раскрытию состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 161), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 162), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 163), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 164), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 165), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 166), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 167), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 168) и (ix) любой их комбинации.

[00257] В некоторых аспектах длина каркасного белка, например экзосомного просветного белка, составляет по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 31, по меньшей мере около 32, по меньшей мере около 33, по меньшей мере около 34, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 36, по меньшей мере около 37, по меньшей мере около 38, по меньшей мере

[00258] В некоторых аспектах длина каркасного белка, например экзосомного просветного белка составляет от приблизительно 5 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 20, от приблизительно 20 до приблизительно 30, от приблизительно 30 до приблизительно 40, от приблизительно 40 до приблизительно 50, от приблизительно 50 до приблизительно 60, от приблизительно 60 до приблизительно 70, от приблизительно 70 до приблизительно 80, от приблизительно 80 до приблизительно 90, от приблизительно 90 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 110, от приблизительно 110 до приблизительно 120, от приблизительно 120 до приблизительно 130, от приблизительно 130 до приблизительно 140, от приблизительно 140 до приблизительно 150, от приблизительно 150 до приблизительно 160, от приблизительно 160 до приблизительно 170, от приблизительно 170 до приблизительно 180, от приблизительно

180 до приблизительно 190, от приблизительно 190 до приблизительно 200, от приблизительно 200 до приблизительно 210, от приблизительно 210 до приблизительно 220, от приблизительно 220 до приблизительно 230, от приблизительно 230 до приблизительно 240, от приблизительно 240 до приблизительно 250, от приблизительно 250 до приблизительно 260, от приблизительно 260 до приблизительно 270, от приблизительно 270 до приблизительно 280, от приблизительно 280 до приблизительно 290, от приблизительно 290 до приблизительно 300, от приблизительно 300 до приблизительно 310, от приблизительно 310 до приблизительно 320, от приблизительно 320 до приблизительно 330, от приблизительно 330 до приблизительно 340 или от приблизительно 340 до приблизительно 250 аминокислот.

[00259] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 169), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 170), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 171), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 172), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 173), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 174), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 175), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 176), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 177), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 178) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 179). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит аминокислотную последовательность, имеющую Met на N-конце последовательности в (i)-(xi). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[00260] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка, например экзосомного просветного белка по настоящему изобретению состоит из (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 169), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 170), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 171), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 172), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 173), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 174), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 175), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 176), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 177), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 178) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 179). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит аминокислотную последовательность, имеющую Met на N-конце последовательности в (i)-(xi). В некоторых аспектах каркасный белок не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[00261] В других аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит любую из последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, но не содержит соответствующую последовательность, имеющую Met на N-конце, *например* SEQ ID NO: 4-109. В некоторых аспектах каркасный белок содержит любую из последовательностей в Табл. 1, но не содержит или не состоит из (i) аминокислотной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, или (ii) аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 115 или 118-121.

[00262] Неограничивающие примеры каркасных белков, например экзосомных просветных белков, пригодных для настоящего раскрытия, приведены ниже.

ТАБЛИЦА 1.

SEQ ID NO:	Каркасный белок: GX2X3X4X5X6-ED
227	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
228	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGA
229	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEG
230	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE
231	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA
232	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK
233	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
234	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD
235	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEK
236	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
237	GGKLSKKKKGYNVNDEKAK
238	GGKLSKKKKGYNVNDEKA
239	GGKLSKKKKGYNVNDEK
240	GGKLSKKKKGYNVNDE
241	GGKLSKKKKGYNVND
169	GGKLSKKKKGYNVN
242	GGKLSKKKKGYNV
243	GGKLSKKKKGYN
244	GGKLSKKKKGY
245	GGKLSKKKKG
246	GGKLSKKKK
161	GGKLSKKK

157	GGKLSKK
247	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
248	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
249	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
250	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
251	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
252	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
253	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK
254	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSF
255	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFS
256	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGF
257	GAKKSKKRFSFKKSFKLSG
258	GAKKSKKRFSFKKSFKLS
259	GAKKSKKRFSFKKSFKL
260	GAKKSKKRFSFKKSFK
261	GAKKSKKRFSFKKSF
179	GAKKSKKRFSFKKS
262	GAKKSKKRFSFKK
263	GAKKSKKRFSFK
264	GAKKSKKRFSF
265	GAKKSKKRFS
266	GAKKSKKRF
267	GAKKSKKR
268	GAKKSKK
269	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
270	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
271	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
272	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
273	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
274	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
275	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFK
276	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSF
277	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFS
278	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGF

279	GAKKAKKRFSFKKSFKLSG
280	GAKKAKKRFSFKKSFKLS
281	GAKKAKKRFSFKKSFKL
282	GAKKAKKRFSFKKSFK
283	GAKKAKKRFSFKKSF
284	GAKKAKKRFSFKKS
285	GAKKAKKRFSFKK
286	GAKKAKKRFSFK
287	GAKKAKKRFSF
288	GAKKAKKRFS
289	GAKKAKKRF
290	GAKKAKKR
291	GAKKAKK
292	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
293	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK
294	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSF
295	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFS
396	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGF
297	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSG
298	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLS
299	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKL
300	GAQESKKKKKKRFSFKKSFK
301	GAQESKKKKKKRFSFKKSF
302	GAQESKKKKKKRFSFKKS
303	GAQESKKKKKKRFSFKK
304	GAQESKKKKKKRFSFK
305	GAQESKKKKKKRFSF
306	GAQESKKKKKKRFS
307	GAQESKKKKKKRF
308	GAQESKKKKKKR
309	GAQESKKKKKK
310	GAQESKKKKK
311	GAQESKKKK
312	GAQESKKK

313	GAQESKK
314	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK
315	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNR
316	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRN
317	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKR
318	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFK
319	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSF
320	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLS
321	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGL
322	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSG
323	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLS
324	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKL
325	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFK
326	GSQSSKKKKKKKFSFKKPF
327	GSQSSKKKKKKKFSFKKP
328	GSQSSKKKKKKKFSFKK
329	GSQSSKKKKKKKFSFK
330	GSQSSKKKKKKKFSF
331	GSQSSKKKKKKKFS
332	GSQSSKKKKKKKF
333	GSQSSKKKKKK
334	GSQSSKKKKK
335	GSQSSKKKK
336	GSQSSKKK
337	GSQSSKK

[00263] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию состоит или состоит по сути из любой из последовательностей в настоящем раскрытии. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию состоит из последовательности, раскрываемой в Табл. 1. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию состоит из последовательности, раскрываемой в настоящем документе, *например* последовательности, раскрываемой в Табл. 1, ковалентно присоединенной к мембранному якорю (*например* миристиновой кислоте). В некоторых аспектах заякорение в мембраны можно

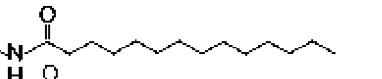
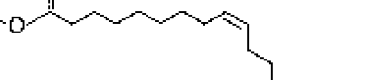
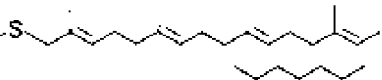
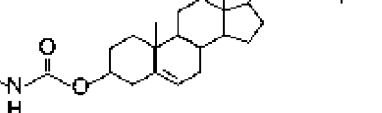
осуществлять посредством липидирования. В некоторых вариантах осуществления липидирование может представлять собой, *например* ацилирование жирными кислотами. В некоторых аспектах ацелирование жирных кислот может представлять собой, *например* миристоилирование. В некоторых аспектах мембранный якорь ковалентно присоединен к N-концевой аминокислоте последовательности, раскрываемой в настоящем документе, *например* последовательности, раскрываемой в Табл. 1. В некоторых аспектах мембранный якорь ковалентно присоединен к N-концевому глицину последовательности, раскрываемой в настоящем документе, *например* последовательности, раскрываемой в Табл. 1. Соответственно, в некоторых аспектах каркасный белок по настоящему раскрытию состоит из раскрываемой последовательности, *например* последовательности, раскрываемой в Табл. 1, которая была N-миристоилирована.

[00264] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок содержит липидированную аминокислоту, *например* миристоилированную аминокислоту, на N-конце каркасного белка, который функционирует как липидный якорь. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly. Присутствие N-концевого Gly является требованием для N-миристоилирования. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина, *например* аллилглицин, бутилглицин или пропаргилглицин.

[00265] В некоторых аспектах липидный якорь может быть присоединен путем химического синтеза или ферментативно к любой N-концевой аминокислоте каркасного белка по настоящему раскрытию.

[00266] В других аспектах липидный якорь может представлять собой любой липидный якорь, известный в данной области техники, *например* пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В необычных обстоятельствах, *например* при использовании культуральной среды, в которой количество миристиновой кислоты ограничено, к N-концевому глицину могут быть присоединены некоторые другие жирные кислоты, включая короткоцепочечные и ненасыщенные. Например, в каналах ВК миристан, как сообщалось, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи. Мембранные якоря, известные в данной области техники, представлены в следующей таблице.

ТАБЛИЦА 2

Модификация	Модификация группы
S- пальмитоилирование	
N- пальмитоилирование	
N-миристилоилирование	
O-ацилирование	
Фарнезилирование	
Геранилгеранилирование	
Холестерин	

[00267] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или приблизительно 100% идентичность последовательности со зрелой формой SEQ ID NO: 1 (MARCKS), SEQ ID NO: 2 (MARCKSL1) или SEQ ID NO: 3 (BASP1), *т.е.*, без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

[00268] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, например экзосомный просветный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или приблизительно 100% идентичность последовательности с функциональным фрагментом зрелой формы SEQ ID NO: 1 (MARCKS), SEQ ID NO: 2 (MARCKSL1) или SEQ ID NO: 3 (BASP1), *т.е.*, без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

[00269] В некоторых аспектах биологически активная молекула, прикрепленная к каркасному белку по настоящему раскрытию, находится на просветной стороне EV (*например* экзосомы).

[00270] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок дополнительно содержит трансмембранный домен. В некоторых аспектах трансмембранный домен вставлен между доменом ED каркасного белка, который расположен на просветной стороне EV (*например* экзосомы), и полезной нагрузкой, *например* биологически активной молекулой. Таким образом, полезная нагрузка, *например* биологически активная молекула, прикреплена к внешней поверхности EV (*например* экзосомы).

[00271] В некоторых аспектах каркасный белок, например экзосомный просветный белок дополнительно содержит экстравезикулярный домен. В некоторых вариантах осуществления экстравезикулярный домен расположен между трансмембранным доменом и биологически активной молекулой.

[00272] В некоторых аспектах каркасный белок связан с биологически активной молекулой по меньшей мере посредством одного линкера, *например* пептидного линкера. В некоторых аспектах ND связан с ED линкером, непосредственно вставленным между обоими доменами. В некоторых аспектах линкер содержит, *например* пептидную связь или одну или несколько аминокислот. В некоторых аспектах линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых аспектах линкер представляет собой саморасщепляющийся линкер.

[00273] Также можно использовать слияния каркасного белка по настоящему раскрытию и биологически активной молекулы (*например* молекулы, обладающей терапевтической активностью). Например, слитый белок может содержать каркасный белок, такой как MARCKS, MARCKSL1, BASP1, или его модификацию, в частности, его фрагмент или вариант, и полезную нагрузку, например биологически активную молекулу (*например*, терапевтический пептид). В некоторых аспектах слитый белок содержит каркасный белок, содержащий фрагмент аминоконца BASP1. В некоторых аспектах биологически активная молекула содержит белок, полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение, вирус, ионофор, носитель для ионофора, фрагмент, который образует канал или пору, или любую их комбинацию.

[00274] Биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) может быть выбрана из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида, слитого белка или линкера с терапевтическим соединением. Биологически активная молекула (*например* терапевтические соединения) также может

представлять собой нуклеотид, аминокислоту, липид, углевод или малую молекулу. Биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) может представлять собой антитело, фермент, лиганд, антиген (*например* опухолевый антиген или антиген инфекционного агента, такого как бактерия, вирус, гриб или простейшее), рецептор, антимикробный пептид, фактор транскрипции или их фрагмент или модификацию.

[00275] Слитый белок, содержащий каркасный белок по настоящему раскрытию, слитый или конъюгированный с полезной нагрузкой, *например* биологически активной молекулой, может быть прикреплен к просветной поверхности EV, *например* экзосомы, и обеспечивать, *например* терапевтическую активность для EV, *например* экзосомы.

[00276] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой компонент комплекса редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления указанный комплекс для редактирования генома представляет собой эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (эффекторную нуклеазу TAL или TALEN); нуклеазу цинкового пальца (ZFN); рекомбиназу; 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 техники; или любой другой подходящий комплекс для редактирования генома, известный в данной области техники, или любую их комбинацию.

[00277] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой трансмембранный пептид. Трансмембранные пептиды, описанные в настоящем документе, могут быть экспрессированы в виде слитых белков с любой из последовательностей, описанных в настоящем документе, или любыми их фрагментами или вариантами. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок имеет первый конец, слитый с просветной последовательностью в просвете EV, *например* экзосомы, и второй конец, экспрессируемый на поверхности EV, *например* экзосомы.

[00278] В некоторых вариантах осуществления EV, *например*, по настоящему раскрытию может содержать второй каркасный белок. В некоторых вариантах осуществления второй каркасный белок содержит трансмембранный белок, содержащий полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид переносчика АТФ, полипептид аминопептидазы N (ANPEP), полипептид 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), полипептид неприлизина (MME), полипептид нейропилина-1 (NRP1) или их фрагмент, вариант или производное.

Неограничивающие примеры второго каркасного белка можно найти в патенте США № 10195290 и публикации PCT № WO 2019/040920, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00279] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой белок, связывающий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий нуклеиновую кислоту, представляет собой Dicer, белок Argonaute, TRBP, 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 miRNA, siRNA, направляющую РНК, lincRNA, mRNA, антисмысловую РНК, dsRNA или их комбинации.

[00280] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой часть белок-белковой системы взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления система белок-белковой системы взаимодействия содержит систему взаимодействия FRB-FKBP, *например* систему взаимодействия FRB-FKBP, как описано в работе Banaszynski et al. J Am Chem Soc 2005 Apr 6;127(13):4715-21.

[00281] Слитые белки могут быть нацелены на просветную поверхность EV, *например* экзосом и обеспечивать терапевтическую активность для EV, *например* экзосомы.

[00282] В некоторых вариантах осуществления используются слитые белки, имеющие нацеливающий фрагмент. Например, слитые белки могут содержать (i) каркасный белок, такой как MARCKS, MARCKSL1, BASP1, или его фрагмент, вариант или модификацию, и (ii) нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент можно использовать для нацеливания EV, *например* экзосомы, на конкретный орган, ткань или клетку для лечения с использованием EV, *например* экзосомы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00283] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя целые антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно 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, минитела, антитела верблюдовых и связанные с антителами полипептиды.

[00284] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты также включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. Модульная архитектура антител была использована для создания более 60 различных форматов биспецифических антител. См. работу Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95-106, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления формат биспецифического антитела выбирают из crossMab, DAF (Fab двойного действия) (два-в-одном), DAF (четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, общей LC типа выступ во впадину, группы выступ во впадину, заряженной пары, замена Fab-плеча, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y (биспецифического антитела с лейциновой застежкой-молнией, вызывающей гетеродимеризацию двух HC), Fcab, K $\square$ -тела, ортогонального Fab, DVD-IgG (IgG с двойным переменным доменом), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре-в-одном), нанотела, нанотело-HSA, BiTE (биспецифического активатора T-клеток), диатела, DART (переориентирующегося антитела с двойной аффинностью), TandAb (тандемного антитела), scDiabody, scDiabody-CH3, тройного антитела, миниантитела, минитела, минитела TriBi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂, F(ab')₂-ScFv₂, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, Ab с тетравалентной HC, scDiabody-Fc, диатело-Fc, тандемного scFv-Fc, интратела, Dock and Lock, ImmTAC, HSAbody, scDiabody-HSA, тандемного scFv-токсина, IgG-IgG, Cov-X-Body и scFv1-PEG-scFv2. Биспецифические антитела могут представлять собой моноспецифические антитела, сконструированные для обеспечения биспецифичности путем присоединения к аминоконцам легкой или тяжелой цепей с дополнительными антигенсвязывающими единицами. Альтернативы этим дополнительным антигенсвязывающим единицам включают однодоменные антитела (непарные VL или VH), парные переменные домены антител (*например* Fv или scFv) или сконструированные белковые каркасы. В данной области известны многочисленные формы биспецифических фрагментов, в которых отсутствуют некоторые или все константные домены биспецифических антител.

[00285] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула (*например* терапевтический пептид) представляет собой слитый белок, содержащий каркасный белок по настоящему раскрытию и вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок содержит вирусный капсид, оболочечный белок или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления слитые белки обеспечивают сборку интактных вирусов, которые удерживаются на просветной поверхности EV, *например* экзосомы.

[00286] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой ингибитор регулятора отрицательной контрольной точки или ингибитор партнера по связыванию регулятора отрицательной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления регулятор отрицательной контрольной точки выбирают из группы, состоящей из: цитотоксического белка 4, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4), белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), гена 3, активируемого лимфоцитами (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), супрессора Т-клеточной активации V-домена Ig (VISTA), аденозинового рецептора A2a (A2aR), иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.

[00287] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой иммуногенный белок. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой токсин, анатоксин или нетоксичный мутант токсина. В некоторых вариантах осуществления токсин представляет собой дифтерийный токсин. В некоторых вариантах осуществления анатоксин представляет собой столбнячный анатоксин. В некоторых вариантах осуществления дифтерийный токсин представляет собой нетоксичный мутант дифтерийного токсина.

[00288] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления положительная костимулирующая молекула представляет собой представителя суперсемейства рецепторов ФНО, выбранного из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептора Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления положительная костимулирующая молекула представляет собой представителя суперсемейства ФНО, выбранного из группы, состоящей из: ФНО α , ФНО-С, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2. В некоторых вариантах осуществления положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет

собой ICOS или CD28. В некоторых вариантах осуществления активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.

[00289] В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-10, IL-12 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой белок, содержащий Т-клеточный рецептор (TCR), Т-клеточный корецептор, белок главного комплекса гистосовместимости (MHC), лейкоцитарный антиген человека (HLA) или их производное. В некоторых вариантах осуществления биологически активная молекула представляет собой белок, содержащий опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротейна (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE), опухолевого белка p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), лиганда белка программируемой клеточной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, рецептора фолиевой кислоты альфа, CE7R, IL-3, раково-тестикулярного антигена, gp100 MART-1 и апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО.

[00290] В некоторых аспектах слитые белки, которые содержат биологически активную молекулу и каркасный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4-109, соответствующую последовательности без N-концевой М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемые в настоящем документе (например, Табл. 1), или их модификацию, в частности, их фрагмент или вариант) приводят к обогащению биологически активной молекулы в EV, *например* экзосомах, по сравнению с экспрессией биологически активной молекулы, не имеющей каркасного белка. В некоторых аспектах слитые белки, которые содержат биологически активную молекулу и каркасный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, MARCKSL1, BASP1 без N-концевого М, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190 без N-концевого М, аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 115 или 118-121, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемые в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого М) приводит к обогащению биологически активной молекулы в EV, *например* экзосомах, по сравнению с экспрессией биологически активной молекулы, не имеющей каркасного белка.

[00291] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, содержит любую из SEQ ID NO: 4-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности, раскрываемые в Табл. 1. В некоторых аспектах каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия содержит любую из SEQ ID NO: 4-109, при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок содержит последовательность, раскрываемую в Табл. 1, при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, содержит MARCKS, MARCKSL1, BASP1 без N-конца М, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190 без N-концевой М, аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 115 или 118-121, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемые в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого М. В некоторых аспектах каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, содержит MARCKS, MARCKSL1 или BASP1, при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4-114, 116-118, 122-150 или 180-190, при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 115 или 118-121, при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met. В других вариантах осуществления каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, содержит любую последовательность, раскрываемую в настоящем документе, но не является какой-либо из SEQ ID NO: 4-109, соответствующую последовательностью без N-концевого М или любые последовательности, раскрываемые в Табл. 1 без N-концевой М. В других вариантах осуществления каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, содержит любую последовательность, раскрываемую в настоящем документе, но не содержит ни одной из SEQ ID NO: 4-109.

[00292] В некоторых вариантах осуществления слитые белки содержат каркасный белок, содержащий пептид с последовательностью MGXKLSKKK, при этом 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)(+)(+), при этом N-концевой М отщеплен, так что образующийся слитый белок содержит GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425) или (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), присоединенный к биологически активной молекуле, при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, не представляет собой MGXKLSKKK, при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 117), или не содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, пригодный для настоящего раскрытия, не содержит MGXKLSKKK, при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 117), или не содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+).

[00293] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, содержащий пептидную последовательность (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, содержащий пептид с последовательностью (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каркасный белок не содержит N-концевой M (*например* N-концевой метионин).

[00294] В некоторых аспектах слитый белок содержит каркасный белок, содержащий пептидную последовательность (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu), при этом последовательность не представляет собой (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+). В некоторых аспектах каркасный белок содержит пептид с последовательностью (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каркасный белок не содержит N-концевого Met.

[00295] В некоторых вариантах осуществления обычный белок EV, *например* экзосомный белок выбирают из перечня, состоящего из CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорных белков GPI, LAMP2, LAMP2B и их фрагмента, варианта или производного.

[00296] В некоторых вариантах осуществления обогащение слитого белка, содержащего MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или любую из SEQ ID NO: 4-109, в экзосомах составляет > 2 раза, > 4 раза, > 8 раз, > 16 раз, > 25 раз, > 50 раз, > 100 раз, > 200 раз, > 500 раз, > 750 раз, > 1000 раз, > 2000 раз, > 5000 раз, > 7500 раз, > 10000 раз выше, чем слитого белка, не содержащего MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любой из SEQ ID NO: 4-109, или по сравнению со слитыми белками, которые содержат обычные белки EV, *например* экзосомные белки. В некоторых аспектах обогащение слитого белка, содержащего MARCKS, MARCKSL1, BASP1 без N-концевого M, любую из SEQ ID NO: 4-109 без N-концевого M или любые последовательности, раскрываемые в настоящем документе, *например* Табл. 1, без N-концевого M в экзосомах составляет > 2 раза, > 4 раза, > 8 раз, > 16 раз, > 25 раз, > 50 раз, > 100 раз, > 200 раз, > 500 раз, > 750 раз, > 1000 раз, > 2000 раз, > 5000 раз, > 7500 раз, > 10000 раз выше, чем слитого белка без MARCKS, MARCKSL1, BASP1 без N-концевого M, любой из SEQ ID NO: 4-109 без N-концевого M или любых последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, *например* Табл. 1, без N-концевого M или по сравнению со слитыми белками, которые содержат обычные белки EV, *например* экзосомные белки.

[00297] В некоторых вариантах осуществления обогащение слитого белка, содержащего MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любую из SEQ ID NO: 4-109, соответствующую последовательность без N-концевого M или любые последовательности каркасного белка, раскрываемые в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого M в экзосомах составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 12 раз, по меньшей мере приблизительно в 14 раз, по меньшей мере приблизительно в 16 раз, по меньшей мере приблизительно в 18 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 25 раз, по меньшей мере приблизительно в 30 раз, по меньшей мере приблизительно в 35 раз, по меньшей мере приблизительно в 40 раз, по меньшей мере приблизительно в 45 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз, по меньшей мере приблизительно в 60 раз, по меньшей мере приблизительно в 70 раз, по меньшей мере приблизительно в 80 раз, по меньшей мере приблизительно в 90 раз, по меньшей мере приблизительно в 100 раз, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, по меньшей мере приблизительно в 300 раз, по меньшей мере

приблизительно в 400 раз, по меньшей мере приблизительно в 500 раз, по меньшей мере приблизительно в 750 раз, по меньшей мере приблизительно в 1000 раз, по меньшей мере приблизительно в 1500 раз, по меньшей мере приблизительно в 2000 раз, по меньшей мере приблизительно в 2500 раз, по меньшей мере приблизительно в 3000 раз, по меньшей мере приблизительно в 3500 раз, по меньшей мере приблизительно в 4000 раз, по меньшей мере приблизительно в 4500 раз, по меньшей мере приблизительно в 5000 раз, по меньшей мере приблизительно в 5500 раз, по меньшей мере приблизительно в 6000 раз, по меньшей мере приблизительно в 6500 раз, по меньшей мере приблизительно в 7000 раз, по меньшей мере приблизительно в 7500 раз, по меньшей мере приблизительно в 8000 раз, по меньшей мере приблизительно в 8500 раз, по меньшей мере приблизительно в 9000 раз, по меньшей мере приблизительно в 9500 раз или по меньшей мере приблизительно в 10000 раз выше, чем слитого белка, не содержащего MARCKS, MARCKSL1, BASP1, любой из SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любых последовательностей каркасного белка, раскрываемых в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-конца М или по сравнению со слитыми белками, которые содержат обычные белки EV, *например* экзосомные белки.

[00298] В некоторых вариантах осуществления белковая последовательность любой из SEQ ID NO: 1-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любых последовательностей каркасного белка, раскрываемых в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого М, достаточна для загрузки EV, *например* экзосом, слитым белком.

[00299] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосома со сконструированным просветом, содержащая слитый белок, содержащий экзогенную последовательность (*например* биологически активную молекулу), и EV, *например* экзосома, содержащая недавно идентифицированный в настоящем документе просветный белок (каркасный белок), имеет более высокую плотность слитого белка, чем аналогично сконструированные EV, *например* экзосомы, содержащие экзогенную последовательность, конъюгированную с обычным белком EV, *например* экзосомным белком, известным в данной области техники (*например* CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорными белками GPI, лактадгерином, LAMP2 и LAMP2B, их фрагментом или пептидом, который с ними связывается).

[00300] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий просветный белок (каркасный белок), недавно идентифицированный в настоящем документе, EV, *например* экзосомы, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность просветной поверхности в EV,

например экзосоме, чем слитые белки на просветных поверхностях другой EV, *например* экзосомы, аналогично модифицированных с использованием обычного белка EV, *например* экзосомного белка.

[00301] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий просветный белок (каркасный белок), недавно идентифицированный в настоящем документе, EV, *например* экзосомы, присутствует 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 просветной поверхности в EV, *например* экзосоме, чем слитые белки на просветных поверхностях другой EV, *например* экзосомы, аналогично модифицированных с использованием обычного белка EV, *например* экзосомного белка.

[00302] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD9.

[00303] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63.

[00304] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81.

[00305] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием PDGFR.

[00306] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI.

[00307] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадгерина.

[00308] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2.

[00309] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B.

[00310] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка.

[00311] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKS, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или

более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием белка EV, *например* экзосомного белка.

[00312] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD9.

[00313] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD63.

[00314] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD81.

[00315] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием PDGFR.

[00316] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI.

[00317] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, *например* экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация)

присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием лактадгерина.

[00318] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2.

[00319] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B.

[00320] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка.

[00321] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* MARCKSL1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием белка EV, *например* экзосомного белка.

[00322] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD9.

[00323] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию

(*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD63.

[00324] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием CD81.

[00325] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием PDGFR.

[00326] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI.

[00327] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием лактадгерина.

[00328] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2.

[00329] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность, чем у EV, *например* экзосом, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B.

[00330] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка.

[00331] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию (*например* BASP1, его вариант, фрагмент, вариант фрагмента или модификация) присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием белка EV, *например* экзосомного белка.

[00332] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (*например* Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD9. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD9.

[00333] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (*например* Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63. В некоторых аспектах EV,

например экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD63.

[00334] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого M, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого M, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием CD81.

[00335] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого M, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например Табл. 1) без N-концевого M, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием PDGFR. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием PDGFR.

[00336] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого M, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например Табл. 1) без N-концевого M, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок

присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием якорных белков GPI.

[00337] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадгерина. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием лактадгерина.

[00338] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2.

[00339] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2B. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает

плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием LAMP2Bt.

[00340] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием обычного белка.

[00341] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, соответствующую последовательности без N-концевого М, или любые последовательности каркасного белка, раскрываемого в настоящем документе (например Табл. 1) без N-концевого М, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием варианта обычного белка EV, *например* экзосомного белка. В некоторых аспектах EV, *например* экзосома содержит слитый белок, содержащий любую из SEQ ID NO: 1-109, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met, и при этом слитый белок присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает плотность в EV, *например* экзосомах, аналогично модифицированных с использованием варианта обычного белка EV, *например* экзосомного белка.

[00342] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы, со сконструированным просветом, описанные в настоящем документе, демонстрируют лучшие характеристики по сравнению с EV, *например* экзосомами со сконструированным просветом, известными в данной области техники. Например, EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, полученные с использованием недавно идентифицированных белков EV, *например* экзосомных белков, предложенных в настоящем документе, содержат модифицированные белки, более высоко обогащенные на их просветной поверхности по сравнению с EV, *например* экзосомами из предшествующего уровня техники, *например* полученные с использованием обычных белков EV, *например* экзосомных белков.

[00343] Более того, EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом по настоящему раскрытию могут обладать более высокой, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению с EV, *например* экзосомами со сконструированным просветом, известными в данной области техники. Например, EV, *например* экзосома со сконструированным просветом, содержащая полезную нагрузку, *например* терапевтическую или биологически значимую экзогенную последовательность, слитую с белком или его фрагментом, описанным в настоящем документе (*например* каркасным белком по настоящему раскрытию, таким как BASP1 или его фрагмент, вариант или производное) EV, *например* экзосомы, может иметь больше необходимых сконструированных характеристик, чем слияние с каркасами, известными в данной области техники.

[00344] Каркасные белки, известные в данной области техники, 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, лактадгерин и его фрагменты и пептиды, которые имеют аффинность к любому из этих белков или их фрагментов. Во избежание сомнений, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент или вариант не являются обычными белками EV, *например* экзосомными белками. Ранее сверхэкспрессия экзогенных белков основывалась на стохастическом или случайном расположении экзогенных белков в экзосоме для получения экзосом со сконструированным просветом. Это приводило к низкой и непредсказуемой плотности экзогенных белков в экзосомах. Таким образом, белки EV, *например* экзосомные белки и их фрагменты, описанные в настоящем документе, обеспечивают важные достижения в новых композициях EV, *например* экзосом и способах их получения.

[00345] Слитые белки, предложенные в настоящем документе, могут содержать каркасный белок, например экзосомный просветный белок по настоящему раскрытию, такой как MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент, вариант или производное, и дополнительный пептид. Дополнительный пептид может быть присоединен либо к N-концу, либо к C-концу белка (каркасного белка) или его фрагмента, варианта или производного EV, *например* экзосомы.

[00346] В некоторых вариантах осуществления слитые белки, предложенные в настоящем документе, содержат каркасный белок по настоящему раскрытию, такой как MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или их фрагмент, вариант или производное, и два дополнительных пептида. Оба из двух дополнительных пептидов могут быть присоединены либо к N-концу, либо к C-концу белка (каркасного белка) или его фрагмента,

варианта или производного EV, *например* экзосомы. В некоторых вариантах осуществления один из двух дополнительных пептидов присоединен к N-концу, а другой из двух дополнительных пептидов присоединен к C-концу белка (каркасного белка) или его фрагмента, варианта или производного EV, *например* экзосомы.

[00347] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы получения внеклеточных везикул со сконструированным просветом, описанные в настоящем документе, содержат нановезикулы.

IV. Клетка-продуцент для получения EV, *например* экзосом со сконструированной поверхностью

[00348] EV, *например* экзосомы по настоящему раскрытию, могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro* или в биологической жидкости субъекта. Когда EV, *например* экзосомы, получают из культуры клеток *in vitro*, для настоящего раскрытия можно использовать различные клетки-продуценты, *например* клетки НЕК293. Дополнительные типы клеток, которые могут быть использованы для получения EV, *например* экзосом со сконструированным просветом, описанные в настоящем документе, включают, но не ограничиваясь ими, мезенхимальные стволовые клетки, Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки, макрофаги и линии раковых клеток.

[00349] Соответственно, в настоящем раскрытии представлены клетки, которые продуцируют EV, *например* экзосомы по настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления предложены один или несколько векторов, при этом векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую каркасный белок и полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует каркасный белок, а вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая каркасный белок, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, находятся в одной открытой рамке считывания; таким образом, продуктом экспрессии может быть слитый белок, содержащий каркасный белок, слитый с полезной нагрузкой, *например* биологически активная молекула. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

[00350] Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения одной или нескольких экзогенных последовательностей для получения EV, *например*

экзосом со сконструированным просветом. Генетически модифицированная клетка-продуцент может содержать экзогенную последовательность с помощью временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть трансформированной в виде плазмиды. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-продуцента в целевом сайте или в случайном сайте. В некоторых вариантах осуществления получают стабильную клеточную линию для получения EV, *например* экзосом со сконструированным просветом.

[00351] Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-продуцента, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей, белок EV, *например* экзосомный белок. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-продуцент можно использовать различные способы, известные в данной области техники. 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 раскрытия.

[00352] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую каркасный белок по настоящему раскрытию (*например* белок или модификацию EV, *например* экзосомы, или фрагмент белка EV, *например* экзосомного белка). Дополнительная копия последовательности, кодирующей каркасный белок (*например* белок EV, *например* экзосомный белок), может быть введена для получения EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, имеющей более высокую плотность белка EV, *например* экзосомного белка. Экзогенная последовательность, кодирующая модификацию или фрагмент белка EV, *например* экзосомного белка, может быть введена для получения EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, содержащей модификацию или фрагмент белка EV, *например* экзосомного белка. Экзогенная последовательность, кодирующая аффинную метку, может быть введена для получения EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, содержащей слитый белок, содержащий аффинную метку, присоединенную к белку EV, *например* экзосомному белку.

[00353] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосома со сконструированным просветом, имеет более высокую плотность белка (каркасного белка) EV, *например* экзосомного белка, чем нативные EV, *например* экзосомы, выделенные из того же или аналогичных типов клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления указанный белок (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, присутствует с плотностью, которая в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1000 раз или более превышает

плотность на указанной EV, *например* экзосоме со сконструированным просветом, чем на нативной EV, *например* экзосоме. В некоторых вариантах осуществления белок (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, присутствует 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 EV, *например* экзосоме со сконструированным просветом, чем на нативной EV, *например* экзосоме. В некоторых вариантах осуществления слитий белок, содержащий белок (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, присутствует 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 EV, *например* экзосоме со сконструированным просветом, чем немодифицированный белок (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, на нативной EV, *например* экзосоме. В некоторых вариантах осуществления фрагмент или вариант белка (каркасного белка) EV, *например* экзосомы, присутствует 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 EV, *например* экзосоме со сконструированным просветом, чем немодифицированный белок (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, на нативной EV, *например* экзосоме.

[00354] В определенных вариантах осуществления MARCKS, фрагмент или вариант MARCKS или его модификация присутствует 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 EV со сконструированным просветом, *например* экзосоме, чем немодифицированный MARCKS на указанной нативной EV, *например* экзосоме. В некоторых вариантах осуществления MARCKSL1, фрагмент или вариант MARCKSL1 или его модификация присутствует 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 EV со сконструированным просветом, *например* экзосоме, чем немодифицированный MARCKSL1 на указанной нативной EV, *например* экзосоме. В некоторых вариантах осуществления BASP1, фрагмент или вариант BASP1 или его модификация присутствует 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 EV со сконструированным просветом, *например* экзосоме, чем немодифицированный BASP1 на указанной нативной EV, *например* экзосоме.

[00355] В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель 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 (каркасный белок) EV, *например* экзосомы, или модификацию или фрагмент белка (каркасного белка) EV, *например* экзосомы, а другая кодирует полезную нагрузку.

[00356] Более конкретно, EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей один или несколько экзосомных просветных белков (каркасных белков), включая, но не ограничиваясь ими, (1) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS); (2) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный 1 (MARCKSL1); и (3) кислый растворимый белок 1 головного мозга (BASP1). Любой из одного или нескольких просветных белков (каркасных белков) EV, *например* экзосомы, описанных в настоящем документе, могут быть экспрессированы из плазмиды, экзогенной последовательности, вставленной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая информационная РНК (mRNA).

[00357] В некоторых вариантах осуществления один или несколько просветных белков (каркасных белков) EV, *например* экзосомы, экспрессируется в клетке, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей ее полноразмерную эндогенную форму. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKS SEQ ID NO: 1 или соответствующую последовательность без N-концевого М. В определенных аспектах такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKS SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKS SEQ ID NO: 1, при этом белок MARCKS, кодируемый экзогенной последовательностью, не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKSL1 SEQ ID NO: 2 или соответствующую последовательность без N-концевого М. В определенных аспектах такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKSL1 SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок MARCKSL1 SEQ ID NO: 2, при этом белок MARCKSL1, кодируемый экзогенной последовательностью, не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок BASP1 SEQ ID NO: 3 или соответствующую последовательность без N-концевого М. В определенных аспектах такая экзогенная последовательность кодирует белок BASP1 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок BASP1 SEQ ID NO: 3,

при этом белок BASP1, кодируемый экзогенной последовательностью, не содержит N-концевого Met.

[00358] EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, могут быть получены из клетки, трансформированной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей фрагмент одного или нескольких просветных белков (каркасных белков) EV, *например* экзосомы, включая, но не ограничиваясь ими, (1) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS); (2) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный 1 (MARCKSL1); и (3) кислый растворимый белок 1 головного мозга (BASP1).

[00359] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность кодирует фрагмент просветного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), EV, *например* экзосомы, не содержащий по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот от N-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность кодирует фрагмент просветного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), EV, *например* экзосомы, не содержащий по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность кодирует фрагмент просветного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), EV, *например* экзосомы, не содержащий по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200 или 300 аминокислот как от N-, так и от C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность кодирует фрагмент просветного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), EV, *например* экзосомы, не содержащий один или несколько функциональных или структурных доменов нативного белка.

[00360] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пептид SEQ ID NO: 4-109, соответствующую последовательность без N-концевого M или любые последовательности каркасного белка, описанные в настоящем документе (например, Табл. 1) без N-концевого M. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пептид с SEQ ID NO: 4-109 или любую последовательность каркасного белка, описанную в настоящем документе (например, Табл. 1), при этом слитый белок не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пептид SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пептид SEQ ID NO: 13, при этом слитый белок не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок,

содержащий пептид с последовательностью MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 117) или GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425), при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий пептид с последовательностью GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425), при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту, и при этом каркасный белок, например экзосомный просветный белок не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий пептид с последовательностью GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425), при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту, и при этом слитый белок не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, содержащий аминокислотную последовательность GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425), при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту, при этом каркасный белок не имеет Met на N-конце аминокислотной последовательности, например, содержит MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 117). В других вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий аминокислотную последовательность GXKLSKKK (SEQ ID NO: 425), при этом слитый белок не содержит MGXKLSKKK. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, содержащий пептидную последовательность (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий аминокислотную последовательность (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), при этом или слитый белок не содержит (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+). В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий пептидную последовательность (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В других вариантах осуществления слитый белок содержит каркасный белок, например экзосомный просветный белок, содержащий аминокислотную последовательность (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом или слитый белок не содержит (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+).

[00361] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей белок EV, *например* экзосомный белок (*например* каркасный белок, *например*, экзосомный просветный белок, такой как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1), или его фрагмент или его модификацию, слитые с одним или несколькими гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков слиты с N-концом белка EV, *например* экзосомного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1) или его модификации, в частности, его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков слиты C-концом белка EV, *например* экзосомного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1) или его модификации, в частности, его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных белков слиты с N-концом и C-концом белка EV, *например* экзосомного белка (*например* каркасного белка, такого как MARCKS, MARCKSL1 или BASP1) 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.

[00362] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, получают из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей полипептид с последовательностью, идентичной или подобной полноразмерному просветному белку (каркасному белку) или его фрагменту EV, *например* экзосомы, включая, но не ограничиваясь ими,

- (1) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C (MARCKS);
- (2) миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный 1 (MARCKSL1); и

(3) кислый растворимый белок 1 головного мозга (BASP1).

[illegible]

например экзосомы, *например* на 90% идентичен SEQ ID NO: 1-3 или любой из соответствующих последовательностей без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 95% идентичен полноразмерному просветному белку (каркасному белку) или его фрагменту нативной EV, *например* экзосомы, *например* на 95% идентичен SEQ ID NO: 1-3 или любой из соответствующих последовательностей без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 99% идентичен полноразмерному просветному белку (каркасному белку) или его фрагменту нативной EV, *например* экзосомы, *например* на 99% идентичен SEQ ID NO: 1-3 или любой из соответствующих последовательностей без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичен полноразмерному просветному белку (каркасному белку) или его фрагменту нативной EV, *например* экзосомы, *например* на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1-3 или любой из соответствующих последовательностей без N-концевого М.

[00364] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, продуцируемые из клетки, содержат полипептид с последовательностью, идентичной или подобной фрагменту кислого растворимого белка 1 головного мозга (BASP1). В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, Табл. 1, без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 55% идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, Табл. 1, без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 60% идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 60% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, Табл. 1, без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 65% идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 65% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым

[illegible]

идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, Табл. 1, без N-концевого М. В некоторых вариантах осуществления полипептид на приблизительно 100% идентичен полноразмерному BASP1 или его фрагменту, *например* на приблизительно 100% идентичен SEQ ID NO: 4-109, соответствующей последовательности без N-концевого М или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, Табл. 1, без N-концевого М.

[00365] В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы со сконструированным просветом, продуцируемые из клетки, содержат полипептид с последовательностью, идентичной или подобной фрагменту кислого растворимого белка 1 головного мозга (BASP1), при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен полноразмерному BASP1 или фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен SEQ ID NO: 4-109 или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, в Табл. 1, при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 55% идентичен полноразмерному BASP1 или фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 50% идентичен SEQ ID NO: 4-109 или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, в Табл. 1, при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид на по меньшей мере приблизительно 60% идентичен полноразмерному BASP1 или фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 60% идентичен SEQ ID NO: 4-109 или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, в Табл. 1, при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 65% идентичен полноразмерному BASP1 или фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 65% идентичен SEQ ID NO: 4-109 или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, в Табл. 1, при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых вариантах осуществления полипептид на по меньшей мере приблизительно 70% идентичен полноразмерному BASP1 или фрагменту, *например* на по меньшей мере приблизительно 70% идентичен SEQ ID NO: 4-109 или любым последовательностям BASP1, описанным в настоящем документе, например, в Табл. 1, при этом полипептид не содержит N-концевого Met. В некоторых

[illegible]

VI. Способы получения

[0034] EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию могут быть получены с помощью химического синтеза, технологии рекомбинантной ДНК, биохимической или ферментативной фрагментации более крупных молекул, комбинаций вышеперечисленного или с помощью любого другого способа. В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии предложен способ конъюгирования биологически активной молекулы с EV (*например* экзосомой). Способ включает связывание биологически активной молекулы с EV (*например* экзосомой), как описано выше.

[0035] В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия EV, *например* экзосомы по настоящему раскрытию, могут быть получены с использованием клеток-продуцентов, как описано выше. Соответственно, в настоящем раскрытии предложен способ получения EV, *например* экзосом, включающий культивирование клетки-продуцента, раскрываемой в настоящем документе, в подходящих условиях и получение EV, *например* экзосом по настоящему раскрытию.

[0036] В других вариантах осуществления каркасные белки, *например* экзосомные просветные белки по настоящему раскрытию могут быть получены рекомбинантно и впоследствии включены в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию. В других вариантах осуществления рекомбинантно получают только полипептидную часть каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептидная часть каркасного белка, полученного рекомбинантно, впоследствии модифицируется, *например* химически или ферментативно, для включения мембранного якоря (*например* N-концевой миристиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, полученный полурекомбинантным способом (*т.е.*, объединение рекомбинантного продукта части полипептида с последующей химической или ферментативной модификацией), впоследствии включается в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию.

[0037] В других вариантах осуществления каркасные белки, *например* экзосомные просветные белки по настоящему раскрытию могут быть получены химически, *например* с помощью твердофазного пептидного синтеза, и впоследствии включены в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию. В других вариантах осуществления синтетически получают только полипептидную часть каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептидная часть каркасного белка, полученного синтетически, впоследствии модифицируется, *например* химически или ферментативно, для включения мембранного якоря (*например* N-концевой миристиновой кислоты). В некоторых вариантах

осуществления каркасный белок, полученный полусинтетическим способом (*т.е.*, объединение синтетического продукта части полипептида с последующей химической или ферментативной модификацией), впоследствии включается в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию.

[0038] В других вариантах осуществления каркасные белки, *например* экзосомные просветные белки по настоящему раскрытию могут быть получены *in vitro*, *например* с помощью бесклеточной экспрессии такой ретикулоцитарной системы, и впоследствии включены в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию. В других вариантах осуществления *in vitro*, *например* в бесклеточной системе получают только полипептидную часть каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептидная часть каркасного белка, полученного *in vitro*, *например* в бесклеточной системе, впоследствии модифицируется, *например* химически или ферментативно, для включения мембранного якоря (*например* N-концевой миристиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, полученный полу-*in vitro* способами (*т.е.*, объединение *in vitro* продукта части полипептида с последующей химической или ферментативной модификацией), впоследствии включается в EV, *например* экзосому по настоящему раскрытию.

[0039] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают стадию характеристики EV, *например* экзосом, содержащихся в каждой собранной фракции во время их получения и очистки. В некоторых вариантах осуществления содержимое EV, *например* экзосом может быть экстрагировано для изучения и характеристики. В некоторых вариантах осуществления EV, *например* экзосомы выделяются и характеризуются определенными показателями, включая, но не ограничиваясь ими, размер, форму, морфологию или молекулярный состав, такой как нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты и липиды.

VII. Фармацевтические композиции и способы введения

[0040] В настоящем раскрытии также предложены фармацевтические композиции, содержащие EV, описанные в настоящем документе (*например* экзосомы), которые подходят для введения субъекту. Фармацевтические композиции обычно содержат множество EV (*например* экзосом), содержащих по меньшей мере одну полезную нагрузку, *например* биологически активную молекулу, ковалентно или нековалентно связанную с множеством EV (*например* экзосом), и фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель в форме, подходящей для введения субъекту.

[0041] Фармацевтически приемлемые наполнители или носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество EV (*например* экзосом). (См., *например*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990)). Фармацевтические композиции, как правило, составляют стерильными и полностью соответствующими всем нормам Правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько химических соединений, таких как, например, небольшие молекулы, ковалентно связанные с EV (*например* экзосомой), описанные в настоящем документе.

[0042] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько терапевтических или диагностических агентов и EV (*например* экзосому), описанные в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими или диагностическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят до введения дополнительных терапевтических или диагностических агентов. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят после введения дополнительных терапевтических или диагностических агентов. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят одновременно с дополнительными терапевтическими или диагностическими агентами.

[0043] В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, имеющие необходимую степень чистоты, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители или носители могут частично определяться конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество внеклеточных везикул. (См., *например*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005)). Фармацевтические композиции, как правило, составляют стерильными и полностью соответствующими всем нормам Правил

производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

[0044] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько терапевтических или диагностических агентов и EV (*например* экзосому), описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления EV (*например*, экзосомы) вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими или диагностическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят до введения дополнительных терапевтических или диагностических агентов. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят после введения дополнительных терапевтических или диагностических агентов. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосому), вводят одновременно с дополнительными терапевтическими или диагностическими агентами.

[0045] Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов (*например* животных или человека) при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например* комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN[™], PLURONIC[™] или полиэтиленгликоль (PEG).

[0046] Примеры носителей или разбавителей включают, но не ограничиваясь ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо

обычная среда или соединение несовместимо с внеклеточными везикулами, описанными в настоящем документе, предполагается их применение в фармацевтических композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в эти композиции. Обычно фармацевтическая композиция составлена совместимой с предполагаемым путем ее введения. EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, интратуморальным, внутримышечным путем или в виде ингаляций. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая EV (*например* экзосомы), вводится внутривенно, *например* путем инъекции. EV (*например* экзосомы) необязательно можно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые, по меньшей мере, частично эффективны при лечении заболевания, нарушения или состояния, для которого предназначены EV (*например* экзосомы).

[0047] Растворы или суспензии могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы.

[0048] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Парсипини, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Композиция обычно является стерильной и жидкой до той степени, до которой существует возможность легкого введения через шприц. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, *например* воду, этанол, полиол (*например* глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, *например* путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-

активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнута посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например* сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто посредством включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например* моностеарата алюминия и желатина.

[0049] Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию в эффективном количестве и в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в настоящем документе, при необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения EV (*например* экзосом) в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и любые другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. EV (*например* экзосомы) можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить устойчивое или пульсирующее высвобождение EV (*например* экзосом).

[0050] Системное введение композиций, содержащих EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, также может осуществляться с помощью трансмукозальных путей. Для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники, и включают, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может быть осуществлено за счет использования *например*, назальных спреев.

[0051] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, вводится внутривенно субъекту, которому фармацевтическая композиция может принести пользу. В определенных других вариантах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, *например* путем внутрилимфатической инъекции или путем внутриузловой инъекции (см., *например*, Senti *et al.*, PNAS 105 (46): 17908 (2008)), или путем

внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем интратуморальной инъекции, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[0052] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, вводят в виде жидкой суспензии. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде состава, способного образовывать депо после введения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления депо медленно высвобождает EV (*например* экзосомы) в кровоток или остается в форме депо.

[0053] Обычно фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, чтобы не содержать примесей, они биосовместимы и нетоксичны и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, вода является высокоочищенной и очищенной от контаминантов, *например* эндотоксинов.

[0054] Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное масло, но не ограничиваясь ими. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать скользящее вещество, смачивающее вещество, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент, суспендирующий агент и/или консервант.

[0055] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат EV (*например* экзосомы), описанные в настоящем документе, и необязательно фармацевтически активный или терапевтический агент и/или диагностический агент. Терапевтический агент может представлять собой биологический агент, агент на основе малой молекулы или агент на основе нуклеиновой кислоты. Диагностический агент может представлять собой, *например* контрастный реагент.

[0056] Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосомы), описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для интратуморальной инъекции.

[0057] В определенных вариантах осуществления препарат EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию подвергается воздействию облучения, *например* рентгеновских лучей, гамма-лучей, бета-частиц, альфа-частиц, нейтронов, протонов, элементарных ядер,

УФ-лучей для повреждения остаточных репликационно-компетентных нуклеиновых кислот.

[0058] В определенных вариантах осуществления препарат EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию подвергается гамма-облучению с использованием дозы облучения более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 кГр.

[0059] В определенных вариантах осуществления препарат EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию подвергают облучению рентгеновскими лучами с использованием дозы облучения более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или

[0060] EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию можно использовать одновременно с другими лекарственными средствами. В частности, EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию можно использовать вместе с лекарственными средствами, такими как гормональные терапевтические агенты, химиотерапевтические агенты, иммунотерапевтические агенты, лекарственные препараты, ингибирующие действие факторов роста клеток или рецепторов факторов роста клеток, и т.п.

VIII. Терапевтические виды применения

[0061] В настоящем раскрытии предложены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию. В настоящем раскрытии также предложены способы предупреждения или облегчения симптомов заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию. Также предложены способы диагностики заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию. Также предложены EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию для использования в терапии, для использования в качестве лекарственного средства, для использования при лечении заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, для использования для предупреждения или облегчения симптомов заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, или для диагностики заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом.

[0062] В одном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное заболевание, нейродегенеративное нарушение, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ.

[0063] В настоящем раскрытии также предложены способы предупреждения и/или лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту EV (*например* экзосомы), раскрываемой в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью способов по настоящему раскрытию, включает рак, реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), аутоиммунное заболевание, инфекционные заболевания или фиброзные заболевания. В некоторых вариантах осуществления лечение является профилактическим. В других вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию используются для индукции иммунного ответа. В других вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию используются для вакцинации субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак.

[0064] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой онкогенный вирус. В некоторых вариантах осуществления инфекционные заболевания, которые можно лечить согласно настоящему раскрытию, включают, но не ограничиваясь ими, человеческий гамма-вирус герпеса 4 (вирус Эпштейна-Барра), вирус гриппа А, вирус гриппа В, цитомегаловирус, золотистый стафилококк, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, HIV-1, HIV-2, коронавирусы (*например* MERS-CoV и SARS CoV), филовирусы (*например* Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, виды *Plasmodia* (*например* *vivax* и *falciparum*), вирус Чикунга, вирус папилломы человека (HPV), вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус герпеса человека 8, вирус простого герпеса 2 (HSV2), *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Actinobacter* sp., коагулаза-отрицательные стафилококки (CoNS), *Mycoplasma* sp. или их комбинации.

[0065] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) инфузируют в подходящей жидкости и вводят в вену субъекта.

[0066] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[0067] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят субъекту с помощью интратекального введения. В некоторых вариантах осуществления EV (*например*

экзосомы) вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (CSF).

[0068] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят интратуморально в одну или несколько опухолей субъекта.

[0069] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят субъекту интраназальным путем. В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) можно инсуфлировать через нос в форме местного введения или системного введения. В определенных вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят с помощью назального спрея.

[0070] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят субъекту с помощью внутрибрюшинного введения. В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) инфузируют в подходящей жидкости и вводят в брюшину субъекта. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению EV (*например* экзосом) в лимфатических сосудах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению EV (*например* экзосом) в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению EV (*например* экзосом) в одном или нескольких лимфатических узлах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению EV (*например* экзосом) в одном или нескольких шейных лимфатических узлах, паховых лимфатических узлах, средостенных лимфатических узлах или грудных лимфатических узлах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению EV (*например* экзосом) в поджелудочной железе.

[0071] В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят субъекту с помощью периокулярного введения. В некоторых вариантах осуществления EV (*например* экзосомы) вводят в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственного средства включает пути субконъюнктивального, переднего субтеноновского, заднего субтеноновского и ретробульбарного введения.

IX. Наборы

[0072] В настоящем раскрытии также предложены наборы или изделия, содержащие одну или несколько EV (*например* экзосом) по настоящему раскрытию и необязательно инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор или изделие содержит фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, которая

содержит по меньшей мере одну EV (*например* экзосому) по настоящему раскрытию и инструкции по применению.

[0073] В некоторых вариантах осуществления набор или изделие содержит по меньшей мере одну EV (*например* экзосому) по настоящему раскрытию или фармацевтическую композицию, содержащую EV (*например* экзосомы) в одном или нескольких контейнерах. Специалист в данной области легко поймет, что EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, фармацевтическая композиция, содержащая EV (*например* экзосомы) по настоящему раскрытию, или их комбинации могут быть легко включены в один из установленных форматов набора, которые хорошо известны в данной области техники.

[0074] В некоторых вариантах осуществления набор или изделие содержит (i) EV (*например* экзосомы), (ii) одну или несколько полезных нагрузок, *например* биологически активные молекулы, (ii) реагенты для ковалентного присоединения одной или нескольких полезных нагрузок, *например* биологически активных молекул к EV (*например* экзосомам), или (iv) любую их комбинацию, и инструкции по проведению реакции для ковалентного присоединения одной или нескольких полезных нагрузок, *например* биологически активных молекул к EV (*например* экзосомам).

[0075] В некоторых вариантах осуществления набор содержит реагенты для конъюгирования полезной нагрузки, *например* биологически активной молекулы с EV (*например* экзосомой), и инструкции по проведению конъюгации.

[0076] Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*,

Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Ed. CRC Press (2007), и в Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1		MGAQFSKTAACKGEAAAERPGEAAVASSPSKANGQENGHV KVNGDASPAAAESGAKEELQANGSAPAADKEEPAAAGSG AASPSAAEKGEPAAAAAPEAGASPVEKEAPAEGEAAEPGS PTAAEGEAASAASSTSSPKAEDGATPSPSNETPKKKKKRFS FKKSFKLSGFSFKKNKKEAGEGGEAEAPAAEGGKDEAAGG AAAAAAEAGAASGEQAAAPGEEAAAGEEGAAGGDPQEA KPQEAAVAPEKPPASDETKAAEEPSKVEEKKAEEAGASAA ACEAPSAAGPGAPPEQEAAPAEPPAAAAASSACAAPSQEA QPECSPEAPPAEAAE
2		MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGD LSPKGEGESPPVNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAEAKGEV PPKETPKKKKKFSFKKPKFKLSGLSFKRNRKEGGGDSSASSP TEEEQEQQGEIGACSDGTAQEGKAAATPESQEPQAKGAEA SAASEEEAGPQATEPSTPSGPESGPTPASAEQNE
3		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAATEEEGTPK ESEPQAAAEPAEAKEGKEKPDQDAEGKAEEKEGEKDAAA AKEEAPKAEPEKTEGA AEAKAEPPKAPEQEQAAPGPAAGG EAPKAAEAAAAPAESAAPAAGEEPSKEEGEPKKTEAPAAP AAQETKSDGAPASDSKPGSSEAAPSSKETPAATEAPSSTPK AQGPAASAEPPKPVEAPAANSQDTVTVKE
4		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
5		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE
6		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
7		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKE

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
8		MGGKLSKKKKGYNVNDEK
9		MGGKLSKKKKGYNVN
10		MGGKLSKKKKGY
11		MGGKLSKKKKG
12		MGGKLSKKKK
13		MGGKLSKKK
14		MGGKLSKK
15		MGGKLSK
16		MGGKLAKK
17		MGGKFSKK
18		MGGKFAKK
19		MGGKSSKK
20		MGGKSAKK
21		MGGKQSKK
22		MGGKQAKK
23		MGGQLSKK
24		MGGQLAKK
25		MGGQFSKK
26		MGGQFAKK
27		MGGQSSKK
28		MGGQSAKK
29		MGGQQSKK
30		MGGQQAKK
31		MGAKLSKK
32		MGAKLAKK
33		MGAKFSKK
34		MGAKFAKK
35		MGAKSSKK
36		MGAKSAKK
37		MGAKQSKK
38		MGAKQAKK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
39		MGAQLSKK
40		MGAQLAKK
41		MGAQFSKK
42		MGAQFAKK
43		MGAQSSKK
44		MGAQSAKK
45		MGAQQSKK
46		MGAQQAKK
47		MGSKLSKK
48		MGSKLAKK
49		MGSKFSKK
50		MGSKFAKK
51		MGSKSSKK
52		MGSKSAKK
53		MGSKQSKK
54		MGSKQAKK
55		MGSQLSKK
56		MGSQLAKK
57		MGSQFSKK
58		MGSQFAKK
59		MGSQSSKK
60		MGSQSAKK
61		MGSQQSKK
62		MGSQQAKK
63		MGGKLAK
64		MGGKFSK
65		MGGKFAK
66		MGGKSSK
67		MGGKSAK
68		MGGKQSK
69		MGGKQAK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
70		MGGQLSK
71		MGGQLAK
72		MGGQFSK
73		MGGQFAK
74		MGGQSSK
75		MGGQSAK
76		MGGQQSK
77		MGGQQAK
78		MGAKLSK
79		MGAKLAK
80		MGAKFSK
81		MGAKFAK
82		MGAKSSK
83		MGAKSAK
84		MGAKQSK
85		MGAKQAK
86		MGAQLSK
87		MGAQLAK
88		MGAQFSK
89		MGAQFAK
90		MGAQSSK
91		MGAQSAK
92		MGAQQSK
93		MGAQQAK
94		MGSKLSK
95		MGSKLAK
96		MGSKFSK
97		MGSKFAK
98		MGSKSSK
99		MGSKSAK
100		MGSKQSK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
101		MGSKQAK
102		MGSQLSK
103		MGSQLAK
104		MGSQFSK
105		MGSQFAK
106		MGSQSSK
107		MGSQSAK
108		MGSQQSK
109		MGSQQAK
110		MGAKLSKKK
111		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASGGSGGSD YKDDDDKGGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFA NGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKG AWRSYLNMELTIPFATNSDCELVKAMQGLLKDGNPIPSAI AANS GIY
112		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASGGSGGSD YKDDDDKGGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFA NGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKG AWRSYLNMELTIPFATNSDCELVKAMQGLLKDGNPIPSAI AANS GIY
113		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASGGSGGSD YKDDDDKGGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFA NGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKG AWRSYLNMELTIPFATNSDCELVKAMQGLLKDGNPIPSAI AANS GIYGSGGSGGSGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVT VAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTI KVEVPKGAWRSYLNMELTIPFATNSDCELVKAMQGLLK DGNPIPSAIAANS GIY
114		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASGGSGGSD YKDDDDKGGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFA NGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKG

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
		AWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGGLKDGNIPIPSAI AANSIGYGS GGSGGSGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVT VAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTI KVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGGLK DGNPIPSAIAANSIGY
115		augaagcccaccgagaacaacgaagacucaacaucguggccguggccagcaacuuc gcgaccacggauucgugaucgugaccgcgggaaguugcccggcaagaagcugccgcu ggaggugcucaaagaguuggaagccaaugccggaaagcuggcugcaccaggggcu gucgaucugccuguccacaucaagugcacgccaagaugaagaagucauccag gacgcugccacaccuacgaaggcgacaaagaguccgcacagggcggaucaggcgagg cgauucgucgacauuccugagauuccugggguucaaggacuuggagccuuggagcag uucaucgcacaggugcugaucugugugggacugcacaacuggcugccucaaagggcu ugccaacgugcaguguucugaccugcucaagaaguggcugccgcaacgcugugcga ccuuugccagcaagauccagggccagguggacaagaucaagggggccgguggugac uaaggauccaucgauaagcucaucgaaacaugagggaucacccaauaucgagucga caucgaaacaugagggaucacccaugucugcagucgacaucgaaacaugagggaucacc caugucugcagucgacaucgaaacaugagggaucacccaugucugcagucgacaucga aa
116	X представляет собой любую аминокислоту	MGXKLSKKK
117	X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту	MGXKLSKKK
118	X1=(G/A/S); X2=(K/Q); X3=(L/F/S/Q); X4=(S/A)	MGX1X2X3X4KK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
119		tggaggtgctcaaagagttg
120		ttgggcgtgcacttgat
121		gggcattggcttc
122		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASAGGGGSD YKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
123		MAGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASAGGGGSD YKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
124		MGAKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASAGGGGSD YKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
125		MAAKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASAGGGGSD YKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
126		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAESAGGGGSDYKD DDDKGGGGSVSKGEELFTG
127		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKSAGGGGSDYKDDDD KGGGGSVSKGEELFTG
128		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKESAGGGGSDYKDDDDKGG GGSVSKGEELFTG
129		MGGKLSKKKKGYNVNDEKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKGEELFTG
130		MGGKLSKKKKGYNVNSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSK GEELFTG
131		MGGKLSKKKKGYSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEE LFTG
132		MGGKLSKKKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
133		MGGKLSSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
134		MGGSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
135		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAASAGGGGSD YKDDDDKGGGGSVSKG
136		MGGKLSKKKKGYSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
137		MGGKLSKKKKGSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
138		MGGKLSKKKKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
139		MGGKLSKKKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
140		MGGKLSKKKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
141		MGGKLSKSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
142		MGGKLSSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG
143		MGGKLDKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
144		MGGKLAKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
145		MGGKQSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
146		MGAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
147		MAAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
148		MGAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
149		MGAKKAKKRFSFKKPFKLSGFSFKKNKKEA
150		MGGKLSKKKKSAGGSGGSTSGSGDYKDDDDKGS GFEMD QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQ APGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTV YLQMNSLKPEDTAVYYCENVNVGF EYWGGGTQVTVSS
151		KKKK
152		KKKKK
153		RRRR
154		RRRRR
155		(K/R)(K/R)(K/R)(K/R)
156		(K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R)
157		GGKLSKK
158		GAKLSKK
159		GGKQSKK
160		GGKLAKK
161		GGKLSKKK
162		GGKLSKKS
163		GAKLSKKK
164		GAKLSKKS
165		GGKQSKKK
166		GGKQSKKS

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
167		GGKLAKKK
168		GGKLAKKS
169		GGKLSKKKKGYNVN
170		GAKLSKKKKGYNVN
171		GGKQSKKKKKGYNVN
172		GGKLAKKKKKGYNVN
173		GGKLSKKKKGYSGG
174		GGKLSKKKKGSGGS
175		GGKLSKKKKSGGSG
176		GGKLSKKKSGGSGG
177		GGKLSKKSGGSGGS
178		GGKLSKSGGSGGSV
179		GAKKSKKRFSFKKS
180		(M)(G)(G)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
181		(M)(G)(A)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
182		(M)(G)(S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
183		(M)(G)(G/A/S)(K)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
184		(M)(G)(G/A/S)(Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
185		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L)(S/A)(K)(K)
186		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(F)(S/A)(K)(K)
187		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(S)(S/A)(K)(K)
188		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(Q)(S/A)(K)(K)
189		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S)(K)(K)
190		(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(A)(K)(K)
191		(G)(G)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
192		(G)(A)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
193		(G)(S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
194		(G)(G/A/S)(K)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
195		(G)(G/A/S)(Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
196		(G)(G/A/S)(K/Q)(L)(S/A)(K)(K)
197		(G)(G/A/S)(K/Q)(F)(S/A)(K)(K)

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
198		(G)(G/A/S)(K/Q)(S)(S/A)(K)(K)
199		(G)(G/A/S)(K/Q)(Q)(S/A)(K)(K)
200		(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S)(K)(K)
201		(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(A)(K)(K)
202		(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)
203		GGKLSK
204		GAKLSK
205		GGKQSK
206		GGKLAK
207		KKKG
208		KKKGY
209		KKKGYN
210		KKKGYNV
211		KKKGYNVN
212		KKKGYS
213		KKKGYG
214		KKKGYGG
215		KKKGS
216		KKKGGS
217		KKKGSG
218		KKKGSGS
219		KKKS
220		KKKSG
221		KKKSGG
222		KKKSGGS
223		KKKSGGSG
224		KKSGGSGG
225		KKKSGGSGGS
226		KRFSFKKS
227		GGKLSK KKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
228		GGKLSK KKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGA

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
229		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEG
230		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE
231		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA
232		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK
233		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
234		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD
235		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEK
236		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
237		GGKLSKKKKGYNVNDEKAK
238		GGKLSKKKKGYNVNDEKA
239		GGKLSKKKKGYNVNDEK
240		GGKLSKKKKGYNVNDE
241		GGKLSKKKKGYNVND
242		GGKLSKKKKGYNV
243		GGKLSKKKKGYN
244		GGKLSKKKKGY
245		GGKLSKKKKG
246		GGKLSKKKK
247		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
248		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
249		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
250		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
251		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
252		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
253		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK
254		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSF
255		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFS
256		GAKKSKKRFSFKKSFKLSGF
257		GAKKSKKRFSFKKSFKLSG
258		GAKKSKKRFSFKKSFKLS
259		GAKKSKKRFSFKKSFKL

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
260		GAKKSKKRFSFKKSF
261		GAKKSKKRFSFKKSF
262		GAKKSKKRFSFKK
263		GAKKSKKRFSFK
264		GAKKSKKRFSF
265		GAKKSKKRFS
266		GAKKSKKRF
267		GAKKSKKR
268		GAKKSKK
269		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
270		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
271		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
272		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
273		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
274		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
275		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFK
276		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSF
277		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFS
278		GAKKAKKRFSFKKSFKLSGF
279		GAKKAKKRFSFKKSFKLSG
280		GAKKAKKRFSFKKSFKLS
281		GAKKAKKRFSFKKSFKL
282		GAKKAKKRFSFKKSFK
283		GAKKAKKRFSFKKSF
284		GAKKAKKRFSFKKS
285		GAKKAKKRFSFKK
286		GAKKAKKRFSFK
287		GAKKAKKRFSF
288		GAKKAKKRFS
289		GAKKAKKRF
290		GAKKAKKR

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
291		GAKKAKK
292		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
293		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK
294		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSF
295		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFS
296		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGF
297		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSG
298		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLS
299		GAQESKKKKKKRFSFKKSFKL
300		GAQESKKKKKKRFSFKKSFK
301		GAQESKKKKKKRFSFKKSF
302		GAQESKKKKKKRFSFKKS
303		GAQESKKKKKKRFSFKK
304		GAQESKKKKKKRFSFK
305		GAQESKKKKKKRFSF
306		GAQESKKKKKKRFS
307		GAQESKKKKKKRF
308		GAQESKKKKKKR
309		GAQESKKKKKK
310		GAQESKKKKK
311		GAQESKKKK
312		GAQESKKK
313		GAQESKK
314		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK
315		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNR
316		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRN
317		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKR
318		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFK
319		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSF
320		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLS
321		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGL

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
322		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSG
323		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLS
324		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKL
325		GSQSSKKKKKKKFSFKKPFK
326		GSQSSKKKKKKKFSFKKPF
327		GSQSSKKKKKKKFSFKKP
328		GSQSSKKKKKKKFSFKK
329		GSQSSKKKKKKKFSFK
330		GSQSSKKKKKKKFSF
331		GSQSSKKKKKKKFS
332		GSQSSKKKKKKKF
333		GSQSSKKKKKK
334		GSQSSKKKKK
335		GSQSSKKKK
336		GSQSSKKK
337		GSQSSKK
338		GGKFSKK
339		GGKFAKK
340		GGKSSKK
341		GGKSAKK
342		GGKQAKK
343		GGQLSKK
344		GGQLAKK
345		GGQFSKK
346		GGQFAKK
347		GGQSSKK
348		GGQSAKK
349		GGQQSKK
350		GGQQAKK
351		GAKLAKK
352		GAKFSKK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
353		GAKFAKK
354		GAKSSKK
355		GAKSAKK
356		GAKQSKK
357		GAKQAKK
358		GAQLSKK
359		GAQLAKK
360		GAQFSKK
361		GAQFAKK
362		GAQSSKK
363		GAQSAKK
364		GAQQSKK
365		GAQQAKK
366		GSKLSKK
367		GSKLAKK
368		GSKFSKK
369		GSKFAKK
370		GSKSSKK
371		GSKSAKK
372		GSKQSKK
373		GSKQAKK
374		GSQLSKK
375		GSQLAKK
376		GSQFSKK
377		GSQFAKK
378		GSQSAKK
379		GSQQSKK
380		GSQQAKK
381		GGKFSK
382		GGKFAK
383		GGKSSK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
384		GGKSAK
385		GGKQAK
386		GGQLSK
387		GGQLAK
388		GGQFSK
389		GGQFAK
390		GGQSSK
391		GGQSAK
392		GGQQSK
393		GGQQAK
394		GAKLAK
395		GAKFSK
396		GAKFAK
397		GAKSSK
398		GAKSAK
399		GAKQSK
400		GAKQAK
401		GAQLSK
402		GAQLAK
403		GAQFSK
404		GAQFAK
405		GAQSSK
406		GAQSAK
407		GAQQSK
408		GAQQAK
409		GSKLSK
410		GSKLAK
411		GSKFSK
412		GSKFAK
413		GSKSSK
414		GSKSAK

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
415		GSKQSK
416		GSKQAK
417		GSQLSK
418		GSQLAK
419		GSQFSK
420		GSQFAK
421		GSQSSK
422		GSQSAK
423		GSQQSK
424		GSQQAK
425		GXKLSKKK

ПРИМЕРЫ

[00366] Следующие примеры приводятся с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять варианты осуществления настоящего раскрытия, однако они не претендуют ни на ограничение объема того, что авторы рассматривают как свое раскрытие, ни на то, что нижеприведенные эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и *т. д.*), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

[00367] 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.

[00368] В практике настоящего раскрытия будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., *например* Т.Е. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); А.Л. 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 минимальной белковой последовательности, достаточной для загрузки полезных нагрузок в просвет экзосомы

[00369] Для идентификации минимальной аминокислотной последовательности BASP1 между усечением из двенадцати аминокислот, которое способствовало загрузке, и усечением из шести аминокислот, которое не способствовало загрузке, как продемонстрировано выше, отдельные усеченные мутанты N-конца BASP1, слитые с меткой FLAG® и GFP, получали и стабильно экспрессировали в клетки HEK293SF (Фиг. 1A). Экзосомы очищали из 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 были неспособны к этому (Фиг. 1B). Эти данные демонстрируют, что по меньшей мере один остаток лизина после положения шесть необходим для загрузки экзосом в просвет с N-концом BASP1, *т.е.*, для прикрепления к просветной поверхности экзосомы.

[00370] Серин в положении 6 BASP1 высоко консервативен у разных видов, а также в MARCKS и MARCKSL1. Для определения того, требовалась ли эта аминокислота для загрузки полезной нагрузки в экзосомы, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали экспрессионными плазмидами, кодирующими BASP1 1-30- FLAG®-GFP или BASP1 1-30- FLAG®-GFP, включая точечный мутант, заменяющий серин шесть на аспарагиновую кислоту (S6D; полярная заряженная замена) или аланин (S6A; небольшая неполярная замена). Кроме того, лизин в пятом положении был мутирован в глутаминовую кислоту (L5Q), чтобы проверить потенциальную роль этого положения в модуляции миристоилирования, пальмитоилирования и других мембранных функций некоторых мембранно-ассоциированных белков (Gottlieb-Abraham et al., Mol. Biol. Cell. 2016 Dec 1;27(24):3926-3936) (Фиг. 2A). BASP1 S6D полностью устранял загрузку GFP в экзосомы, в то время как S6A не изменял загрузку. BASP1 L5Q также не влиял на загрузку в просвете, что указывает на то, что отрицательный заряд в шестом положении нарушает нагрузку, в то время как полярная аминокислотная замена в пятом положении является хорошо переносимой (Фиг. 2B).

[00371] Первые тридцать аминокислот BASP1 содержат идентифицированную выше N-концевую лидерную последовательность, за которой следует богатый лизином участок аминокислот. Для понимания того, могут ли N-концы MARCKS и MARCKSL1 загружать экзосомы аналогично BASP1, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали полноразмерными белками MARCKS и MARCKSL1 или аминокислотами 1-30, слитыми 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 позволяет предположить, что в дистальных областях белков MARCKS и MARCKSL1 требуются дополнительные структурные или последовательные особенности для загрузки (Фиг.3). Анализ последовательностей MARCKS и MARCKSL1 выявил области с потенциальной гомологией последовательностей с N-концом BASP1.

[00372] Аминокислоты 152-173 из MARCKS и 87-110 из MARCKSL1 богаты лизином со вставками фенилаланиновых и сериновых остатков и, как предполагается, являются доменами сайта фосфорилирования (PSD) или эффекторными доменами (ED) (Фиг. 4). Клетки HEK293SF стабильно трансфицировали плазмидными конструкциями, сливающими аминокислоты 1-3 MARCKS с доменом PSD (MG-PSD). Отдельные точечные мутации получали в предполагаемом сайте миристоилирования (MA-PSD) и положении шесть (K6S и K6A) для определения роли этих остатков в загрузке экзосом (Фиг. 5A). Вестерн-блоттинг очищенных экзосом продемонстрировал, 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 приводили к улучшению загрузки, предполагая, что положительный заряд в положении 6 предупреждает загрузку полезной нагрузки в экзосомы и что PSD MARCKS может функционально дополнять эндогенную N-концевую последовательность (Фиг. 5B). В совокупности эти исследования позволили идентифицировать несколько мотивов, достаточных для загрузки полезной нагрузки в экзосомы (Фиг. 6).

[00373] 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) или (G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K) (SEQ ID NO: 202) без первого Met, при этом каждая буква в скобках или группа букв представляет собой положение аминокислоты, и при этом дополнительно положение пять не может представлять собой положительно заряженную аминокислоту (K/R/H), а положение шесть не может представлять собой отрицательно заряженную аминокислоту (D/E).

[00374] Субмотивы мотива 1 включают, но не ограничиваясь ими, белковые последовательности:

(M)(G)(G)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 180),
(G)(G)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 191)
(M)(G)(A)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 181),
(G)(A)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 192),
(M)(G)(S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 182),
(G)(S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 193),
(M)(G)(G/A/S)(K)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 183),
(G)(G/A/S)(K)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 194),
(M)(G)(G/A/S)(Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 184),
(G)(G/A/S)(Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 195),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 185),
(G)(G/A/S)(K/Q)(L)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 196),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(F)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 186),
(G)(G/A/S)(K/Q)(F)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 197),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(S)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 187),
(G)(G/A/S)(K/Q)(S)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 198),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 188),
(G)(G/A/S)(K/Q)(Q)(S/A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 199),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S)(K)(K)	(SEQ ID NO: 189),
(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S)(K)(K)	(SEQ ID NO: 200),
(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 190) и
(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(A)(K)(K)	(SEQ ID NO: 201),

при этом положение пять не может представлять собой положительно заряженную аминокислоту (K/R/H), а положение шесть не может представлять собой отрицательно заряженную аминокислоту (D/E).

[00375] Мотив 2, более широкий мотив, может быть экспрессирован в виде

(M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) без первого Met, при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при

этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). См. R. Aasland et al., FEBS Letters 513 (2002): 141-144 касательно номенклатуры аминокислот.

[00376] Мотив 3, наиболее широкий мотив, может быть экспрессирован в виде (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) без первого Met, при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом 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 при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). Во всех случаях мотивов 1-3 последовательность может быть усечена на одну аминокислоту до семи аминокислот в длину (*m.e.*, состоять из аминокислот 1-7 в порядке, представленном в мотивах 1-3). Любая из последовательностей, полученных из любого из мотивов 1, 2 или 3 (или этих мотивов, лишенных аминокислоты 7), может использоваться для загрузки полезной нагрузки в экзосомы в той же степени, что и полноразмерный BASP1 или естественные усеченные последовательности BASP1 или быть сопоставимой с ними. Этот глубокий анализ структуры и функции аминокислотной последовательности обеспечивает новое понимание требований к направлению биологически экспрессируемой полезной нагрузки в экзосомы клетками-продуцентами.

Пример 2

N-конец BASP1 достаточен для загрузки различных классов белков

[00377] Результаты в Примере 1 предполагают, что N-конец BASP1 может быть пригодным каркасом для конструирования для получения экзосом, нагруженных в простетной области, непосредственно из клеток-продуцентов. Для проверки этой гипотезы создавали стабильные клетки HEK293SF для экспрессии полноразмерного белка Cas9 с оптимизацией кодонов (как описано 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), слитых с аминокислотами 1-30 или 1-10 из BASP1. Экзосомы очищали из клеточной культуры, как описано выше, и анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с использованием антитела к Cas9 (Abcam; № в каталоге ab191468, клон 7A9-3A3). Как изображено на Фиг. 7А, обоих BASP1 1-30 и 1-10 было достаточно для загрузки Cas9 в экзосомы. Рекомбинантный белок Cas9 использовали в качестве положительного контроля для вестерн-блоттинга. Количественная оценка на основе

денситометрии и сравнение различных количеств рекомбинантных линий экзосом Cas9 и BASP1-Cas9 из экспериментов вестерн-блоттинга продемонстрировали, что экзосомы были нагружены 4-5 молекулами Cas9 на экзосому (Фиг. 7B). Этот фермент Cas9, масса которого составляет ~ 160 кДа, представляет значительное увеличение размера полезной нагрузки по сравнению с экспериментами с GFP, продемонстрированными выше.

[00378] В качестве дополнительной проверки разнообразия белков полезной нагрузки, которые могут быть загружены в виде слияния с N-концом BASP1, овальбумин стабильно экспрессировался в клетках HEK293SF в виде слияния с аминокислотами 1-10 BASP1 («BASP1(1-10)-OBA»). Отдельную клеточную линию котрансфицировали той же плазмидой и второй плазмидой, кодирующей тримерный CD40L, слитый со специфическим для экзосомы поверхностным гликопротеином PTGFRN («3xCD40L-PTGFRN») с использованием второго селектируемого маркера. Экзосомы очищали из двух трансфицированных культур клеток и анализировали с помощью SDS-PAGE (Фиг. 8A) и вестерн-блоттинга антитела к овальбумину (Abcam; № в каталоге ab17293, клон 6C8) (Фиг. 8B). В качестве контроля рекомбинантный овальбумин (InvivoGen; № в каталоге vas-prova) титровали в отдельном геле. Овальбумин устойчиво загружали в экзосомы при слиянии с аминокислотами 1-10 BASP1 в виде единой конструкции или в комбинации с дополнительной сверхэкспрессионной плазмидой (3xCD40L-PTGFRN). Этот результат демонстрирует, что экзосомы могут быть сконструированы комбинаторно как с полезной нагрузкой в просвете, так и с одновременной полезной нагрузкой на поверхности (*например* PTGFRN) из отдельного транскрипта.

[00379] Другой класс белков, которые могут быть использованы в контексте терапевтических экзосом, представлен антителами и фрагментами антител. Одноцепочечное нанотело верблюдовых, направленное 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 экспрессировалось в клетках HEK293SF в виде белка слияния с аминокислотами 1-10 BASP1 и меткой FLAG® («BASP1(1-10)-нанотело») или только с меткой FLAG® («нанотело») (Фиг. 9A). Очищенные экзосомы анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга антитела к FLAG®, демонстрируя значительное обогащение нанотела равными количествами общего загруженного белка при слиянии нанотела с N-концом BASP1 (Фиг. 9B). Эти результаты демонстрируют, что белковые полезные нагрузки различных классов могут быть экспрессированы и упакованы в экзосомы клетками-продуцентами с использованием очень короткой белковой последовательности, происходящей от N-конца BASP1, *т.е.*, каркаса.

Пример 3

N-конец BASP1 может использоваться для загрузки нуклеиновых кислот в просвете экзосом

[00380] Нуклеиновые кислоты и, в частности, РНК (*например* mRNA, siRNA, miRNA) представляют собой перспективный класс терапевтических полезных нагрузок, загружаемых в просвет терапевтических экзосом. Загрузка РНК в экзосомы может защищать РНК от расщепления во внеклеточной среде, и загруженная экзосома может быть направлена в определенные клетки и/или ткани посредством дополнительных уровней конструирования экзосом, *например* поверхностной экспрессии нацеливающей конструкции. Для понимания того, можно ли использовать белки EV, *например* экзосомные белки (или фрагменты белков), идентифицированные выше, для получения экзосом, нагруженных mRNA, получали комбинаторно сконструированные экзосомы. Как продемонстрировано на Фиг. 10, аминокислоты 1-30 BASP1 были экспрессированы в виде слияния с FLAG® и вариантами фагового белка MCP. MCP распознает и связывается с петлей стебля mRNA, называемой MS2, которая может быть экспрессирована в виде транскрипционного слияния с mRNA и другими РНК, таким образом управляя физической ассоциацией между слитыми белками MCP и РНК слитого MS2, представляющими интерес. Мутационный анализ ранее идентифицировал два положения в MCP, которые увеличивают аффинность к MS2; замену валина на изолейцин в положении 29 (V29I; Lim & Peabody, RNA. Nucleic Acids Res. 1994 Sep 11;22(18):3748-52), и замену аспарагина на лизин в положении 55 (N55K; Lim et al., J Biol Chem. 1994 Mar 25;269(12):9006-10). BASP1 1-30 сливали с мономерными или димерными вариантами MCP, при этом каждый MCP представлял собой либо V29I, либо дважды мутированный V29I/N55K. Люциферазную репортерную конструкцию экспрессировали в виде слияния с 3 петлями стебля MS2 из отдельной плазмиды. Получали пять стабильных клеточных линий HEK293SF, либо люциферазу-MS2 в отдельности (№ 811), либо в комбинации с каждым из вариантов BASP1-MCP (№ 815, 817, 819 или 821) (Фиг. 10). В качестве дополнительного контроля клетки HEK293SF стабильно трансфицировали BASP1 1-27, меченым FLAG. Экзосомы выделяли и обрабатывали BENZONASE® для удаления любых внешне связанных mRNA и очищали в соответствии со способами, указанными выше. Очищенные экзосомы анализировали с помощью SDS-PAGE (Фиг. 11A) и вестерн-блоттинга антитела к FLAG® (Фиг. 11B), демонстрируя равные количества общего белка и сопоставимые уровни слияния BASP1-FLAG® в каждом препарате экзосом. Важно отметить, что слияния BASP1-MCP экспрессируются до сопоставимых уровней, как и слияние BASP1 1-27 FLAG, не

содержащее белка MCP, демонстрируя, что добавление мономеров или димеров MCP не нарушает BASP1-опосредованную загрузку белков в экзосомах.

[00381] Клетки, стабильно экспрессирующие mRNA BASP1-MCP и люциферазу-MS2, выделяли и общую mRNA люциферазы количественно оценивали с помощью RT-qPCR (прямой праймер: 5'-TGGAGGTGCTCAAAGAGTTG-3' (SEQ ID NO: 119); обратный праймер: 5'-TTGGGCGTGCACTTGAT-3' (SEQ ID NO: 120); зонд: 5'-/56-FAM/CAGCTTTCC/ZEN/GGGCATTGGCTTC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 121)). Нетрансфицированные клетки экспрессировали более низкие уровни люциферазы, чем все клетки, экспрессирующие 811, которые экспрессировали сопоставимые уровни люциферазы (Фиг. 12А, сверху). Очищенные экзосомы из каждой стабильной клеточной линии также анализировали с помощью RT-qPCR. 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 отметить, что каждый из слитых белков BASP1-MCP содержал более высокое количество mRNA люциферазы-MS2, демонстрируя важность связывания между MCP и MS2 для облегчения загрузки mRNA в экзосомы (Фиг. 12А, внизу). Количественное определение относительной mRNA между группами продемонстрировало обогащение от ~ 30 до 60 раз для всех слияний BASP1-MCP по сравнению с 811 в отдельности (Фиг. 12В). Предполагается, что конструкция 821 BASP1-MCP, содержащая димерный MCP V29I/N55K, имеет наиболее высокую аффинность к mRNA MS2 и действительно содержит наиболее высокое количество люциферазы-MS2 в этом эксперименте. Эти результаты демонстрируют, что фрагменты BASP1 являются надежными и универсальными каркасными белками для загрузки просвета экзосом различными полезными нагрузками, включая нуклеиновые кислоты.

Пример 4

BASP1, MARCKS и MARCKSL1 могут использоваться для получения экзосом с декорированием поверхности

[00382] Результаты предыдущих экспериментов демонстрируют, что полноразмерные и N-концевые области MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 могут использоваться для создания экзосом, нагруженных в области просвета. Для дополнительного изучения потенциала этих белков для конструирования экзосом, аминокислоты 1-30 из MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 или аминокислоты 1-10 из BASP1 сливали с эндогенной трансмембранной областью CD40L, экспрессируемой в виде гомотримера. Конструкции получали как для человеческих, так и для мышиных последовательностей CD40L, поскольку лиганды не реагируют перекрестно с когнатным

рецептором других видов (Фиг. 13). Экзосомы очищали из клеток HEK293SF, стабильно трансфицированных одной из экспрессионных конструкций CD40L, и инкубировали либо в мышинных, либо в человеческих В-клетках. Количества введенного CD40L на экзосомах количественно определяли с помощью CD40L ELISA (для измерения человеческого CD40L использовали R&D Systems, № в каталоге DCDL40, партия № P168248; и для измерения мышинового CD40L использовали Abcam, № в каталоге ab119517, партия № GR3218850-2), В-клетки количественно оценивали с использованием маркера В-клеток, CD19, и активацию В-клеток измеряли по процентному содержанию селективных клеток, положительных по CD69. Кривые титрования дозы экзосомального CD40L мыши (Фиг. 14A) или человека (Фиг. 14B) в совместимых по видам культурах продемонстрировали сопоставимую активность между конструкциями на основе частиц (левые графики и таблица ниже) или по сравнению друг с другом, и равные количества рекомбинантного белка на молярной основе CD40L (правые графики и таблица ниже). Сопоставимую активность наблюдали, когда конструкции CD40L также экспрессировали в виде мономеров и они были лишь несколько менее выраженными, чем тримерный CD40L, экспрессируемый на N-конце PTGFRN, каркаса для экспонирования экзосом с высокой плотностью (см., *например* международную заявку на патент № PCT/US2018/048026) (Фиг. 14C). Эти результаты демонстрируют, что MARCKS, MARCKSL1 и BASP1 представляют собой разнообразные устойчивые каркасы, пригодные для создания различных классов экзосом для конструирования для использования в путях применения у человека и животных.

Пример 5

Различные типы клеток экспрессируют BASP1, MARCKS, и/или MARCKSL1

[00383] Клеточные линии из тканей различного происхождения (HEK293, почка; HT1080, соединительная ткань; K562, костный мозг; MDA-MB-231, молочная железа; Raji, лимфобласт) выращивали до логарифмической фазы и переносили в среду, дополненную сывороткой, обедненной экзосомами, на ~ 6 дней, за исключением клеток HEK293, которые выращивали в средах с определенным химическим составом. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC), полученные из костного мозга, выращивали на 3-х мерных микроносителях в течение пяти дней и добавляли в бессывороточные среды на три дня. Выделяли супернатант из каждой культуры клеточной линии и очищали экзосомы, используя способ ультрацентрифугирования в градиенте плотности OPTIPREP™, описанный выше. Каждый из очищенных препаратов экзосом анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано выше, и количественно оценивали число совпадений пептидного спектра (PSM) для BASP1,

MARCKS и MARCKSL1 и двух значительно изученных белков EV, *например* экзосомных белков (CD81 и CD9). Тетраспанины CD81 и CD9 обнаруживали в большинстве очищенных популяций экзосом, но в некоторых случаях их количество было равно или ниже, чем просветных белков EV, *например* экзосомных белков (*например* ср. CD9 с BASP1 или MARCKSL1) (Фиг. 15). Этот результат указывает на то, что недавно идентифицированные просветные экзосомные маркеры могут представлять собой подходящие слитые белки для получения сконструированных экзосом из нескольких неродственных клеточных линий, происходящих из разных тканей.

Пример 6

Отличные от человеческих клетки, сверхэкспрессирующие BASP1, продуцируют экзосомы со сконструированным просветом

[00384] Результаты в Примере 5 демонстрируют, что многочисленные клетки человеческого происхождения естественным образом экспрессируют BASP1 и другой новый белок EV. Для определения того, можно ли использовать BASP1 в качестве универсального экзосомного каркасного белка, клетки яичника китайского хомячка (CHO) стабильно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей полноразмерный BASP1, слитый с меткой FLAG® и GFP («BASP1-GFP-FLAG»), плазмидой, экспрессирующей аминокислоты 1-30 BASP1, слитые с меткой FLAG® и GFP («BASP1(1-30)-GFP-FLAG»), или плазмидой, экспрессирующей аминокислоты 1-8 BASP1, слитые с меткой FLAG® и GFP («BASP1(1-8)-GFP-FLAG»). Экзосомы очищали от клеток CHO дикого типа и клеток CHO, трансфицированных одной из трех плазмид с BASP1. Как продемонстрировано на Фиг. 16A-B, слитые белки BASP1 и фрагмента BASP1 были успешно сверхэкспрессированы в клетках CHO и загружены в экзосомы, что было обнаружено с помощью PAGE без красителей (Фиг. 16A) и вестерн-блоттинга антителом к FLAG® (Фиг. 16B). Этот результат демонстрирует, что отличные от человеческих клетки, такие как клетки CHO, могут продуцировать экзосомы, которые сверхэкспрессируют человеческие фрагменты BASP1, и что эта сверхэкспрессия может направлять белок полезной нагрузки в просвет экзосом с высокой плотностью. Этот результат указывает на то, что BASP1 представляет собой универсальный каркасный белок для получения сконструированных экзосом из множества различных типов и видов клеток.

[00385] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат» указаны один или несколько, но не все

иллюстративные варианты осуществления настоящего раскрытия, как это предусмотрено изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего раскрытия и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[00386] Настоящее раскрытие было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

Включение посредством ссылки

[00387] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в настоящей заявке, настоящим включены в качестве ссылки в полном объеме 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

[00388] В настоящем раскрытии представлены, среди прочего, композиции EV, *например* экзосом, содержащие модифицированные экзогенные белки и пептиды, для применения в обогащении экзогенных белков в EV, *например* экзосомах. В настоящем раскрытии также предложены способ и способы получения обогащенных EV, *например* экзосом. Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, приведенное выше описание не является ограничивающим. Объем притязаний и объем настоящего раскрытия не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами. Понятно, что различные изменения могут быть сделаны без отклонения от сущности и объема настоящего(их) раскрытия(ий). Многие изменения станут очевидными для специалистов в данной области техники после рассмотрения этого описания.

[00389] Настоящая заявка испрашивает приоритет по международной заявке на патент PCT/US2018/061679, поданной 16 ноября 2018 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/835430, поданной 17 апреля 2019 г., которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная внеклеточная везикула (EV - англ.: extracellular vesicle), содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, причем каркасный белок содержит N-концевой домен (ND - англ.: N-terminus domain) и эффекторный домен (ED англ.: effector domain), при этом ND ассоциирован с просветной поверхностью EV, а ED ассоциирован с просветной поверхностью EV посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд.
2. EV по п. 1, в которой ND ассоциирован с просветной поверхностью EV посредством миристоилирования.
3. EV по п. 2, в которой ND имеет Gly на N-конце.
4. EV по любому из пп. 1-3, в которой ED содержит по меньшей мере три Lys, по меньшей мере четыре Lys, по меньшей мере пять Lys, по меньшей мере шесть Lys или по меньшей мере семь Lys.
5. EV по любому из пп. 1-4, в которой ED связан с ND с помощью пептидной связи.
6. EV по пп. 4 или 5, в которой ED содержит (Lys)_n, где n является целым числом от 1 до 10.
7. EV по любому из пп. 1-6, в которой ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию.
8. EV по любому из пп. 1-7, в которой ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой глицин, представленный как Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; и где X6 представляет собой основную аминокислоту.
9. EV по п. 8, в которой X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His.
10. Выделенная внеклеточная везикула (EV), содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, причем каркасный белок содержит N-концевой

домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой глицин, представленный Gly; где «:» представляет собой пептидную связь, где каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; где X6 представляет собой основную аминокислоту, и где ED связан с X6 с помощью пептидной связи и содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED.

11. EV по любому из пп. 1-10, в которой ED не содержит трансмембранный домен или цитоплазматический домен вируса.

12. EV по любому из пп. 8-11, в которой X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser.

13. EV по любому из пп. 8-12, в которой X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met.

14. EV по любому из пп. 8-13, в которой X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser.

15. EV по любому из пп. 1-14, в которой ND каркасного белка содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где

- (i) G представляет собой Gly;
- (ii) «:» представляет собой пептидную связь;
- (iii) X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X3 представляет собой аминокислоту;
- (v) X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- (vi) X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и
- (vii) X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

16. EV по любому из пп. 8-15, в которой X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

17. EV по любому из пп. 1-9 и 11-16, в которой ND и ED соединены с помощью линкера.

18. EV по п. 17, в которой линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.

19. Выделенная внеклеточная везикула (EV), содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, причем каркасный белок содержит ND—ED, при этом:

a. ND содержит G:X2:X3:X4:X5:X6; где:

- i. G представляет собой Gly;
- ii. «:» представляет собой пептидную связь;
- iii. X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- iv. X3 представляет собой аминокислоту;
- v. X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Glu и Met;
- vi. X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- vii. X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His;

b. «—» представляет собой необязательный линкер, содержащий одну или несколько аминокислот; и

c. ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), которые связаны с X6 с помощью пептидной связи или одной или нескольких аминокислот, или (ii) по меньшей мере один лизин, который напрямую связан с X6 с помощью пептидной связи.

20. EV по любому из пп. 8-19, в которой X2 выбран из группы, состоящей из Gly и Ala.

21. EV по любому из пп. 8-20, в которой X3 представляет собой Lys.

22. EV по любому из пп. 8-21, в которой X4 представляет собой Leu или Glu.

23. EV по любому из пп. 8-22, в которой X5 выбран из группы, состоящей из Ser и Ala.

24. EV по любому из пп. 8-23, в которой X6 представляет собой Lys.

25. EV по любому из пп. 8-24, в которой X2 представляет собой Gly, Ala или Ser; X3 представляет собой Lys или Glu, X4 представляет собой Leu, Phe, Ser и Glu, X5 представляет собой Ser или Ala; и X6 представляет собой Lys.

26. EV по любому из пп. 19-25, в которой ND и ED связаны с помощью линкера, содержащего одну или более аминокислот.

27. EV по любому из пп. 19-26, в которой ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 151), KKKKK (SEQ ID NO: 152) или любую их комбинацию.

28. EV по любому из пп. 1-27, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 157), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 158), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 159), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 160) или (v) любой их комбинации.

29. EV по п. 28, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 161), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 162), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 163), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 164), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 165), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 166), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 167), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 168) и (ix) любой их комбинации.

30. EV по любому из пп. 1-29, в которой длина каркасного белка составляет по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по

меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот.

31. EV по любому из пп. 1-30, в которой каркасный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 169), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 170), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 171), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 172), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 173), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 174), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 175), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 176), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 177), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 178) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 179).

32. EV по любому из пп. 1-31, в которой каркасный белок не содержит Met на N-конце.

33. EV по любому из пп. 1-32, в которой каркасный белок содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка.

34. EV по п. 33, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly.

35. EV по пп. 33 или 34, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим.

36. EV по пп. 33 или 35, в котором аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина.

37. EV по любому из пп. 1-36, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (MARKS), SEQ ID NO: 2 (MARCKSL1) или SEQ ID NO: 3 (BASP1).

38. EV по любому из пп. 1-37, в которой биологически активная молекула находится на просветной поверхности или в просвете EV.

39. EV по любому из пп. 1 и 8, в которой каркасный белок дополнительно содержит трансмембранный домен.

40. EV по п. 39, в которой трансмембранный домен находится между доменом ED каркасного белка и биологически активной молекулой.

41. EV по любому из пп. 1-40, в которой каркасный белок дополнительно содержит экстравазикалярный домен.

42. EV по п. 41, в которой биологически активная молекула связана с экстравазикалярным доменом.

43. EV по любому из пп. 1-42, в которой каркасный белок связан с биологически активной молекулой с помощью линкера.

44. EV по любому из пп. 1-43, в которой домен ND связан с доменом ED с помощью линкера.

45. EV по пп. 43 или 44, в которой линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.

46. EV по любому из пп. 17-19, 26 и 43-45, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.

47. EV по любому из пп. 17-19, 26 и 43-45, в которой линкер представляет собой гибкий линкер.

48. EV по любому из пп. 1-47, в которой биологически активная молекула представляет собой белок, полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение, вирус, ионофор, носитель для ионофора, фрагмент, который образует канал или пору, или любую их комбинацию.

49. EV по п. 48, в которой белок представляет собой рекомбинантный пептид, природный пептид, синтетический пептид, антитело, слитый белок или любую их комбинацию.

50. EV по п. 48, в которой белок представляет собой фермент, цитокин, лиганд, рецептор, фактор транскрипции или их комбинацию.

51. EV по п. 48, в которой вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, парвовирус, ретровирус, аденовирус или любую их комбинацию.

52. EV по любому из пп. 1-51, причем EV дополнительно содержит второй каркасный белок.

53. EV по п. 52, в которой второй каркасный белок представляет собой полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид переносчик АТФ, полипептид аминопептидазу N (ANPEP), полипептид член семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (ENPP1), полипептид неприлизин (MME), полипептид нейропилин-1 (NRP1) или их фрагмент.

54. EV по любому из пп. 1-53, в которой биологически активная молекула представляет собой ингибитор регулятора отрицательной контрольной точки или ингибитор партнера по связыванию регулятора отрицательной контрольной точки.

55. EV по п. 54, в которой регулятор отрицательной контрольной точки выбран из группы, состоящей из: цитотоксического белка 4, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4), белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), гена 3, активируемого лимфоцитами (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенуатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), супрессора Т-клеточной активации V-домена Ig (VISTA), аденозинового рецептора A2a (A2aR), иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.

56. EV по любому из пп. 1-47, в которой биологически активная молекула представляет собой иммуногенный белок.

57. EV по любому из пп. 1-47, в которой биологически активная молекула представляет собой токсин, анатоксин или нетоксичный мутант токсина.

58. EV по п. 57, в которой токсин представляет собой дифтерийный токсин.

59. EV по п. 57, в которой анатоксин представляет собой столбнячный анатоксин.

60. EV по п. 57, в которой биологически активная молекула представляет собой нетоксичный мутант дифтерийного токсина.

61. EV по любому из пп. 1-60, в которой биологически активная молекула представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы.

62. EV по п. 61, в которой положительная костимулирующая молекула представляет собой члена суперсемейства рецепторов ФНО.

63. EV по п. 62, в которой член суперсемейства рецепторов ФНО выбран из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептора Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR.

64. EV по п. 63, в которой активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой члена суперсемейства ФНО.

65. EV по п. 64, в которой член суперсемейства ФНО выбран из группы, состоящей из: ФНО α , ФНО-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2.

66. EV по п. 61, в которой положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28.

67. EV по п. 66, в которой костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28.

68. EV по п. 67, в которой активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.

69. EV по п. 50, в которой цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-10, IL-12 и IL-15.

70. EV по п. 48, в которой белок представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), Т-клеточный корецептор, главный комплекс гистосовместимости (МНС), лейкоцитарный антиген человека (HLA) или их производное.

71. EV по п. 48, в которой белок представляет собой опухолевый антиген.

72. EV по п. 71, в которой опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из: альфа-фетопротейна (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE), опухолевого белка p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), лиганда белка программируемой клеточной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, рецептора фолиевой кислоты альфа, CE7R, IL-3, раково-тестикулярного антигена, gp100 MART-1 и апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО.

73. EV по любому из пп. 1-72, причем EV представляет собой экзосому.

74. Фармацевтическая композиция, содержащая EV по любому из пп. 1-73 и фармацевтически приемлемый носитель.

75. Клетка, которая продуцирует EV по любому из пп. 1-73.

76. Клетка, содержащая один или более векторов, причем векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую каркасный белок и биологически активную молекулу по любому из пп. 1-73.

77. Клетка по п. 76, в которой последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

78. Набор, содержащий EV по любому из пп. 1-73 и инструкцию по применению.

79. Способ получения EV, включающий культивирование клетки по любому из пп. 75-77 в подходящих условиях и получение EV.

80. Способ заякорения биологически активной молекулы к внеклеточной везикуле, включающий связывание биологически активной молекулы по любому из пп. 1-73 с каркасным белком по любому из пп. 1-73.

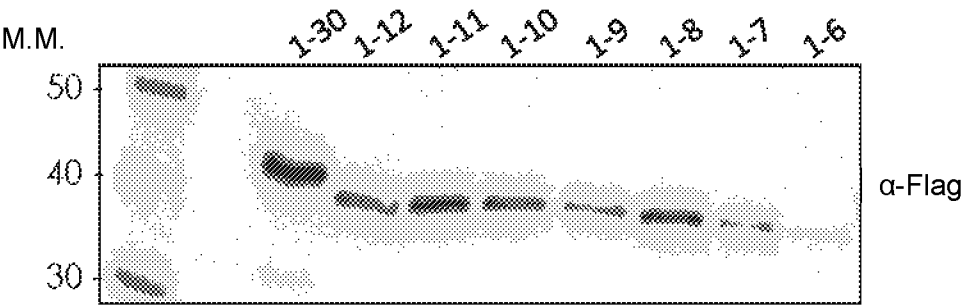
81. Способ предупреждения или лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение EV по любому из пп. 1-73, при этом заболевание ассоциировано с антигеном.

82. Способ по п. 81, в котором EV вводят парентерально, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутриопухолево, интраназально, подкожно или внутрибрюшинно.

ФИГ. 1А

	BASP1	FLAG	GFP
положение аминокислот:	1---5---10---15---20---25---30	-----	-----
BASP1, 1-30	MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-12	MGGKLSKKKKGY-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-11	MGGKLSKKKKG-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-10	MGGKLSKKKK-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-9	MGGKLSKK-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-8	MGGKLSKK-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-7	MGGKLSK-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		
BASP1, 1-6	MGGKLS-----SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKG...		

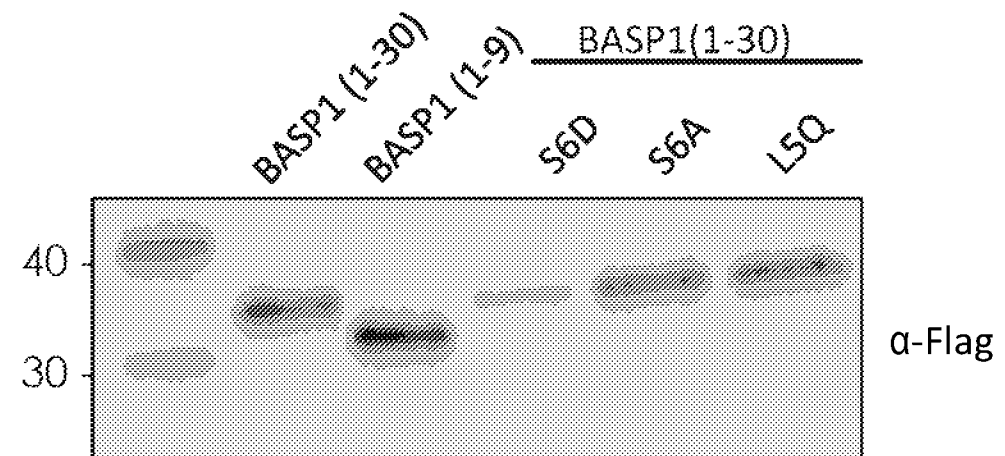
ФИГ. 1В



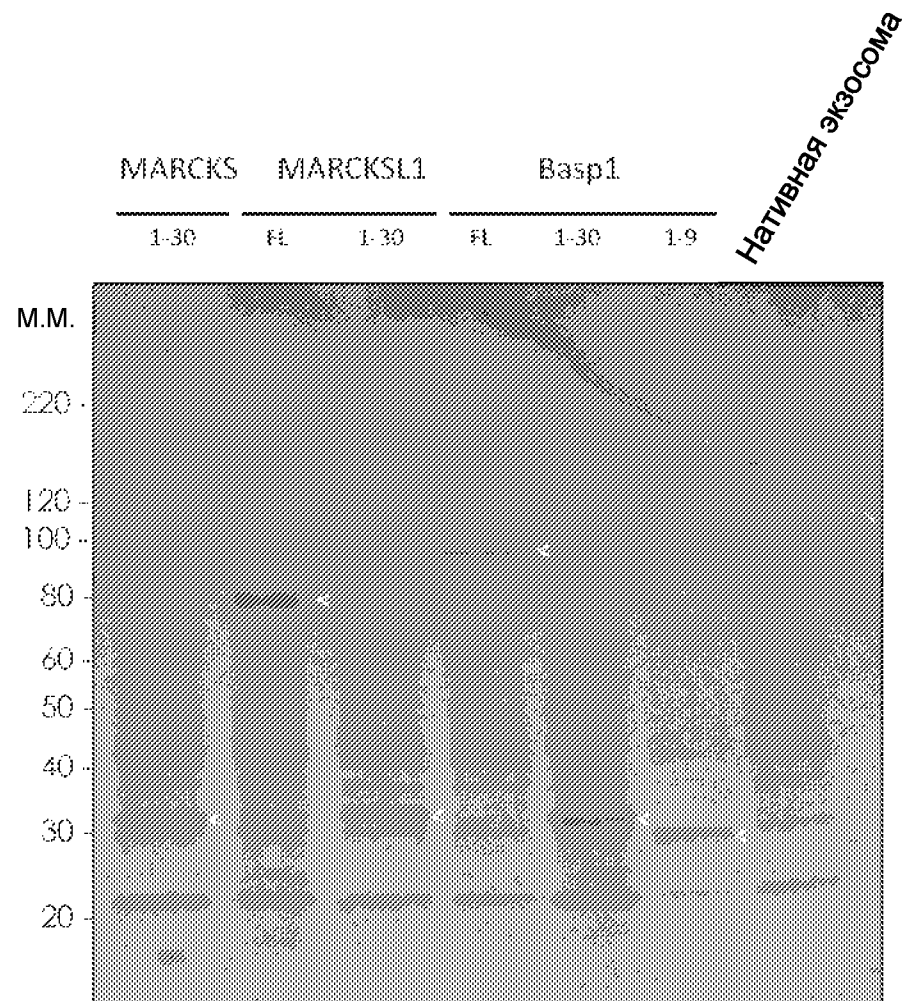
ФИГ. 2А

положение аминокислот:	1---5---10---15---20---25---30
BASP1, 1-30	MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
BASP1, 1-30-S6D	MGGKLDKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
BASP1, 1-30-S6A	MGGKLAKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
BASP1, 1-30-L5Q	MGGKQSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA

ФИГ. 2В

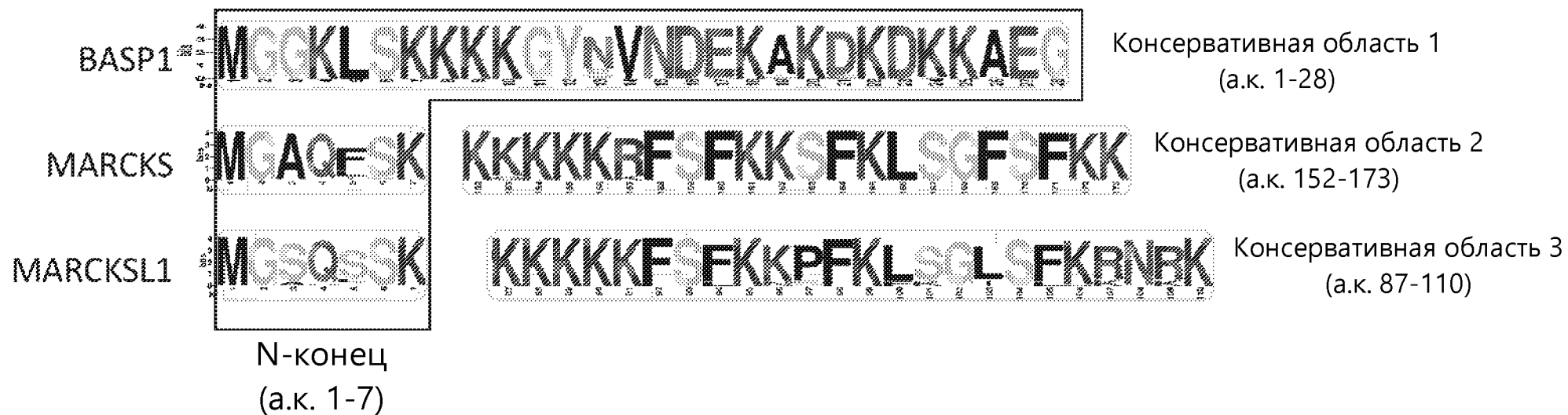


ФИГ. 3



Гель с белком, окрашенным кумасси синим

ФИГ. 4



ФИГ. 5А

положение аминокислот:

BASP1-30

MARCKS-MG-PSD

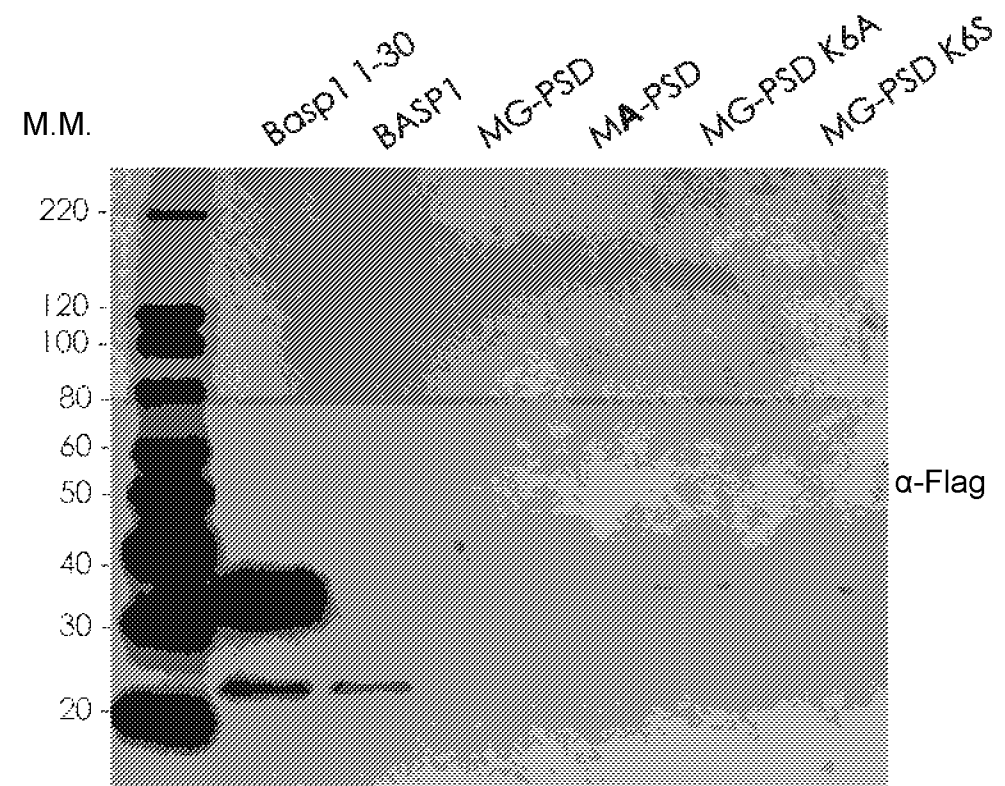
MARCKS-MA-PSD

MARCKS-MG-PSD-K6S

MARCKS-MG-PSD-K6A

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
MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA																													
MGA <u>AKKKKKRFSFKK</u> SGFSFKKNKKEA																													
M <u>A</u> AKKKKKRFSFKKSGFSFKKNKKEA																													
MGA <u>KK</u> S KKRFSFKKSGFSFKKNKKEA																													
MGA <u>KK</u> A KKRFSFKK <u>PF</u> KLSGFSFKKNKKEA																													

ФИГ. 5В



ФИГ. 6

Положение	1	2	3	4	5*	6*	7	8
Мотив 1	M	G	GAS	KQ	LFSQ	SA	K	K
Мотив 2	M	G	π	ζ	Φπ	SAGN	[+]	[+]
Мотив 3	M	G	π	χ	Φπ	π	[+]	[+]

Сокращения:

π – Pro, Gly, Ala, Ser

ζ – Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg

Φ – Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met

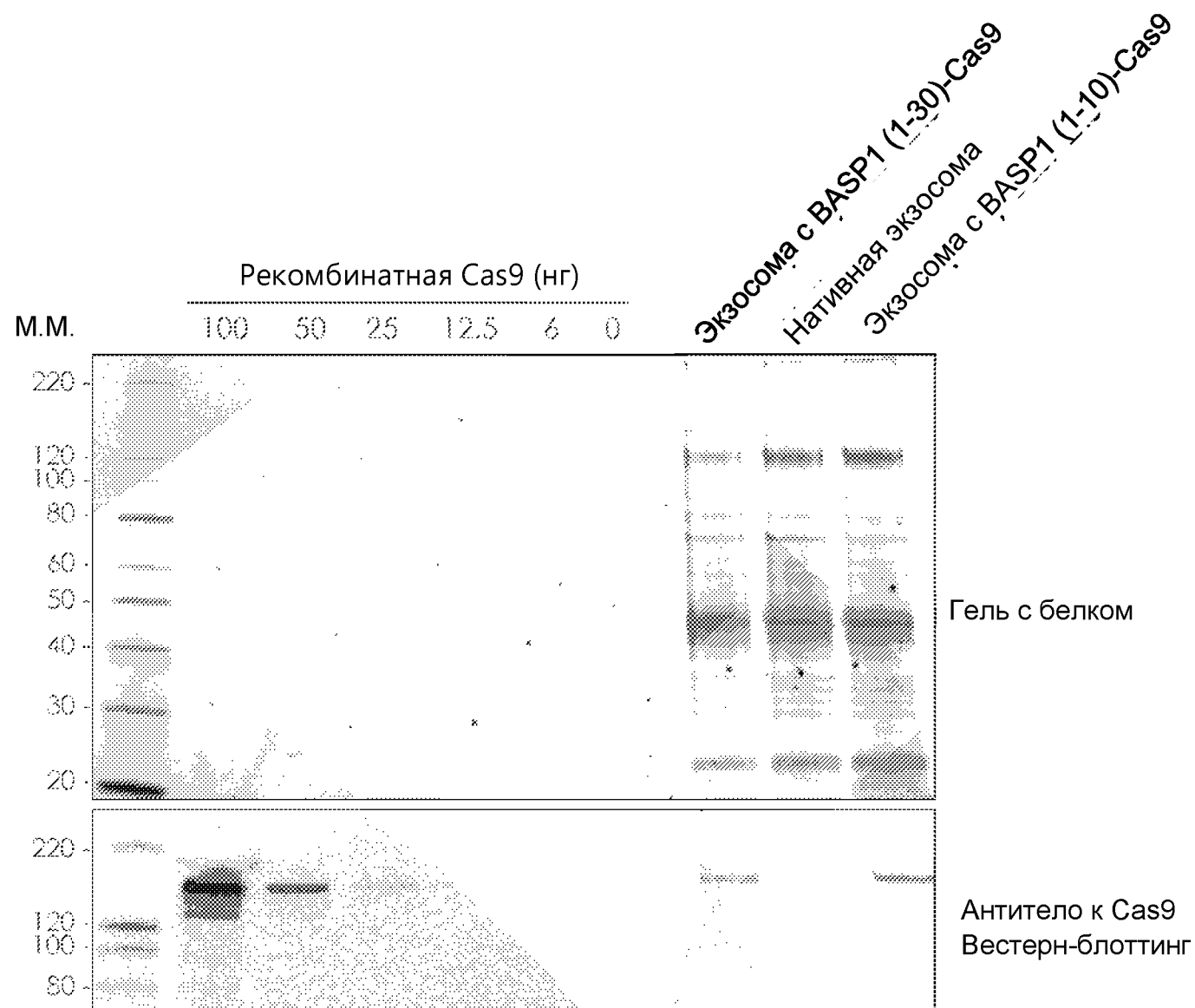
[+] – Lys, Arg, His

[-] – Asp, Glu

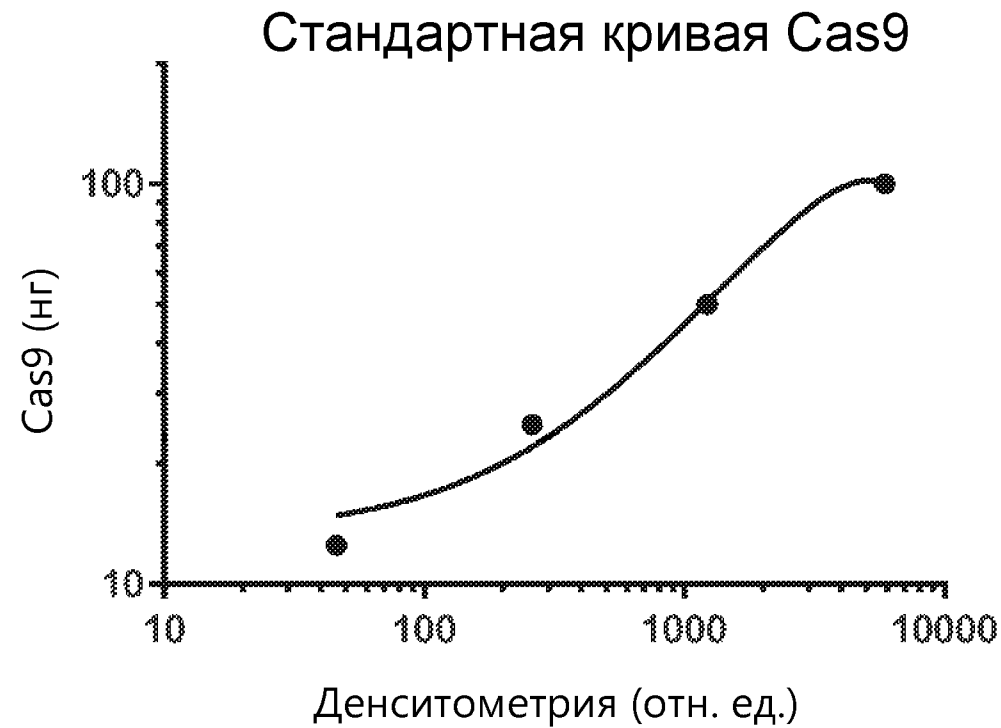
*Положение 5 не может содержать [+]

*Положение 6 не может содержать [-]

ФИГ. 7А

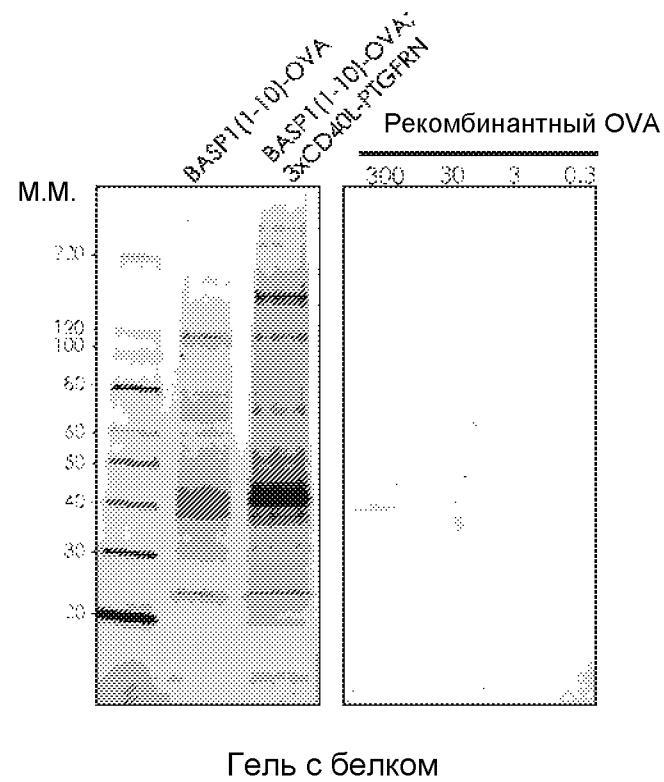


ФИГ. 7В

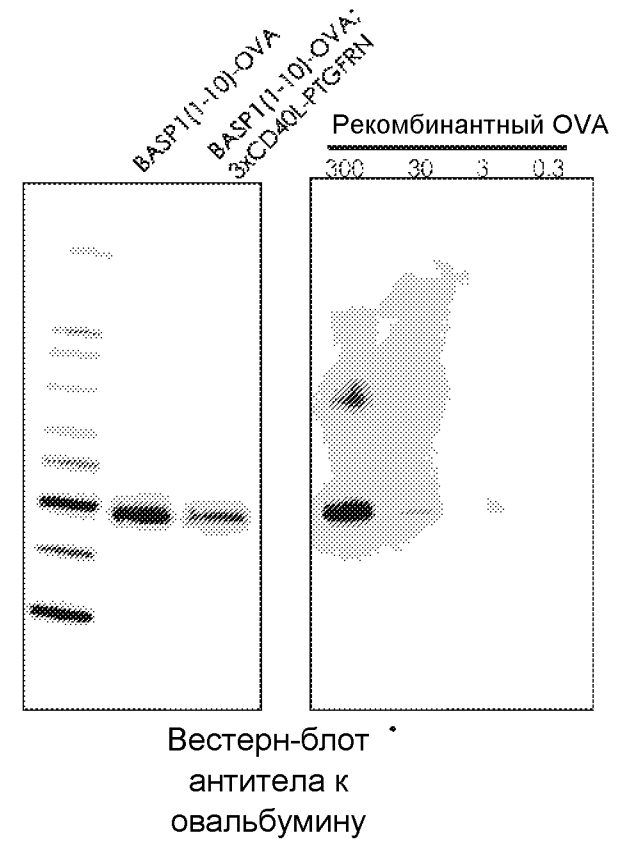


Образец	ОЕ	нг Cas9	#EVs	нг/EV	нг/Cas9	Cas9/EV
Vasp1 (1-30) Cas9	232.4	23.44	2.00E+10	1.17E-09	2.71E-10	4.32
Vasp1 (1-10) Cas9	330.8	24.95	2.00E+10	1.25E-09	2.71E-10	4.60

ФИГ. 8А



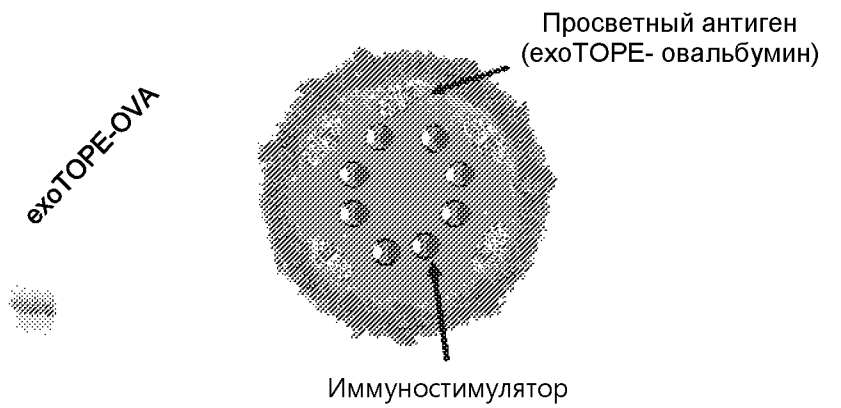
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С



ФИГ. 8D

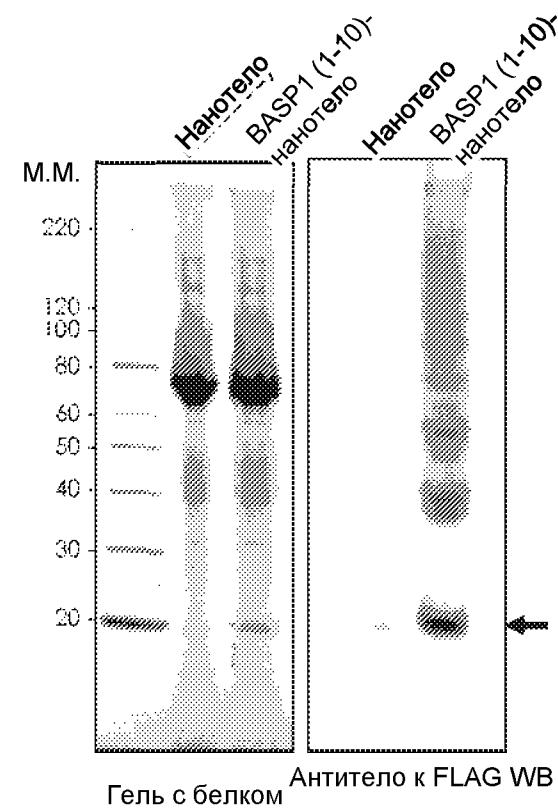


ФИГ. 9А

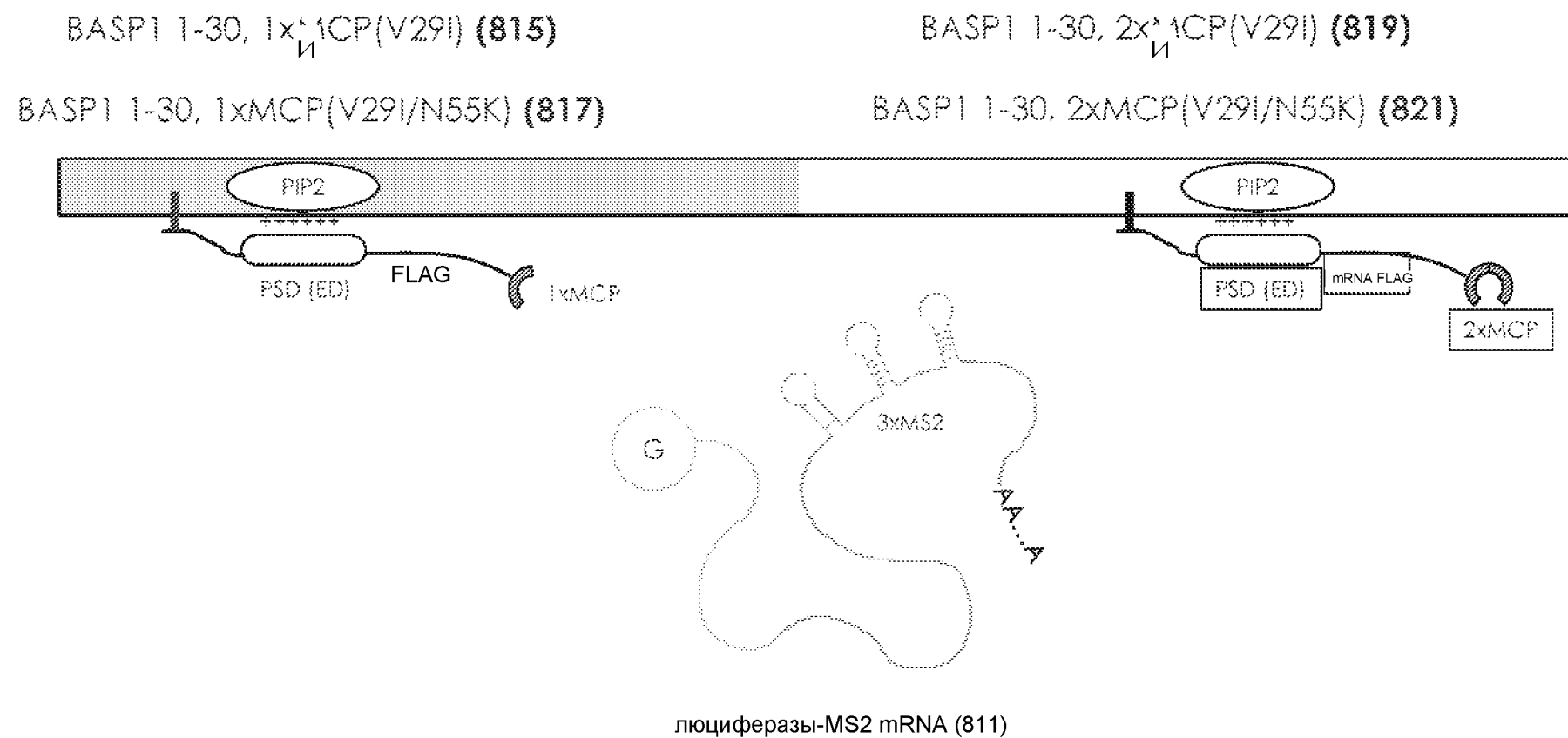
<u>BASP1(1-10)</u>		<u>FLAG</u>
<u>MGGKLSK</u> KKK	SAGGSGGSTS	GSG <u>DYK</u> DDDD
<u>KGSGFEMDQV</u>	QLVESGGALV	QPGGSLRLSC
AASGFPVNRY	SMRWYRQAPG	KEREWVAGMS
SAGDRSSYED	SVKGRFTISR	DDARNTVYLQ
MNSLKPEDTA	VYYCNVNVGF	EYWGQGTQVT
VSS		

Прогнозируемая М.М. 17 кДа

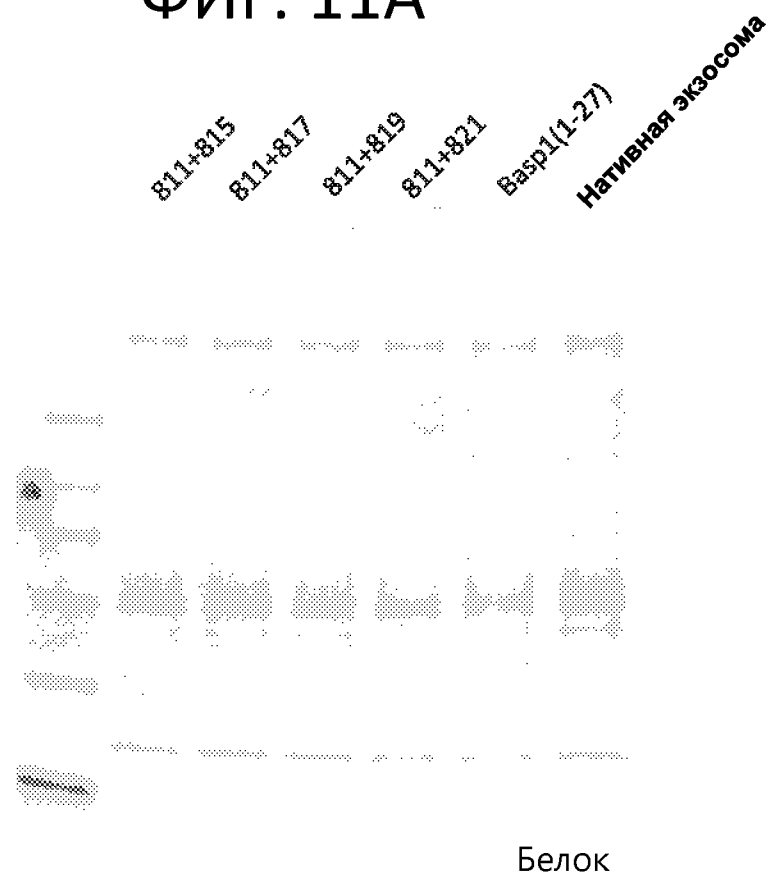
ФИГ. 9В



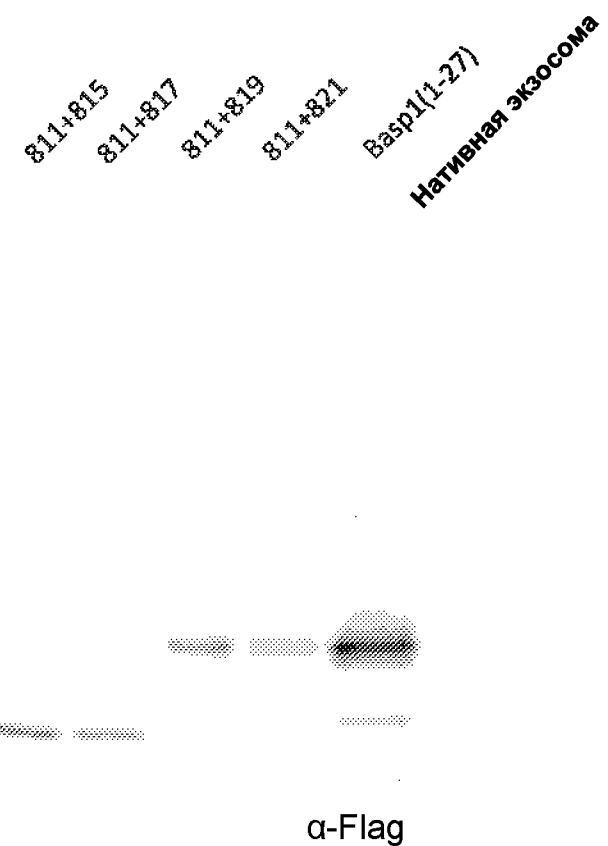
ФИГ. 10

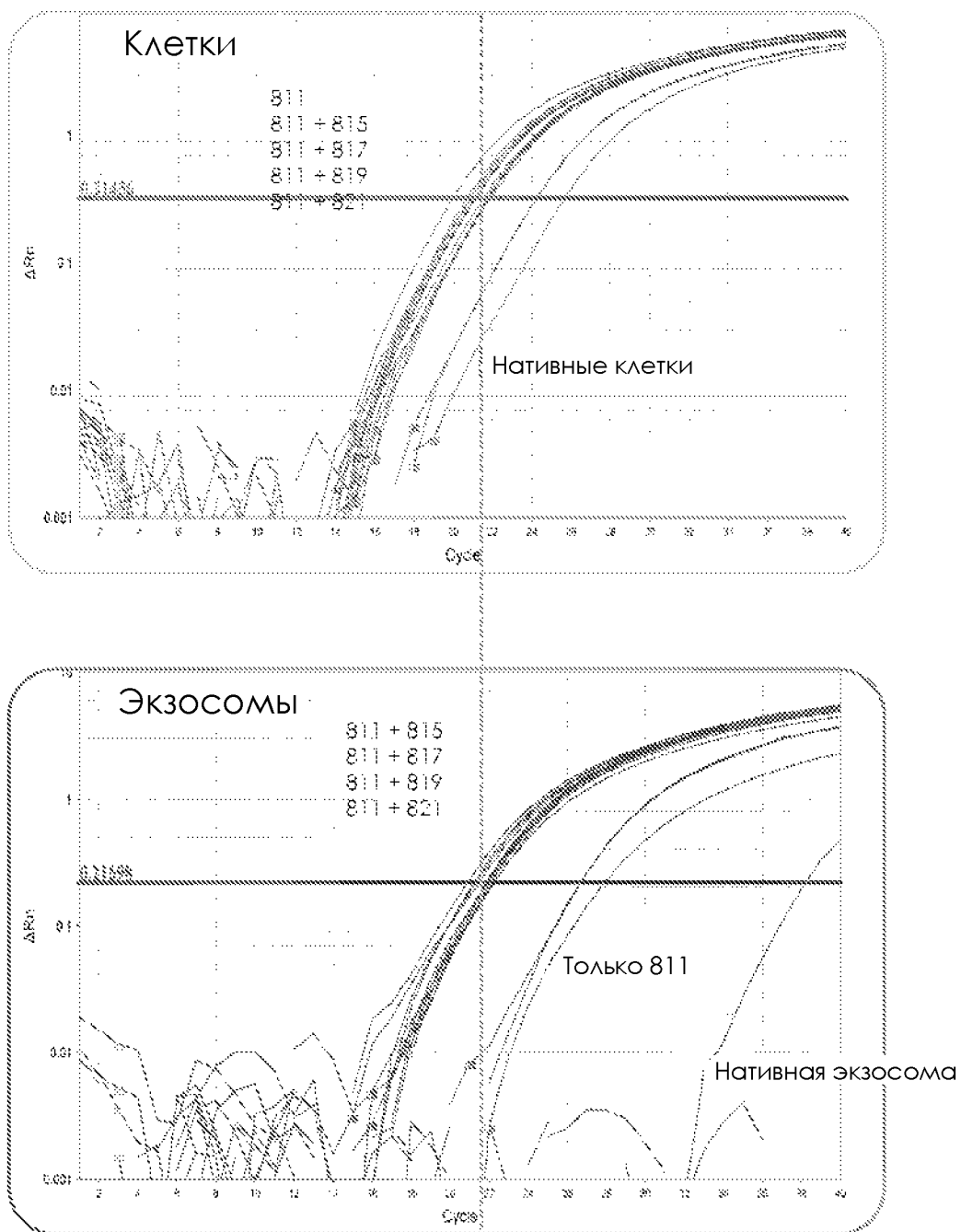


ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



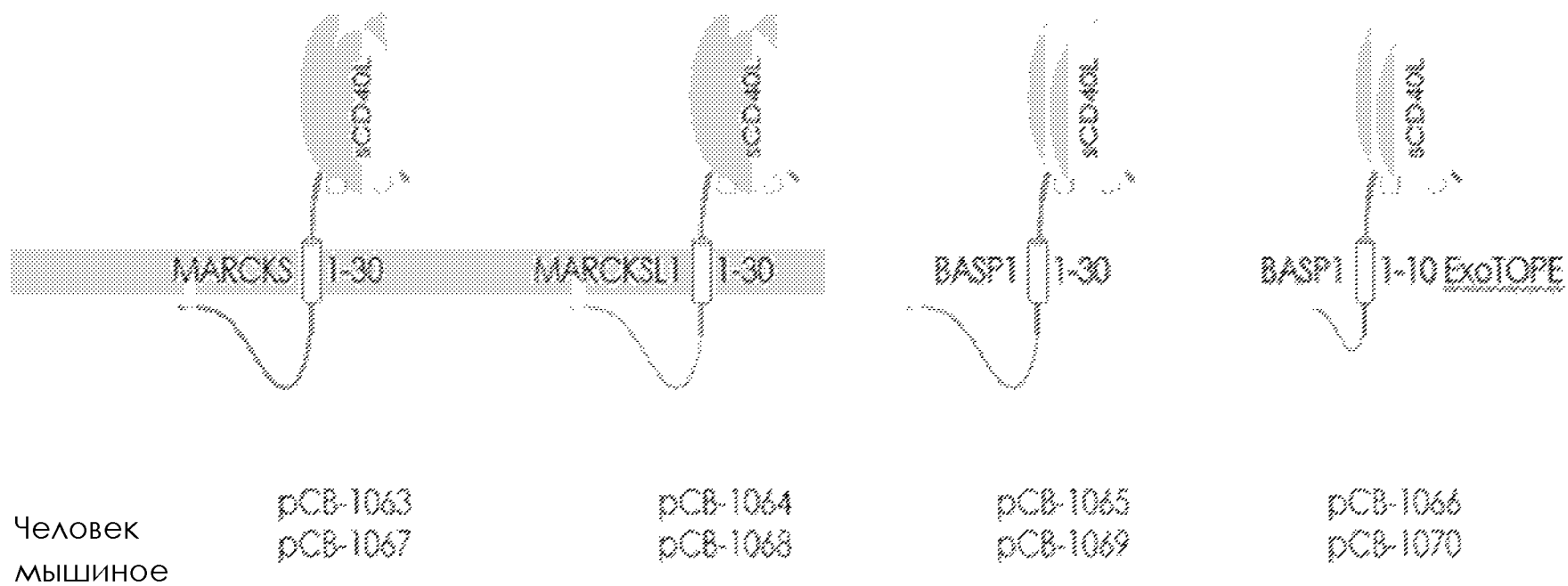


ФИГ. 12А

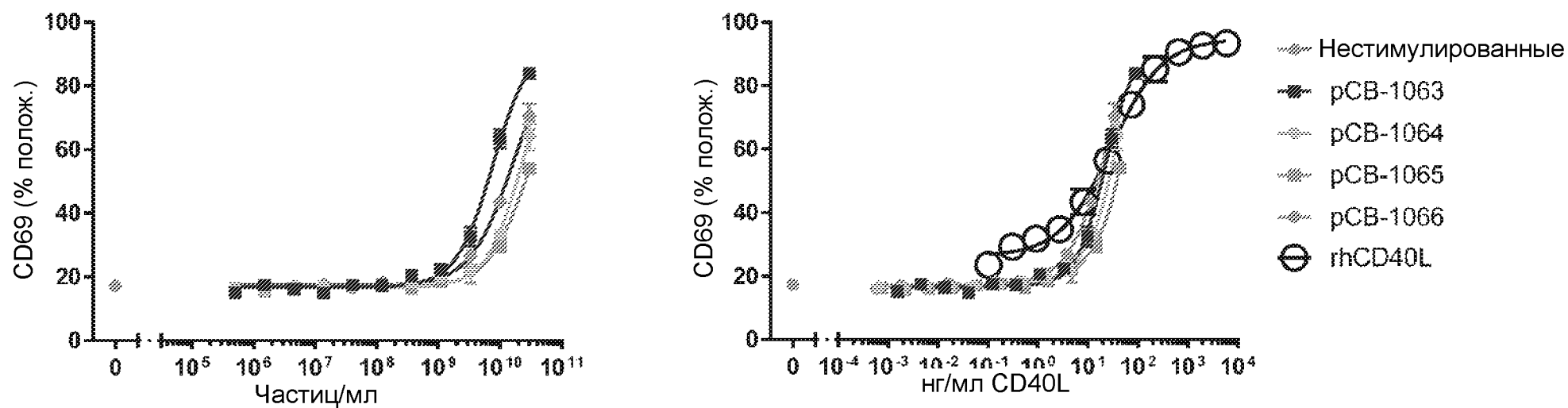
ФИГ. 12В

Конструкция	C_t^{Cells}	C_t^{EVs}	Повышение кратности в экзосомах по сравнению с 811 в отдельности
Нативные НЕК	24.6	38.2	4.2×10^{-4}
811 (mRNA в отдельности)	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. 13

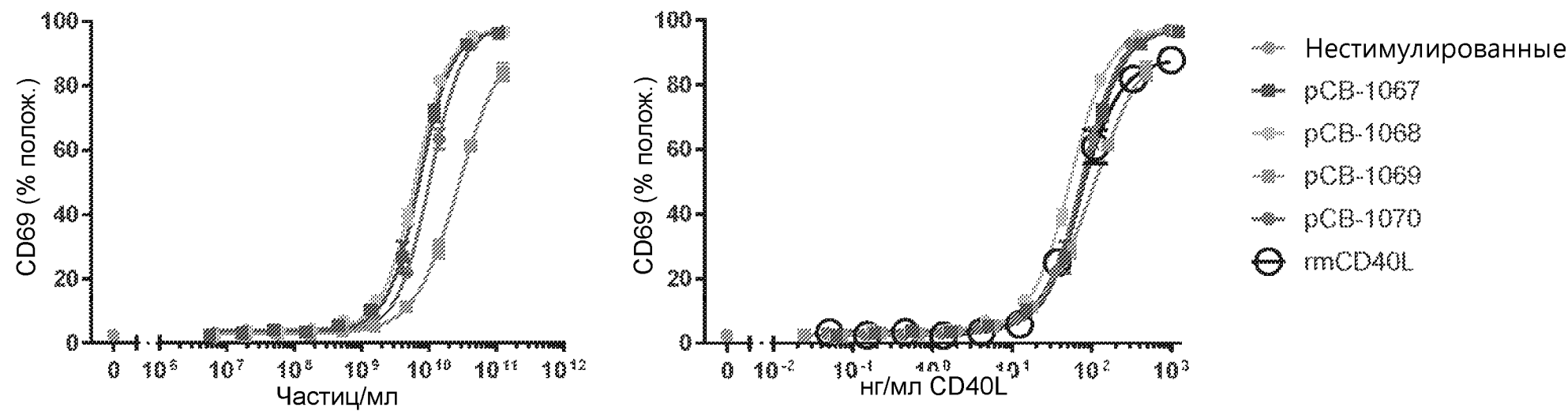


ФИГ. 14В



	pCB-1063	pCB-1064	pCB-1065	pCB-1066	rhCD40L
EC50 (нг/мл)	18.55	23.02	36.51	13.59	19.34
EC50 (п/мл)	6.23E+09	1.83E+10	2.56E+10	1.20E+10	H/O

ФИГ. 14А



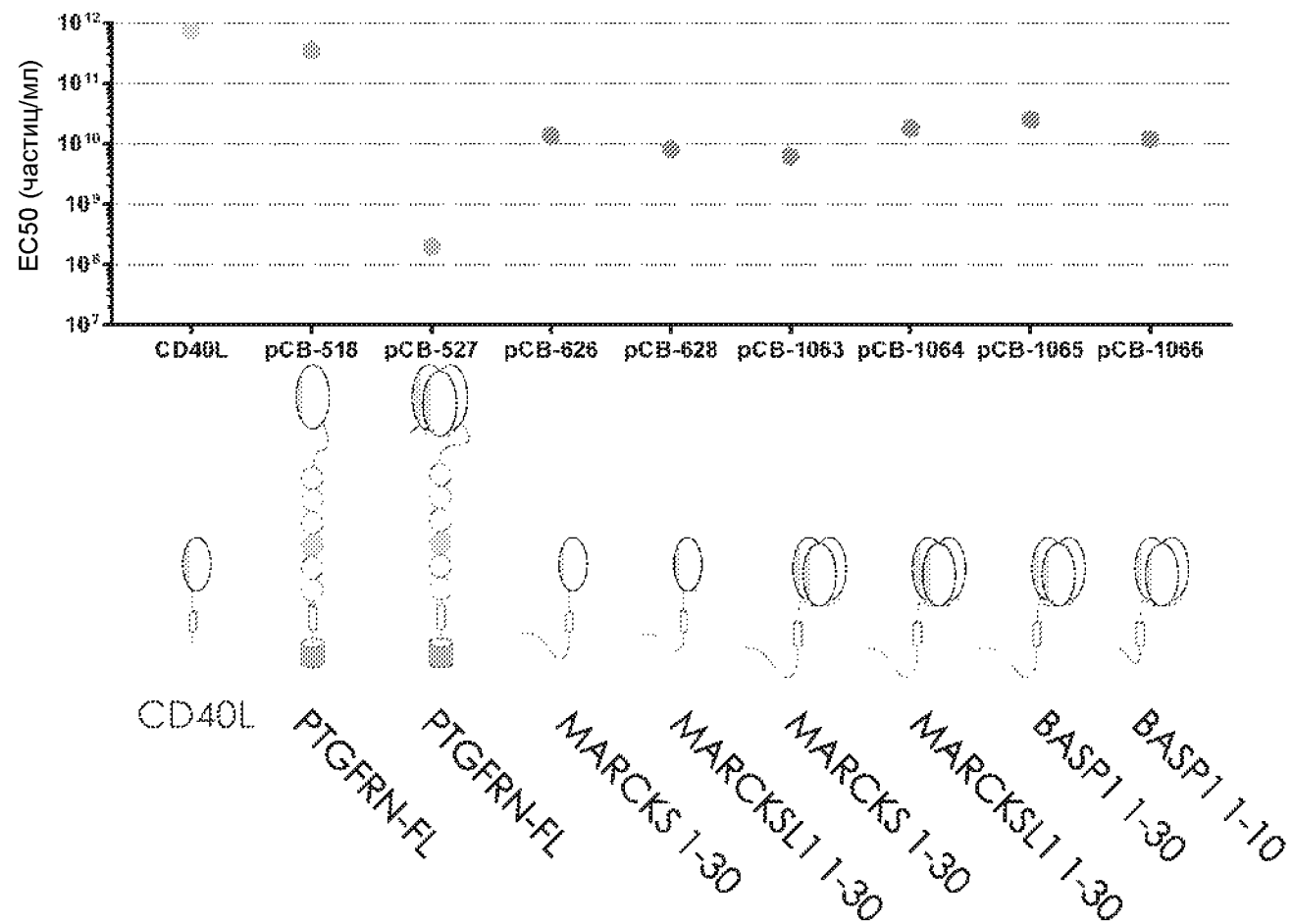
	pCB-1067	pCB-1068	pCB-1069	pCB-1070	rmCD40L
EC50 (нг/мл)	81.5	54.8	108.7	76.1	70.8
EC50 (п/мл)	7.41E+09	6.18E+09	2.88E+10	1.06E+10	N/O

ФИГ. 14С

Менее
выражено

↓

Более
выражено



ФИГ. 15

Число совпадений пептидного спектра (PSM)

Название гена	HEK293	HT1080	K562	MB231	Raji	MSC*
BASP1	122	79	0	74	103	96
MARCKS	101	0	0	14	0	82
MARCKSL1	114	53	97	23	193	23
CD81	34	21	2	9	9	48
CD9	21	6	0	31	0	41

* Осуществляется в отдельном эксперименте

ФИГ. 16

