

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192768 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2020.04.17

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ЭКЗОСОМ И AAV

(31) 62/835,432; 62/835,425; 62/984,161;
62/984,173

(32) 2019.04.17; 2019.04.17; 2020.03.02;
2020.03.02

(33) US

(86) PCT/US2020/028849

(87) WO 2020/215010 2020.10.22

(71) Заявитель:

КОДИАК БАЙОСАЙЕНСЕС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Нойес Аарон, Макконнелл Расселл Е.,
Сюй Кэ, Финн Джонатан (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 внеклеточным везикулам, например экзосомам, содержащим AAV и каркасный белок. В некоторых аспектах AAV находится в просвете внеклеточной везикулы. В некоторых аспектах AAV связан с поверхностью просвета внеклеточной везикулы. В некоторых аспектах AAV связан с внешней поверхностью внеклеточной везикулы. В данном документе также предложены способы получения экзосом и способы применения экзосом для лечения и/или предотвращения заболеваний или нарушений.

A1

202192768

202192768

A1

КОМПОЗИЦИИ ЭКЗОСОМ И AAV

Описание

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка РСТ испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/835425, поданной 17 апреля 2019 г.; 62/835432, подано 17 апреля 2019 г.; 62/984161, поданной 2 марта 2020 г.; и 62/984173, поданной 2 марта 2020 г., каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

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

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (имя: 4000_033PC02_Seqlisting_ST25.txt, размер: 231249 байта; и дата создания: 17 апреля 2020 года), поданного в этой заявке, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к внеклеточным везикулам (BB), например, экзосомам, содержащим аденоассоциированный вирус (AAV). В некоторых аспектах изобретения внеклеточная везикула дополнительно содержит каркасный белок.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] AAV стал полезным вектором для применения в генной терапии. Однако, несмотря на свои многочисленные преимущества, AAV стимулирует гуморальный, опосредованный антителами иммунный ответ. Половина всех потенциальных пациентов, которым может помочь генная терапия, опосредованная AAV, не могут получить лечение, потому что у них есть уже существующие нейтрализующие антитела, выработанные после заражения серотипами AAV в дикой природе. Кроме того, после начальной дозы терапии AAV у пациентов вырабатываются антитела против средства лечения, и их нельзя повторно вводить, что исключает режимы увеличения дозы для поиска дозы, которая может достичь желаемого терапевтического эффекта. Невозможность повторного введения дозы является серьезной проблемой, если введенный трансген теряет экспрессию в течение жизни пациента, что часто происходит из-за деления клеток, инактивации трансгена или потери трансдуцированных клеток.

[0005] Экзосомы представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, которые естественным образом производятся эукариотическими клетками. Экзосомы содержат мембрану, которая закрывает внутреннее пространство (т.е. просвет). В качестве средств доставки лекарственных веществ ВВ, например, экзосомы, предлагают много преимуществ по сравнению с традиционными способами доставки лекарственных веществ, представляя новый способ лечения во многих терапевтических областях. В частности, экзосомы обладают низкой иммуногенностью. AAV, связанный с экзосомами, имеет улучшенные характеристики доставки по сравнению со свободным AAV, включая эффективность трансдукции. Maguire et al., *Molecular Therapy* 20(5):960-71 (2012); György et al., *Biomaterials* 35(26):7598-7609 (2014). Однако упаковка AAV в экзосомы с использованием современных способов крайне неэффективна, что ограничивает потенциальную полезность экзосом в доставке AAV. Таким образом, в данной области техники остается потребность в разработке способов более эффективного связывания AAV с экзосомами.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (ВВ), например, экзосоме, содержащей AAV и каркасный белок. В некоторых аспектах AAV находится в просвете ВВ. В некоторых аспектах AAV связан с мембраной ВВ, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV связан с поверхностью просвета ВВ, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV связан с внешней поверхностью ВВ, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV, связанный с экзосомой, имеет измененные свойства по сравнению со свободным AAV в отдельности.

[0007] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (ВВ), например, экзосоме, содержащей AAV и каркасный белок, где AAV находится в просвете ВВ, и где AAV в экзосоме имеет измененные свойства по сравнению со свободным AAV в отдельности.

[0008] В некоторых вариантах осуществления измененное свойство включает лучший терапевтический эффект, чем AAV в отдельности. В некоторых вариантах осуществления лучший терапевтический эффект включает одно или более из более высокой активности, повышенной трансдукции, повышенной эффективности трансдукции, большей активности, более быстрой кинетики трансдукции и уклонения от иммунного ответа.

[0009] В некоторых вариантах осуществления измененные свойства AAV позволяют вводить AAV субъекту двумя или более дозами, при этом активность AAV сохраняется в последующих дозах.

[0010] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, например, экзосоме, содержащей AAV, где ВВ содержит белок каркаса и по меньшей мере 1 AAV, при этом по меньшей мере 1 AAV находится в просвете ВВ, например, экзосомы.

[0011] В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, содержит по меньшей мере 1 AAV, по меньшей мере 2 AAV, по меньшей мере 3 AAV, по меньшей мере 4 AAV или по меньшей мере 5 AAV. В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере 6 AAV, по меньшей мере 7 AAV, по меньшей мере 8 AAV, по меньшей мере 9 AAV, по меньшей мере 10 AAV, по меньшей мере 11 AAV, по меньшей мере 12 AAV, по меньшей мере 13 AAV, по меньшей мере 14 AAV, по меньшей мере 15 AAV, по меньшей мере 16 AAV, по меньшей мере 17 AAV, по меньшей мере 18 AAV, по меньшей мере 19 AAV, по меньшей мере 20 AAV, по меньшей мере 201 AAV, по меньшей мере 22 AAV, по меньшей мере 23 AAV, по меньшей мере 24 AAV, по меньшей мере 25 AAV, по меньшей мере 26 AAV, по меньшей мере 27 AAV, по меньшей мере 28 AAV, по меньшей мере 29 AAV, по меньшей мере 30 AAV, по меньшей мере 35 AAV, по меньшей мере 40 AAV, по меньшей мере 45 AAV, по меньшей мере 50 AAV, по меньшей мере 60 AAV, по меньшей мере 70 AAV, по меньшей мере 80 AAV, по меньшей мере 90 AAV или по меньшей мере 100 AAV в просвете ВВ.

[0012] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит от по меньшей мере 1 AAV до по меньшей мере около 100 AAV. В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, содержит от по меньшей мере около 5 AAV до по меньшей мере 100 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 75 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 50 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 45 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 40 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 35 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 30 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 25 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 20 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 15 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 10 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 100 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 75 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 50 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 45 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 40 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 35 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 30 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 25 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 20 AAV, или от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 15 AAV в просвете ВВ.

[0013] В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, содержит от по меньшей мере около 1 AAV до по меньшей мере около 20 AAV.

[0014] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например экзосома, содержит от по меньшей мере около 5 AAV до по меньшей мере около 20 AAV.

[0015] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, содержит билипидную мембрану, имеющую поверхность просвета и внешнюю поверхность, при этом по меньшей мере один из AAV не связан с поверхностью просвета ВВ.

[0016] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, содержит билипидную мембрану, имеющую поверхность просвета и внешнюю поверхность, при этом по меньшей мере один из AAV связан с поверхностью просвета ВВ.

[0017] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один AAV связан с поверхностью просвета ВВ ковалентной связью или нековалентной связью.

[0018] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один AAV связан с поверхностью просвета ВВ ковалентной связью и нековалентной связью.

[0019] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (ВВ), например, экзосоме, содержащей (i) AAV и (ii) каркасный белок, где AAV связан с каркасным белком на внешней поверхности ВВ. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит внеклеточный домен, и где AAV связан с внеклеточным доменом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит трансмембранную область, где трансмембранная область прикреплена к мембране ВВ, например, экзосомы. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит внутриклеточный домен.

[0020] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает гетерологичный полипептид, где гетерологичный полипептид слит с внеклеточным доменом каркасного белка, и где гетерологичный полипептид связывается с AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок представляет собой трансмембранный белок I типа или трансмембранный белок II типа. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид слит с N-концом или C-концом внеклеточного домена каркасного белка.

[0021] В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид содержит рецептор, лиганд, антигенсвязывающий фрагмент, субстрат, его фрагмент или их комбинацию; и где гетерологичный полипептид специфически взаимодействует с одним или более белками на поверхности AAV. В некоторых вариантах реализации гетерологичный полипептид содержит антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из

группы, состоящей из антигенсвязывающего фрагмента антитела, верблюжьего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, одноцепочечного FAB, наноантитела, акульего IgNAR и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает наноантитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает один или более белков на поверхности AAV.

[0022] В некоторых вариантах осуществления один или более белков на поверхности AAV содержат капсидный белок, выбранный из группы, состоящей из VP1, VP2, VP3 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления один или более белков на поверхности AAV представляют собой отличную от AAV последовательность, слитую с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок выбран из VP1, VP2, VP3 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с VP2. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с N-концом VP2. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP2. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с VP3. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с N-концом VP3. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP3. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с VP1. В некоторых вариантах осуществления отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP1.

[0023] В некоторых вариантах осуществления взаимодействие между аффинным лигандом (рецептором, лигандом, антигенсвязывающим фрагментом) является обратимым при определенных условиях, включая изменения pH (например, снижения pH в эндолизосомальном компартменте), изменения окислительно-восстановительных условий (увеличение или уменьшение окисления), изменение ионных условий или изменение концентрации двухвалентных или трехвалентных катионных или анионных молекул.

[0024] В некоторых вариантах осуществления (i) каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим рецептор Fc; и (ii) AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с областью Fc константной области иммуноглобулина (Fc). В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор, выбранный из Fc-гамма-рецептора I (FcγR1), FcγRIIA, FcγRIIB, FcγIIIA и FcγIIIB; и при этом Fc представляет собой Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой FcγR1, а Fc представляет собой Fc IgG. В некоторых

вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-альфа-рецептор I (Fc α R1), и при этом Fc представляет собой Fc IgA. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-эпсилон-рецептор, выбранный из Fc-эпсилон-рецептора I (Fc ϵ R1) и Fc ϵ R2, и при этом Fc представляет собой Fc из IgE.

[0025] В некоторых вариантах осуществления (i) каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим фрагмент, наноантитело; и (ii) AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с областью Fc константной области иммуноглобулина (Fc). В некоторых вариантах осуществления наноантитело специфически связывается с Fc, слитым с капсидным белком.

[0026] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP2, слитый с Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc слит с N-концом по меньшей мере одного VP2. В некоторых вариантах осуществления Fc слит с расположенной на внутренней поверхности петель по меньшей мере одного VP2. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP3, слитый с Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP3, который не слит с Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc слит с N-концом по меньшей мере одного VP3. В некоторых вариантах осуществления Fc слит с расположенной на внутренней поверхности петель по меньшей мере одного VP3. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP1, слитый с Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP1, который не слит с Fc.

[0027] В некоторых вариантах осуществления Fc слит с расположенной на поверхности петель VP1. В некоторых вариантах осуществления расположенная на поверхности петля содержит последовательность GTTTQSR (SEQ ID NO: 43). В некоторых вариантах осуществления расположенная на поверхности петля содержит аминокислотные остатки с 453 по 459 VP1 (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота расположенной на поверхности петли заменена на Fc. В некоторых вариантах осуществления расположенная на поверхности петля заменена на Fc.

[0028] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок слит с антигенсвязывающим фрагментом, где антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает антиген на поверхности AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV сконструирован так, чтобы включать конкретную

гетерологичную последовательность (эпитоп) на поверхности AAV, и этот эпитоп затем распознается специфическим антигенсвязывающим фрагментом.

[0029] В некоторых вариантах осуществления AAV дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из секретируемого белка, рецептора, структурного белка, сигнального белка, сенсорного белка, регуляторного белка, транспортного белка, запасного белка, защитного белка, двигательного белка, фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, цитокина, хемокина, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, рецептора липопротеинов низкой плотности, альфа-глюкозидазы, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе или любой их комбинации.

[0030] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует белок фактора VIII или белок фактора IX. В некоторых вариантах осуществления белок фактора VIII представляет собой фактор VIII дикого типа, фактор VIII с удаленным В-доменом, слитый белок фактора VIII или любую их комбинацию.

[0031] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует компонент A Rab-геранилгеранилтрансферазы 1 (REP1). В некоторых вариантах осуществления REP1 содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 45.

[0032] В некоторых вариантах осуществления AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh74, AAV типа rh32.33, AAV типа rh10, AAV типа Anc80, AAV типа PHP, змеиног AAV, птичьего AAV, AAV крупного рогатого скота, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, AAV приматов, AAV человека, AAV свиньи, синтетического AAV, любой их комбинации.

[0033] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); члена 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); члена 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4

(белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазы N (ANPEP), неприлизина (мембранной металлоэндопептидазы; MME), члена 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилина-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B, их фрагментов и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок представляет собой PTGFRN.

[0034] В некоторых вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком.

[0035] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета ВВ. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит N-концевой домен, эффекторный домен и трансмембранный домен, причем ND является миристоилированным, и при этом N-концевой домен (ND) и/или эффекторный домен (ED) связаны с поверхностью просвета ВВ.

[0036] В некоторых вариантах осуществления ND связан с поверхностью просвета экзосомы посредством миристоилирования.

[0037] В некоторых вариантах осуществления ED связан с поверхностью просвета экзосомы, посредством ионного взаимодействия.

[0038] В некоторых вариантах осуществления ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более последовательно расположенных основных аминокислот, причем основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg, His и любой их комбинации.

[0039] В некоторых вариантах осуществления основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, при этом n является целым числом от 1 до 10.

[0040] В некоторых вариантах осуществления ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

[0041] В некоторых вариантах осуществления 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 включает основную аминокислоту.

[0042] В некоторых вариантах осуществления X2 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; X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His; или любую их комбинацию.

[0043] В некоторых вариантах осуществления ND 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.

[0044] В некоторых вариантах осуществления X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0045] В некоторых вариантах осуществления ND и ED соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.

[0046] В некоторых вариантах осуществления ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20), (v) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21) или (vi) любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29), (ix) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 30), (x) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 31) и (xi) любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ND содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17).

[0047] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок Y имеет длину 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.

[0048] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSKKKKSGSGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

[0049] 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.

[0050] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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 на около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

[0051] В некоторых вариантах осуществления C-конец каркасного белка связан с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления ВВ представляет собой экзосому.

[0052] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к аденоассоциированному вирусу (AAV), содержащему капсид, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, выбранный из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3; где по меньшей мере один капсидный белок связан с каркасным белком.

[0053] В некоторых вариантах осуществления ВВ дополнительно содержит второй каркасный белок, который включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигин (белок BSG); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класс белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазу N (ANPEP), неприлизин (мембранную металлоэндопептидазу; MME), член 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилин-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин, LAMP2, LAMP2B, их фрагменты и любую их комбинацию.

[0054] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV включает VP2. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок слит с N-концом VP2. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок слит с C-концом VP2. В некоторых вариантах осуществления количество VP2, слитых с каркасным белком, меньше количества VP2, не слитых с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления количество VP2, слитых с каркасным белком, в около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз, около 10 раз, около 11 раз, около 12 раз, около 13 раз, около 14 раз, около 15 раз, около 16 раз, около 17 раз, около 18 раз, около 19 раз, около 20 раз, около 21 раз, около 22 раза, около 23 раза, около 24 раза, около 25 раз, около 30 раз, около 35 раз, около 40 раз, около 46 раз, около 50 раз или в около 100 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP2, не слитого с каркасным белком.

[0055] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок представляет собой трансмембранный белок I типа или трансмембранный белок II типа. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок I типа включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигин (белок BSG); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелую цепь

антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класс белков-переносчиков АТФ (белки TP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазу N (ANPEP), неприлизин (мембранную металлоэндопептидазу; MME), член 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилин-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин, LAMP2, LAMP2B, их фрагменты и любую их комбинацию.

[0056] В некоторых вариантах осуществления С-конец трансмембранного белка I типа или N-конец трансмембранного белка II типа связан с димеризующим агентом, например, партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию химически индуцированного димера включает один из партнеров по связыванию, выбранный из группы, состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737). В некоторых вариантах осуществления химически индуцированный димер включает слитый комплекс FRB-FKBP. В некоторых вариантах осуществления FRB представляет собой FRB mTOR. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с одним из партнеров по связыванию химически индуцированного димера, тем самым образуя димерный комплекс, когда партнеры по связыванию входят в контакт с химическим соединением.

[0057] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV включает VP2. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления количество VP2, слитых с партнером по связыванию химически индуцированного димера, меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP, который не слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления количество VP2, связанных с партнером по связыванию химически индуцированного димера, в около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз, около 10 раз, около 11 раз, около 12 раз, около 13 раз, около 14 раз, около 15 раз, около 16 раз, около 17 раз, около 18 раз, около 19 раз, около 20 раз, около 21 раз, около 22 раза, около 23 раза, около 24 раза, около 25 раз,

около 30 раз, около 35 раз, около 40 раз, около 46 раз, около 50 раз или в около 100 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP2, не слитого с партнером по связыванию.

[0058] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию химически индуцированного димера вставлен во внутреннюю петлю капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления внутренняя петля содержит последовательность GTTTQSR (SEQ ID NO: 43). В некоторых вариантах осуществления внутренняя петля содержит аминокислотные остатки 453–459 из SEQ ID NO: 44 (капсидный белок VP1 AAV2; Uniprot P03135). В некоторых аспектах партнер по связыванию химически индуцированного димера вставлен в сайт, выбранный из R585, R587, R588 или любой их комбинации капсидного белка VP2 AAV2 или гомологичного сайта в подобном капсидном белке (см., например, Buning and Srivastava, *Methods and Clinical Development* 12: 248-266 (март 2019 г.), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота внутренней петли заменена партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера с помощью линкера.

[0059] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит ковалентную связь или одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер.

[0060] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с аффинным агентом, который специфически связывается с AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент представляет собой рецептор AAV, однодоменное антитело, наноантитело, верблужье антитело, фрагмент VHH, новый антигенный рецептор иммуноглобулина (IgNAR), антитело или его антигенсвязывающую часть, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления его антигенсвязывающая часть содержит одноцепочечный Fab. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связывается с одним или более капсидными белками AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более капсидных белков AAV представляют собой белки, активирующие сборку AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент не связывается с мономером капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент включает рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV представляет собой AAVR или GPR108.

[0061] В некоторых вариантах осуществления AAV дополнительно содержит генетическую кассету. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из секретируемого белка, рецептора, структурного белка, сигнального белка, сенсорного белка, регуляторного белка, транспортного белка, запасного белка, защитного белка, двигательного белка, фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, цитокина, хемокина, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, рецептора липопротеинов низкой плотности, альфа-глюкозидазы, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует белок фактора VIII или белок фактора IX. В некоторых вариантах осуществления белок фактора VIII представляет собой фактор VIII дикого типа, фактор VIII с удаленным В-доменом, слитый белок фактора VIII или любую их комбинацию.

[0062] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует компонент A Rab-геранилгеранилтрансферазы 1 (REP1). В некоторых вариантах осуществления REP1 содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 45.

[0063] В некоторых вариантах осуществления AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh74, AAV типа rh32.33, AAV типа rh10, AAV типа Anc80, AAV типа RNP, змеиного AAV, птичьего AAV, AAV крупного рогатого скота, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, AAV приматов, AAV человека, AAV свиньи, синтетического AAV, любой их комбинации.

[0064] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к AAV во ВВ, описанном в данном документе.

[0065] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к AAV, содержащему VP2, связанному с каркасным белком, содержащим аминокислотную последовательность, как указано 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 включает основную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок представляет собой каркасный белок, описанный в данном документе.

[0066] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к AAV, содержащему VP2, связанный с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию химически индуцированного димера включает любой из описанных партнеров по связыванию.

[0067] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к AAV, содержащему один или более капсидных белков, специфически связанных с аффинным агентом, описанным в данном документе.

[0068] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей ВВ, например, экзосому или AAV, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0069] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клетке, которая продуцирует ВВ, например, экзому, или AAV, описанный в данном документе.

[0070] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клетке, содержащей первую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок AAV, связанный с каркасным белком, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит вторую нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, описанный в данном документе.

[0071] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клетке, содержащей первый нуклеотид, кодирующий белок AAV, связанный с партнером по связыванию химически индуцированного димера, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующего партнера по связыванию химически индуцированного димера, который связан с каркасным белком, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит третью нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, описанный в данном документе.

[0072] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клетке, содержащей первый нуклеотид, кодирующий аффинный агент, описанный в данном документе, связанный с каркасным белком, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит вторую нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, описанный в данном документе.

[0073] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к набору, содержащему выделенную ВВ, описанную в данном документе, например, экзосому, и инструкции по применению.

[0074] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения ВВ, например, экзосом, включающему культивирование клетки, описанной в данном документе, в подходящих условиях и получение ВВ.

[0075] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу предотвращения или лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту ВВ, AAV или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из рака, гемофилии, диабета, дефицита фактора роста, заболевания глаз, болезни Помпе, болезни Гоше, лизосомальной болезни накопления, муковисцидоза, кистозного фиброза, мышечной дистрофии Дюшенна — Беккера, транстиретинового амилоидоза, гемофилии А, гемофилии В, аденозиндезаминазной недостаточности, врожденного амавроза Лебера, X-сцепленной адренолейкодистрофии, метахроматической лейкодистрофии, недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), болезни накопления гликогена 1А, синдрома Криглера — Найяра, первичной гипероксалурии 1 типа, острой интермиттирующей порфирии, фенилкетонурии, семейной гиперхолестеринемии, мукополисахаридоза VI типа, дефицита α 1-антитрипсина, синдрома Ретта, синдрома Драве, синдрома Ангельмана, миотонической дистрофии 1-го типа, синдрома ломкой X-хромосомы, болезни Хантингтона, атаксии Фридрейха и гиперхолестеринемии.

[0076] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу доставки AAV субъекту, включающему введение субъекту ВВ, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят парентерально, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутриопухолево, интраназально, подкожно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента.

[0077] В некоторых аспектах введение ВВ представляет собой интраокулярное введение. В некоторых аспектах интраокулярное введение представляет собой интравитреальное введение, интракамерное введение, субконъюнктивальное введение, субретинальное введение, субсклеральное введение, интрахориоидальное введение и любую их комбинацию. В некоторых аспектах интраокулярное введение включает инъекцию ВВ. В некоторых аспектах интраокулярное введение представляет собой интравитреальную инъекцию. В некоторых аспектах интраокулярное введение включает имплантацию устройства для доставки, содержащего композицию. В некоторых аспектах

устройство для доставки представляет собой устройство для интраокулярной доставки. В некоторых аспектах устройство для интраокулярной доставки представляет собой интравитреальный имплант или склеральный имплант. В некоторых аспектах устройство для доставки представляет собой устройство для доставки с замедленным высвобождением. В некоторых аспектах устройство для доставки является биоразлагаемым. В некоторых аспектах интраокулярное введение ВВ предназначено для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из выбранной из группы, состоящей из макулярной дегенерации, катаракты, диабетической ретинопатии, глаукомы, амблиопии, косоглазия, ретинопатии, врожденного амавроза Лебера или любой их комбинации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0078] На фиг. 1 представлено графическое изображение капсидного белка AAV (например, VP1, VP2 или VP3), слитого с С-концом каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17).

[0079] На фиг. 2 представлено графическое изображение капсида VP2 AAV, слитого с димеризующим агентом, например, связывающим FKBP-рапамицин агентом (FRB). Этот партнер по связыванию сливают с N-концом капсидного белка VP2. Соответствующий партнер по связыванию (например, FKBP) связан с С-концом либо PTGFRN, либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17).

[0080] На фиг. 3А и 3В представлены графические изображения капсидного белка AAV (например, VP1, VP2 или VP3), слитого с димеризующим агентом, например, партнером по связыванию химически индуцированного димера FRB. Партнер по связыванию вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1) в положение 455. AAV продуцируется в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии рапамицина для индукции димеризации FRB).

[0081] На фиг. 4А-4С показан каркасный белок, содержащий аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), связанный с рецептором AAV (AAVR; фиг. 4А), с показанным здесь аффинным к AAV агентом, связанным через каркас Y (фиг. 4С) и каркасный белок X, связанный с аффинным к AAV агентом (фиг. 4В).

[0082] На фиг. 5 представлено графическое изображение каркасного белка (например, PTGFRN), связанного во внеклеточном домене с антигенсвязывающим доменом (наноантителом). Антигенсвязывающий домен (наноантитело) специфически связывает эпитоп на капсиде AAV, такой как VP1, VP2 или VP3.

[0083] На фиг. 6 представлено графическое изображение капсидного белка (например, VP1, VP2 или VP3), связанного с областью Fc IgG. Каркасный белок (например, PTGFRN) связан либо с Fc γ R1, либо с наноантителом к Fc, которое специфически связывает Fc. Fc γ R1 или наноантитело к Fc связано с внеклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN).

[0084] На фиг. 7А показана схема каркасного белка (например, PTGFRN), связанного с рецептором AAV (AAVR). AAVR связан с внеклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN) и связывает эпитоп на капсиде AAV, например, VP1, VP2 или VP3. AAVR может представлять собой PKD1, PKD2 или одноцепочечные антитела. На фиг. 7В представлен гель, демонстрирующий, что были успешно сконструированы экзосомы, содержащие рецептор AAV, слитый с каркасным белком X («экзосомы AAVR»).

[0085] На фиг. 8А и 8В показаны данные биослойной интерферометрии (Octet), демонстрирующие, что экзосомы, содержащие AAVR, слитый с каркасным белком, связываются с иммобилизованным AAV2 (как показано на фиг. 8А), а контрольные экзосомы - нет.

[0086] На фиг. 9А представлено изображение белкового геля из равных количеств клеточного лизата из цитозоля (слева) и ядра (справа), загруженного в денатурирующий полиакриламидный гель. На фиг. 9В показан вестерн-блоттинг для Etp-GFP, Etp-VP2 и FRB-VP2 с использованием антител, специфичных для метки α FLAG (экспрессированных на всех конструкциях). На фиг. 9С показан вестерн-блоттинг с использованием антител, специфичных к α -гистону H4 (ядерный маркер) в лизатах как цитозоля, так и ядра.

[0087] На фиг. 10А-10D показаны результаты различных серотипов капсида AAV, трансфицированных в клетки HEK293Т, и клетки HEK293, адаптированные для суспензионной культуры (HEK293SF). На фиг. 10А-10D показано, что капсиды AAV1, AAV2, AAV3, AAV5 и AAV6 обнаруживаются с помощью вестерн-блоттинга.

[0088] На фиг. 11А показано разделение компонентов смеси с помощью ультрацентрифугирования. На фиг. 11В показаны результаты результатов NTA (частиц/мл) и кПЦР (копий гена / мл (КГ/мл)) в собранных фракциях (1-10), как показано на диаграмме на фиг. 11А.

[0089] На фиг. 12А-12С показан вестерн-блоттинг десяти собранных фракций, проанализированных на присутствие белка VP1, VP2 и VP3, для различных периодов времени воздействия. Полипептиды VP1, VP2 и VP3 наиболее заметно видны во фракциях 8, 9 и 10, где они не связаны с экзосомами. Фракции 1, 2, 3 и 5 также имеют определяемые VP1, VP2 и VP3 и, как было обнаружено, связаны с более высокой концентрацией экзосом в этих фракциях.

[0090] На фиг. 13 показана хроматограмма элюата для культуры клеток НЕК293Т, трансфицированных AAV9 с использованием способа тройной трансфекции. Для разделения использовали элюирование с линейным градиентом (LGE) с увеличением концентрации NaCl от 150 mM NaCl до 1 M NaCl в двадцати объемах колонки.

[0091] На фиг. 14А показан сбор фракций F1-F8 в первичном пике элюирования, как показано на фиг. 9 и данные, полученные в результате анализ траекторий наночастиц для определения количества экзосом и размера частиц. На фиг. 14В-14D представлены полученные с помощью криогенной электронной микроскопии (криоЭМ) изображения экзосом, содержащих серотип AAV5 (фиг. 14В-14С) и серотип AAV9 (фиг. 14D).

[0092] На фиг. 15 показано разделение каждой отдельной фракции F1-F8 с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC).

[0093] На фиг. 16 показаны результаты эксперимента, в котором клетки трансфицировали фиксированной КГ/лунка (фиксированная MOI: 6000) со свободным («AAV») или инкапсулированным AAV9-GFP («экзо») в присутствии IgG к AAV. На фиг. 12 показана экспрессия GFP, измеренная по интенсивности флуоресценции, как определяемой каждые три часа в течение четырех дней в трех повторностях.

[0094] На фиг. 17В представлено графическое представление данных, демонстрирующее экспрессию GFP из AAV, ассоциированного с экзосомами, или свободного AAV в культуре клеток в присутствии возрастающих концентраций ингибирующего антитела к AAV9. На фиг. 17В показано сравнительное исследование экспрессии GFP с использованием различных образцов (Chrom F3 - Chrom F9) либо свободного, либо инкапсулированного AAV9-GFP в присутствии моноклональных антител к AAV в различных разведениях.

[0095] На фиг. 18А-18D показаны результаты прямого исследования образца, полученного из фракции F7, демонстрирующие сравнение интенсивности флуоресценции экспрессии GFP в культуре клеток HeLa с использованием свободного («AAV») или инкапсулированного AAV9-GFP («экзосома-AAV»), измеренные в через 24 ч (фиг. 18А), 48 ч (фиг. 18В), 72 ч (фиг. 18С), и 96 ч (фиг. 18D) после добавления образца к культуре клеток HeLa.

[0096] На фиг. 19 показано сравнительное исследование экспрессии люциферазы с использованием свободного («свободный AAV9») или инкапсулированного AAV («экзосома-AAV») в ответ на возрастающие концентрации внутривенного иммуноглобулина («IVIG»).

[0097] На фиг. 20 представлена гистограмма, иллюстрирующая уровень экспрессии nanoLuc (ОЕЛ/мг белка) в гомогенизированных глазах мыши через 2 недели после введения

контроля PBS, свободного AAV9, кодирующего секретируемый nanoLuc, или экзосомы, содержащей AAV9, кодирующую секретируемый nanoLuc.

[0098] На фиг. 21A представлено графическое изображение, иллюстрирующее ассоциацию AAV с поверхностью просвета мембраны экзосомы посредством взаимодействия AAV с каркасным белком Y, слитым с аффинным к AAV лигандом. На фиг. 21B и 21C представлены гистограммы, демонстрирующие, что загрузка экзосом с использованием каркаса Y, слитого с аффинным к AAV лигандом, приводит к увеличению локализации AAV в экзосомах в процентах от общего высвобожденного AAV (фиг. 21B) и относительно обогащения AAV в экзосомах, лишенных слитой конструкции каркаса Y (фиг. 21C).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0099] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (BB), например, экзосоме, содержащей AAV и каркасный белок. В некоторых аспектах AAV находится в просвете BB. В некоторых аспектах AAV связан с мембраной BB, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV связан с поверхностью просвета BB, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV связан с внешней поверхностью BB, например, с экзосомой. В некоторых аспектах AAV, связанный с экзосомой, имеет измененные свойства по сравнению со свободным AAV в отдельности.

[0100] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (BB), например, экзосоме, содержащей аденоассоциированный вирус (AAV) и каркасный белок, где AAV присутствует в просвете BB. В определенных вариантах осуществления количество AAV в просвете экзосомы выше, чем количество AAV в просвете эталонной BB, где AAV в просвете эталонной BB были введены без каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления процент BB, которые содержат AAV в просвете, выше, чем у эталонной BB, где AAV были введены без каркасного белка. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к BB, например экзосоме, содержащей по меньшей мере пять AAV в просвете BB. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к AAV, содержащему по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и VP3), связанный с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок 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 включает основную аминокислоту.

[0101] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (ВВ), например, экзосоме, содержащей аденоассоциированный вирус (AAV) и каркасный белок, где AAV связан с каркасным белком на внешней поверхности ВВ. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит внеклеточный домен, и AAV связан с внеклеточным доменом каркасного белка. В определенных вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком нековалентным взаимодействием.

[0102] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, сконструированному так, чтобы он содержал аффинный к AAV лиганд.

[0103] Неограничивающие примеры различных вариантов осуществления показаны в настоящем изобретении.

I. Определения

[0104] Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0105] 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 более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0106] Кроме того, использование в настоящем документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения фраз «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).

[0107] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[0108] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области

техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в раскрытии этого изобретения.

[0109] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записывают слева направо в направлении от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записывают слева направо в направлении от amino-конца к карбокси-концу. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на спецификацию в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

[0110] В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «около» используется 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 значение с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0111] В контексте данного документа термины «внеклеточная везикула», «ВВ» используются взаимозаменяемо и относятся к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая окружает внутреннее пространство (например, просвет). Внеклеточные везикулы представляют собой все связанные с мембраной везикулы (например, экзосомы, нановезикулы, микровезикулы), которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различную макромолекулярную полезную нагрузку, которая может находиться во внутреннем пространстве (т.е. просвете), располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может содержать нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка содержит AAV. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может содержать AAV и нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их

комбинации. В некоторых аспектах термин внеклеточные везикулы или ВВ относится к популяции внеклеточных везикул (ВВ).

[0112] 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), везикулярные 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, прокариотических или эукариотических клеток и/или культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы продуцируются клетками, которые экспрессируют один или более продуктов трансгена.

[0113] В контексте данного документа термин «экзосома» относится к внеклеточной везикуле (ВВ) с диаметром от 20 до 300 нм (*например*, от 40 до 200 нм). Экзосомы содержат мембрану, которая окружает внутреннее пространство (т.е. просвет), и, в некоторых вариантах осуществления, могут быть получены из клетки (*например*, клетки-продуцента) путем прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или путем слияния поздней эндосомы или мультивезикулярного тельца (MVB) с цитоплазматической мембраной. В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит каркасный фрагмент. Как описано ниже, экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основании ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению продуцируются клетками, которые экспрессируют один или более продуктов трансгена. В определенных вариантах осуществления ВВ, *например*, экзосомы, по настоящему изобретению образуются клетками, которые совместно продуцируют AAV. В некоторых аспектах термин экзосома относится к популяции экзосом.

[0114] В контексте данного документа термин «нановезикула» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от 20 нм до 250 нм (*например*, от 30 до 150 нм) и образуется из клетки (*например*, клетки-продуцента) с помощью прямой или косвенной манипуляции, так что нановезикулы не будут продуцироваться клеткой без манипуляции. Соответствующие манипуляции с клеткой для получения нановезикул включают, но не ограничиваясь ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления продуцирование нановезикул может приводить к разрушению клетки-продуцента. В некоторых вариантах

осуществления популяция нановезикул, описанная в данном документе, по сути не содержат везикул, которые происходят из клеток путем прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных вариантах осуществления нановезикулы содержат каркасный белок. Нановезикулы, сразу после получения из клетки-производителя, могут быть выделены из клетки-производителя на основании их размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0115] Используемый в данном документе термин «микровезикулы» относится к внеклеточным везикулам, образованным путем отпочкования и деления мембранных везикул с поверхности клетки.

[0116] Используемый в документе термин «каркасный белок» относится к полипептиду, который можно использовать для закрепления полезной нагрузки или любого другого представляющего интерес соединения (например, AAV) на ВВ. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой полипептид, который в природе не присутствует во ВВ. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает синтетический полипептид. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает модифицированный белок, при этом соответствующий немодифицированный белок естественным образом присутствует во ВВ («белок ВВ»), например, в экзосоме. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает белок, который в природе присутствует во ВВ, или его фрагмент, например, фрагмент белка ВВ, где белок экспрессируется на более высоком уровне, чем встречающийся в природе. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит неполипептидный фрагмент. В других вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит липид и/или углевод. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает слитый белок, содержащий (i) встречающийся в природе белок ВВ или его фрагмент и (ii) гетерологичный пептид (например, антигенсвязывающий домен, капсидный белок, рецептор Fc, партнер по связыванию химически индуцированного димера или любую их комбинацию).

[0117] В контексте данного документа термин «партнер по связыванию» или «димеризующий агент» относится к одному представителю по меньшей мере из двух элементов, которые взаимодействуют друг с другом с образованием мультимера (например, димера). В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию является первым партнером по связыванию, который взаимодействует со вторым партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию является первым партнером по связыванию, который взаимодействует со вторым партнером по связыванию и/или

третьим партнером по связыванию. Любые партнеры по связыванию или димеризующие агенты можно использовать в композициях и способах, раскрываемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию может представлять собой полипептид, полинуклеотид, жирную кислоту, малую молекулу или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления партнер по связыванию (например, первый партнер по связыванию и/или второй партнер по связыванию) выбран из первого и второго партнеров по связыванию химически индуцированного димера, выбранного из группы, состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737).

[0118] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает гибрид, содержащий (i) белок, который в природе присутствует во ВВ (белок ВВ) или его фрагмент, и (ii) вторую полипептидную последовательность. Термин «каркас X» относится к белкам экзосомы, которые были недавно обнаружены на поверхности экзосом. В некоторых вариантах осуществления белок ВВ выбран из белка ВВ, описанного в патенте США № 10 195 290, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления белок ВВ выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); члена 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); члена 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазы N (ANPEP), неприлизина (мембранной металлоэндопептидазы; MME), члена 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилина-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B, их фрагментов и любой их комбинации. Используемый в данном документе термин «каркас Y» относится к белкам экзосомы, которые недавно были идентифицированы в просвете экзосомы, или их фрагменту. *См., например,* международную заявку № PCT/US2018/061679, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Неограничивающие примеры каркасных белков Y включают белки, выбранные из группы, состоящей из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C («MARCKS» или

«белка MARCKS»); подобного миристоилированного, богатого аланином субстрата киназы С белка 1 («MARCKSL1» или «белка MARCKSL1»); и кислоторастворимого белка 1 головного мозга («BASP1» или «белка BASP1»).

[0119] В определенных вариантах осуществления каркасный белок Y содержит фрагмент белка BB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), где С-концевой остаток глицина миристоилирован. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит (a) (i) фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP или (ii) аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17) и (b) трансмембранный домен, при этом трансмембранный домен связан (например, посредством линкера) с С-концом последовательности (a) (i) или (a) (ii). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит (a) (i) фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или BASP или (ii) аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (b) трансмембранный домен и (c) внеклеточный домен, где трансмембранный домен связан (например, посредством линкера) с С-концом последовательности (a) (i) или (a) (ii), и при этом внеклеточный домен связан с С-концом трансмембранных доменов.

[0120] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок представляет собой трансмембранный белок. В контексте данного документа термин «трансмембранный белок» относится к любому белку, который содержит внеклеточный домен (например, по меньшей мере одну аминокислоту, которая расположена на внешней стороне мембраны BB, например, экзосомы, например, экстравезикулярно), трансмембранный домен (например, по меньшей мере одну аминокислоту, которая расположена внутри мембраны BB, например, внутри мембраны экзосомы) и внутриклеточный домен (например, по меньшей мере одну аминокислоту, которая расположена на внутренней стороне мембраны BB, например, интравезикулярно). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, описанный в данном документе, представляет собой трансмембранный белок I типа, при этом N-конец трансмембранного белка расположен во внеклеточном пространстве, например, вне мембраны (или внешнем по отношению к ней пространстве), которая окружает BB, например, экзосому, например, экстравезикулярно. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, описанный в данном документе, представляет собой трансмембранный белок II типа, где N-конец трансмембранного белка расположен в просвете, например, во внутриклеточном пространстве, например, внутри мембраны,

например, на стороне просвета мембраны, которая окружает ВВ, например, экзосому, например, интравезикулярно.

[0121] В контексте данного документа термин «внеклеточный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «внешний», «наружный» и «экстравезикулярный», при этом каждый термин относится к элементу, который находится за пределами мембраны, которая окружает ВВ. В контексте данного документа термин «внутриклеточный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «интернальный», «внутренний» и «интравезикулярный», при этом каждый термин относится к элементу, который находится внутри мембраны, которая окружает ВВ. Термин «просвет» относится к пространству внутри мембраны, окружающей ВВ. Соответственно, элемент, который находится внутри просвета ВВ может упоминаться в данном документе как «расположенный в просвете» или «просветный».

[0122] Используемый в данном документе термин «заякоренный/прикрепленный» относится к элементу, который связан с мембраной. В некоторых вариантах осуществления элемент, который прикреплен к мембране, связан с трансмембранным белком, при этом трансмембранный белок прикрепляет элемент к мембране. В некоторых вариантах осуществления элемент, который прикреплен к мембране, связан с каркасным белком, который содержит мотив (например, каркасный белок, содержащий GGKLSKK (SEQ ID NO: 17)), который взаимодействует с мембраной, тем самым прикрепляя элемент на мембране. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит остаток миристоилированной аминокислоты на N-конце каркасного белка, где миристоилированная аминокислота прикрепляет белок каркаса к мембране ВВ. Элемент может быть прикреплен к мембране непосредственно (например, пептидной связью) или посредством линкера.

[0123] В контексте данного документа термин «сконструированная в просвете экзосома» относится к ВВ, например, экзосоме, при этом мембрана или просвет ВВ, например, экзосомы, модифицирована по своему составу таким образом, что просвет сконструированной ВВ, например, экзосомы, отличается от просвета ВВ, например, экзосомы, до модификации или встречающейся в природе ВВ, например, экзосомы. Конструирование может происходить непосредственно в просвете или в мембране ВВ, *например*, экзосомы, так что просвет ВВ, *например*, экзосомы изменяется. Например, в состав мембраны входит белок, липид, малая молекула, углевод и *т. д.*, так что просвет ВВ, *например*, экзосомы изменяется. 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. В некоторых аспектах сконструированная в просвете экзосомы содержит экзогенный белок (*т.е.* белок, который ВВ, *например*, экзосомы не экспрессирует естественным образом) или его фрагмент или вариант, которые могут экспонироваться в просвете ВВ, *например*, экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на внутреннем слое ВВ, *например*, экзосомы. В других вариантах осуществления сконструированная в просвете ВВ, *например*, экзосомы обладает более высокой экспрессией природного белка экзосомы (*например*, любой белок ВВ, описанный в данном документе) или его фрагмента, или варианта, которые могут быть экспонированы в просвет экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного в просвет экзосомы, по сравнению с несконструированной или модифицированной экзосомой.

[0124] Используемый в данном документе термин «сконструированная на внешней поверхности экзосомы» относится к ВВ, *например*, экзосоме, где мембрана ВВ, *например*, экзосомы, модифицирована по своему составу, так что внешняя поверхность сконструированной ВВ, *например*, экзосомы, отличается от внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, до модификации или встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы. *Например*, мембрана модифицирована по своему составу белка, липида, малой молекулы, углевода и т.д., так что внешняя поверхность ВВ, *например*, экзосомы, модифицируется. 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. В некоторых аспектах сконструированная на внешней поверхности экзосомы содержит экзогенный белок (*т.е.* белок, который ВВ, *например*, экзосомы, не экспрессирует естественным образом) или его фрагмент или вариант, которые могут экспонироваться на внешней поверхности экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на внешнем слое ВВ, *например*, экзосомы. В других вариантах осуществления сконструированный на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, имеет более высокую экспрессию природного белка экзосомы (*например*, любого белка ВВ, описанного в данном документе) или его фрагмента или варианта, которые могут быть экспонированы на внешней поверхности экзосомы, или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на внешней поверхности экзосомы.

[0125] Термин «модифицированный», когда он используется в контексте каркасных белков, описанных в данном документе, относится к изменению или конструированию белка, например, белка ВВ, таким образом, что модифицированный белок, например, каркасный белок, отличается от природного белка, например, белка ВВ. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок, например, каркасный белок, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности природного белка, например, белка ВВ. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок, например, каркасный белок включает делецию одной или более аминокислот по сравнению с природным белком, например, белком ВВ. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок, например, каркасный белок, представляет собой слитый белок, содержащий белок ВВ (или его фрагмент) и вторую пептидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок, например, каркасный белок, сохраняет одну или более функций немодифицированного белка, например, белка ВВ. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок сохраняет только способность немодифицированного белка, например, белка ВВ, связываться с поверхностью просвета или внешней поверхностью мембраны ВВ, например, поверхностью просвета или внешней поверхностью экзосомы.

[0126] Используемый в данном документе термин «измененные свойства» при использовании в контексте ВВ, например, экзосомы и/или AAV, описанных в данном документе, относится к изменению физических и/или функциональных свойств ВВ, например, экзосомы и/или AAV относительно немодифицированной ВВ, например, экзосомы и/или AAV. В некоторых вариантах осуществления измененное свойство включает лучший терапевтический эффект. Например, в некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению обладают более высокой инфективностью, более высокой активностью, большей активностью, более быстрой кинетикой трансдукции и/или пониженной иммуногенностью (например, повышенной толерантностью к ускользанию от иммунного надзора), чем немодифицированный AAV, например, AAV, который не присутствует в просвете описанной в данном документе ВВ. В некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению менее восприимчивы к иммунному ответу, чем немодифицированный AAV, например, AAV, который не присутствует в просвете описанной в данном документе ВВ. В некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ у субъекта по сравнению с немодифицированным AAV, например, AAV, который не присутствует в просвете описанной в данном документе ВВ.

В некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению допускают многократное дозирование субъекту, при этом инфективность и/или активность AAV сохраняется после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению позволяют проводить исследования с повышением дозы без потери инфективности и/или активности AAV.

[0127] Используемый в данном документе термин «фрагмент» белка (например, каркасный белок или терапевтический белок) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче природной последовательности, с удалением на N- и/или C-конце или с удалением любой части белка по сравнению с природным белком. Используемый в данном документе термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления каркасный белок, который содержит функциональный фрагмент белка ВВ, сохраняет способность прикреплять фрагмент на поверхности просвета или внешней поверхности ВВ, например, экзосомы. Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом, можно выполнить известными в данной области способами определения содержания белка ВВ, например, экзосом, включая вестерн-блоты, анализ методом проточной цитометрии и гибриды фрагментов с аутофлуоресцентными белками, например, такими как GFP. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок, содержащий функциональный фрагмент белка ВВ, сохраняет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100% способности, например, способности прикреплять фрагмент, природного белка ВВ. Функциональный фрагмент необязательно сохраняет все функции полноразмерного белка. Скорее, в некоторых вариантах осуществления фрагмент является функциональным фрагментом, если он сохраняет способность прикреплять фрагмент природного белка ВВ, даже если фрагмент больше не сохраняет какую-либо другую функцию полноразмерного белка.

[0128] В контексте данного документа термин «вариант» молекулы (например, каркасный белок или терапевтический белок) относится к молекуле, которая имеет определенные структурные и функциональные идентичности с другой молекулой при сравнении с помощью способа, известного в данной области техники. Например, вариант белка может включать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или перестановку в другой белок.

[0129] В некоторых вариантах осуществления вариант каркасного белка включает вариант, имеющий по меньшей мере около 70% идентичности полноразмерному зрелому PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3,

ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4, CD13, ANPEP, MME, ENPP1, NRP1, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорным белкам, лактадгерину, LAMP2, LAMP2B, MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагменту (например, функциональному фрагменту) PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4, CD13, ANPEP, MME, ENPP1, NRP1, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, белков LAMP2, LAMP2B, MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0130] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную 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, при замене аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0131] Термин «процентная идентичность последовательности» или «процентная идентичность» между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в окне сравнения, с учетом добавлений или удалений (т. е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающим положением является любое положение, в котором как в целевой, так и в эталонной последовательности представлен идентичный нуклеотид или аминокислота. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогично, гэпы, представленные в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[0132] Процентное значение идентичности последовательностей рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно осуществить при помощи программного обеспечения, легко доступного как для применения в режиме онлайн, так и для загрузки на компьютер. Подходящие программы из системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательностей является *bl2seq*, часть пакета программ BLAST, доступного на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, *например*, Needle, Stretcher, Water или Matcher, являющиеся частью пакета биоинформатических программ EMBOSS и также доступные от Европейского института биоинформатики (EBI) на веб-сайте www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0133] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют в меньшую сторону до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют в большую сторону до 80,2. Также отмечают, что значение длины всегда будет целым числом.

[0134] Специалист в данной области примет во внимание, что построение выравнивания последовательностей для расчета процентной идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. Выравнивание последовательностей можно получить из множественного выравнивания последовательностей. Одной подходящей программой для построения множественного

выравнивания последовательностей является ClustalW2, доступная на веб-сайте www.clustal.org. Другой подходящей программой является MUSCLE, доступная на веб-сайте www.drive5.com/muscle/. Программы ClustalW2 и MUSCLE альтернативно доступны, *например*, от EBI.

[0135] Также следует принять во внимание, что выравнивание последовательностей можно построить путем интеграции данных о последовательностях с данными из гетерогенных источников, таких как данные о структуре (*например*, о кристаллографической структуре белка), данные о функции (*например*, о локализации мутаций) или данные филогенетики. 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.

[0136] Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих типах областей. В одном варианте осуществления варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые вызывают молчащие замены, добавления или делеции, но которые не меняют свойства или активность кодируемого полипептида. В еще одном варианте осуществления варианты нуклеотидов продуцируются молчащими заменами из-за вырожденности генетического кода. В других вариантах осуществления варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, удалены или добавлены в любой комбинации. Полинуклеотидные варианты могут быть созданы по множеству причин, *например* с целью оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (изменение кодонов человеческой мРНК на другие, *например* на те, которые подходят для бактериального хозяина типа *E.coli*).

[0137] Встречающиеся в природе варианты называются «аллельными вариантами» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего определенный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут отличаться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в настоящее раскрытие. Альтернативно, не встречающиеся в природе варианты можно получить при помощи методик мутагенеза или прямого синтеза.

[0138] Используя известные методы белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК, могут быть созданы варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или более аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической

функции. В публикации Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки, сообщалось о том, что белки-варианты KGF, обладали гепарин-связывающей активностью, даже после удаления 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Подобным образом, гамма-интерферон проявлял до десяти раз более высокую активность после удаления 8–10 аминокислотных остатков из карбоксиконца этого белка. (Публикация Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.)

[0139] Более того, имеется достаточно доказательств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, Gayle и коллеги (в публикации *J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), содержание которой полностью включено в данный документ путем ссылки) провели всесторонний мутационный анализ человеческого цитокина IL-1a. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 индивидуальных мутантов IL-1a, в которых в среднем выполняли 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. В каждой возможной аминокислотной позиции исследовали множество мутаций. Исследователи обнаружили, что «[бóльшая] часть молекулы может быть изменена с небольшим влиянием на что-либо из [связывания или биологической активности]». (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.

[0140] Как указано выше, варианты полипептидов включают, *например*, модифицированные полипептиды. Модификации включают, *например*, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (публикация Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например

аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок модифицирован в любом удобном месте. В некоторых вариантах осуществления N-конец каркасного белка является миристоилированным.

[0141] Термины «ассоциированный с», «связанный с» или «конъюгированный с» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения прямого или косвенного взаимодействия между двумя или более элементами. Два элемента могут быть связаны друг с другом ковалентной связью или нековалентной связью и/или взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления первый элемент, например AAV, связан со вторым элементом, например, каркасным белком, пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления первый элемент, например, AAV, связан со вторым элементом, например, каркасным белком, одной или более дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый элемент, например, AAV, связан со вторым элементом, например, каркасным белком, посредством нековалентного взаимодействия, например электростатического взаимодействия, водородной связи, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобного взаимодействия, ион-индуцированного диполя, диполь-индуцированного диполя, ионной связи, координационной связи, хелатирования или любой их комбинации. Первый элемент и второй элемент могут быть связаны напрямую, например, где каркасный белок связан с капсидным белком AAV пептидной связью, без каких-либо промежуточных аминокислот, которые не являются частью последовательности каркасного белка (или его консервативных модификаций) или капсидного белка AAV (или его консервативных модификаций); или первый элемент может быть связан со вторым элементом посредством непрямой ассоциации, например, где AAV связан с мембраной просвета BB посредством взаимодействия с каркасным белком, где N-конец каркасного белка взаимодействует с мембраной просвета BB и C-конец каркасного белка ковалентно связан с капсидным белком AAV. Первый элемент «опосредованно связан» со вторым элементом, где линкер по меньшей мере из одной аминокислоты расположен между первым элементом и вторым элементом. В некоторых аспектах первый элемент и второй элемент связаны напрямую, например, где каркасный белок связан с AAV пептидной связью между каркасным белком и капсидным белком AAV; или первый элемент связан со вторым элементом посредством непрямой ассоциации, например, где AAV связан с внешней поверхностью BB посредством каркасного белка, где каркасный белок прикреплен к внешней поверхности BB и C-конец или N-конец каркасного белка ковалентно связан с капсидным белком AAV.

[0142] Термин «инкапсулированный» или другие грамматические формы этого термина (например, инкапсуляция или инкапсулирование) относится к состоянию или процессу пребывания первого фрагмента (например, AAV) внутри второго фрагмента

(например, ВВ, например, экзосомы) без химического или физического соединения двух групп. В некоторых вариантах осуществления термин «инкапсулированный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «в просвете». Неограничивающие примеры инкапсулирования первого фрагмента (например, AAV) во второй фрагмент (например, ВВ, например, экзосомы) раскрыты в другом месте в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВВ содержит первый AAV, связанный с внешней поверхностью ВВ, и второй AAV, заключенный во ВВ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВВ содержит первый AAV, связанный с внешней поверхностью ВВ, второй AAV, инкапсулированный ВВ, и нацеленный фрагмент, связанный с внешней поверхностью ВВ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВВ содержит AAV, связанный с внешней поверхностью ВВ, и нацеленный фрагмент, связанный с внешней поверхностью ВВ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВВ содержит AAV, связанный с поверхностью просвета ВВ, и нацеленный фрагмент, связанный с внешней поверхностью ВВ.

[0143] Используемый в данном документе термин «клетка-продуцент» относится к клетке, используемой для создания ВВ, например, экзосомы и/или AAV. Клетка-продуцент может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro*, или клетку *in vivo*. Клетка-продуцент включает, но не ограничивается ими, клетку, которая, как известно, эффективно генерирует ВВ, например, экзосомы и/или AAV, например, клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO), мезенхимальные стволовые клетки (MSC), клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN®, клетки амниоцитов CAP®, жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1, клетки насекомых sf9, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки PER.C6, клетки Vero, клетки NS0, клетки HeLa. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент, используемая для создания ВВ, является той же клеткой, которая используется для создания AAV. В некоторых вариантах осуществления ВВ получают с использованием первой клетки-продуцента, а AAV получают с использованием второй клетки-продуцента, при этом первая клетка-продуцент относится к типу клетки, отличному от типа второй клетки-продуцента. В некоторых вариантах осуществления ВВ получают с использованием первой клетки-продуцента, а AAV получают с использованием второй клетки-продуцента, при этом первая клетка-продуцент является такой же клеткой, что и вторая клетка-продуцент.

[0144] Используемые в данном документе термины «выделить», «выделенный» и «выделение» или «очищать», «очищенный» и «очищение», а также «извлеченный» и «извлекать» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию получения

(например, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных ВВ, которые прошли один или более процессов очистки, например, селекцию или обогащение желаемого препарата ВВ. В некоторых вариантах осуществления выделение или очистка, используемые в данном документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) ВВ из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления композиция выделенных ВВ не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других вариантах осуществления композиция выделенных ВВ имеет количество и/или концентрацию желаемых ВВ в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других вариантах осуществления композиция выделенных ВВ 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 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, 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% или по меньшей мере около 99,9999% относительно исходного материала. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты ВВ по существу не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты ВВ являются свободными на около 100%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 91% или свободными на по меньшей мере около 90% от любых загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. «По существу свободный от остаточных биологических продуктов» может также означать, что композиция ВВ не содержит обнаружимых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только ВВ.

[0145] Используемый в данном документе термин «полезная нагрузка» относится к терапевтическому агенту, который действует на мишень (например, клетку-мишень), которая вступает в контакт с ВВ. Неограничивающим примером полезной нагрузки,

которая может быть включена во ВВ, например, экзосому, является AAV. Полезные нагрузки, которые могут быть введены во ВВ или на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы, и/или клетку-продуцент, включают агенты, такие как нуклеотиды (например, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (например, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как микроРНК, дцРНК, днкРНК и киРНК), аминокислоты (например, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают трансляцию), полипептиды (например, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (например, низкомолекулярные лекарственные средства и токсины). В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка содержит AAV.

[0146] Используемый в данном документе термин «аффинный агент» относится к фрагменту, который способен связывать вторую группу. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент представляет собой рецептор, например, рецептор AAV. В некоторых аспектах кассета экспрессии, кодирующая аффинный к AAV агент, транзигентно трансфицируют в клетку-мишень вместе с плазмидами, продуцирующими AAV. В некоторых аспектах продуцируют AAV

[0147] Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, независимо от того, является ли он природным или частично или полностью синтезированным, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, гомологичный связывающему домену иммуноглобулина, например, антигенсвязывающий домен. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывает и распознает антиген. При применении термина «антитело» он включает в себя полные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, верблюжьи антитела, IgNAR акулы, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb, одноцепочечный Fab, и Fd, диатела, миниантитела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой наноантитело.

[0148] Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, в частности к людям, которым требуется проведение диагностики, лечения или терапии. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, а в других вариантах осуществления субъект представляет собой человека. Используемый в данном документе термин «субъект-млекопитающее» включает всех млекопитающих, в том числе 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.).

[0149] Используемый в данном документе термин «по существу свободный» означает, что образец, содержащий ВВ (*например*, экзосомы) содержит менее около 10% макромолекул в процентных концентрациях масса/объем (мас./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.

[0150] Используемый в данном документе термин «макромолекула» означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

[0151] Используемый в данном документе термин «аденоассоциированный вирус» или «AAV» включает, но не ограничивается ими, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, змеиный AAV, птичий AAV, AAV крупного рогатого скота, собачий AAV, лошадиный AAV, овечий AAV, козий AAV, креветочный AAV, серотипы и клады AAV, раскрытые в Gao et al. (*J. Virol.* 78:6381 (2004)) и Moris *et al.* (*Virol.* 33: 375 (2004)), и любой другой AAV, известный в настоящее время или обнаруженный в будущем. См., например, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). AAV относится к *Dependoparvovirus* (роду)

из семейства вирусов *Parvoviridae*. Например, AAV может быть AAV, полученным из встречающегося в природе вируса «дикого типа», AAV, полученным из генома рекомбинантного AAV (rAAV), упакованного в капсид, полученный из капсидных белков, кодируемых природным геном сар, и/или генома rAAV, упакованного в капсид, полученный из капсидных белков, кодируемых неприродным геном капсида сар. Используемый в данном документе термин «AAV» может использоваться для обозначения самого вируса или его производных. Термин охватывает все подтипы, как встречающиеся в природе, так и рекомбинантные формы, если специально не указано иное. AAV включает AAV типа 1 (AAV-1), AAV типа 2 (AAV-2), AAV типа 3 (AAV-3), AAV типа 4 (AAV-4), AAV типа 5 (AAV-5), AAV типа 6 (AAV-6), AAV типа 7 (AAV-7), AAV типа 8 (AAV-8), AAV типа 9 (AAV-9), птичий AAV, AAV крупного рогатого скота, собачий AAV, лошадиный AAV, AAV приматов, AAV отличных от приматов млекопитающих и овечий AAV. «AAV приматов» относится к AAV, которые инфицируют приматов, «AAV отличных от приматов млекопитающих» относится к AAV, которые инфицируют отличных от приматов млекопитающих, «бычий AAV крупного рогатого скота» относится к AAV, которые инфицируют крупный рогатый скот и т. д. См., например, Fields *et al.*, VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (3 d ed., Lippincott-Raven Publishers). В некоторых аспектах AAV представляет собой нереплицирующийся AAV, например, неинфекционный AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV включает вирусный вектор.

[0152] В некоторых аспектах изобретение обеспечивает «выделенные AAV». Используемый в данном документе в отношении AAV термин «выделенный» относится к AAV, который был выделен из его естественной среды (например, из клетки-хозяина, ткани или субъекта) или получен искусственным путем. Выделенные AAV можно получить с использованием рекомбинантных методов. Такие AAV иногда называют в данном документе «рекомбинантными AAV» или «гAAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гены гер и сар заменены гетерологичными последовательностями. Используемый в данном документе термин «вектор гAAV» относится к вектору AAV, содержащему полинуклеотидную последовательность, не происходящую из AAV (т.е. полинуклеотид, гетерологичный AAV), как правило, последовательность, представляющую интерес для генетической трансформации клетки. В общем, гетерологичный полинуклеотид фланкирован по меньшей мере одной, а обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Термин «вектор гAAV» охватывает как векторные частицы гAAV, так и векторные плазмиды. Рекомбинантные AAV предпочтительно обладают способностью к тканеспецифическому нацеливанию, так что трансген гAAV будет доставляться

специфически к одной или более заранее определенным тканям(-и). Капсид AAV является важным элементом в определении этих способностей к тканеспецифическому нацеливанию. Таким образом, может быть выбран гAAV, имеющий капсид, подходящий для ткани-мишени.

[0153] Вектор или молекула нуклеиновой кислоты «без капсида» (или его варианты) относится к конструкции вектора, свободной от капсида. В некоторых вариантах осуществления свободный от капсида вектор или молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательностей, кодирующих, например, белок Rep AAV.

[0154] «Вирус AAV», или «вирусная частица AAV», или «векторная частица гAAV» относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV (как правило, из всех капсидных белков AAV дикого типа) и инкапсидированного полинуклеотидного вектора гAAV. Если вирус или частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, например, трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его можно назвать «векторной частицей гAAV». Таким образом, получение частицы гAAV обязательно включает получение вектора гAAV, поскольку такой вектор содержится в частице гAAV.

[0155] «Хелперный вирус» для AAV относится к вирусу, который позволяет AAV (например, AAV дикого типа) реплицироваться и упаковываться клеткой млекопитающего. В данной области техники известно множество таких хелперных вирусов для AAV, включая аденовирусы, герпесвирусы, бакуловирусы и поксвирусы, например, вирус осповакцины. Аденовирусы включают ряд различных подгрупп, хотя чаще всего используется аденовирус типа 5 подгруппы C. Известно множество аденовирусов человека, млекопитающих и птиц, которые могут быть получены в депозитариях, таких как ATCC. К вирусам семейства герпеса относятся, например, вирусы простого герпеса (HSV) и вирусы Эпштейна-Барра (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV); которые также доступны в депозитариях, таких как ATCC.

[0156] Используемый в данном документе термин «инвертированный концевой повтор» (или «ITR») относится к подпоследовательности нуклеиновой кислоты, расположенной на 5'- или 3'-конце одноцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, которая включает набор нуклеотидов (исходная последовательность), за которым следует его обратная комплементарная последовательность, т. е. палиндромная последовательность. Промежуточная последовательность нуклеотидов между начальной последовательностью и обратной комплементарной последовательностью может иметь любую длину.

[0157] Используемый в данном документе термин «тропизм» относится к способности первого компонента нацеливаться на второй компонент. В некоторых аспектах тропизм относится к способности вектора или вириона AAV трансдуцировать один или более определенных типов клеток, но также может охватывать то, как вектор функционирует для трансдукции клетки в один или более определенных типов клеток; т.е. тропизм относится к предпочтительному проникновению вектора или вириона AAV в определенный тип(-ы) клеток или тканей и/или предпочтительному взаимодействию с поверхностью клетки, которое облегчает проникновение в определенные типы клеток или тканей, необязательно и предпочтительно с последующей экспрессией (например, транскрипцией и, необязательно, трансляцией) последовательностей, переносимых вектором AAV или вирионом в клетке, например, для рекомбинантного вируса, экспрессия гетерологичной нуклеотидной последовательности(-ей). Используемый в данном документе термин «трансдукция» относится к способности вектора или вириона AAV инфицировать один или более конкретных типов клеток; т.е. трансдукция относится к проникновению вектора или вириона AAV в клетку и переносу генетического материала, содержащегося в векторе AAV или вирионе, в клетку для достижения экспрессии из генома вектора. В некоторых случаях, но не во всех, трансдукция и тропизм могут коррелировать.

[0158] В некоторых аспектах способность ВВ увеличивать поглощение конкретной клеткой, тканью или органом может быть изменена путем конструирования нацеленного фрагмента, который будет экспрессироваться на ВВ. Используемый в данном документе термин «нацеленный фрагмент» относится к агенту (т.е. полезной нагрузке), который может изменять распределение внеклеточных везикул (например, экзосом, нановезикул) *in vivo* или *in vitro*. В некоторых аспектах нацеленный фрагмент при экспрессии на ВВ (например, экзосоме) изменяет и/или усиливает естественное движение ВВ. Нацеленный фрагмент может представлять собой биологическую молекулу, такую как белок, пептид, липид или углевод, или синтетическую молекулу. Например, нацеленный фрагмент может представлять собой аффинный лиганд (например, антитело, домен VHH, пептид фагового дисплея, домен фибронектина, верблюжье антитело, VNAR), синтетический полимер (например, ПЭГ), природный лиганд/молекулу (например, CD40L, альбумин, CD47, CD24, CD55, CD59), рекомбинантный белок (например, XTEN), но не ограничиваться ими. Неограничивающие примеры целевых фрагментов, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают те, которые могут связываться с маркером, специфически экспрессируемым на дендритной клетке (например, Clec9A или DEC205) или Т-клетках (например, CD3).

[0159] В некоторых аспектах нацеленный фрагмент экспонируется на поверхности ВВ (например, экзосом). Нацеленный фрагмент может экспонироваться на поверхности ВВ путем слияния с каркасным белком (например, каркасом X) (например, в виде генетически кодируемой слитой молекулы). В некоторых аспектах нацеленный фрагмент может экспонироваться на поверхности ВВ посредством химической реакции присоединения нацеленного фрагмента к молекуле поверхности ВВ. Неограничивающие примеры нацеленных фрагментов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают белок А члена 9 семейства лектиновых доменов С-типа (Clec9a), молекулы межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрина (DC-SIGN), CD207, CD40, Clec6, иммунорецептор дендритных клеток (DCIR), DEC-205, лектин-подобный окисленный рецептор-1 липопротеинов низкой плотности (LOX-1), MARCO, Clec12a, DC-асиалогликопротеиновый рецептор (DC-ASGPR), иммунорецептор DC 2 (DCIR2), дектин-1, макрофагальный маннозный рецептор (MMR), BDCA-1 (CD303, Clec4c), дектин-2, Bst-2 (CD317), CD3 или любую их комбинацию. В определенных аспектах нацеливающим фрагментом является белок Clec9a. В некоторых аспектах нацеливающим фрагментом является молекула CD3.

[0160] В контексте данного документа термин «член А семейства лектиновых доменов С-типа 9» (Clec9a) относится к лектин-подобному рецептору С-типа группы V (CTLR), который функционирует как активирующий рецептор и экспрессируется на клетках миелоидной линии (например, DC). Huysamen *et al.*, *J Biol Chem* 283(24):16693-701 (2008); патент США № 9 988 431 В2, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. Известны синонимы Clec9a и они включают CD370, DNGR-1, 5B5, HEHE9341 и домен лектина С-типа, содержащий 9A. В некоторых аспектах белок Clec9a экспрессируется на клетках cDC1 человека. В некоторых аспектах белок Clec9a экспрессируется на клетках cDC1 и pDC мыши. Если не указано иное, Clec9a в контексте данного документа может относиться к Clec9a одного или нескольких видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0161] Используемый в данном документе термин «введение» означает введение композиции, содержащей ВВ, *например*, экзосомы, описанные в данном документе, субъекту фармацевтически приемлемым путем. Путь введения могут быть внутривенным, *например*, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия. Дополнительные пути введения включают, *например*, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. ВВ, *например*, экзосомы, можно вводить как часть фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

[0162] Используемый в данном документе термин «иммунный ответ» относится к биологическому ответу у позвоночных организмов на чужеродные агенты или аномальные агенты, например, AAV, который защищает организм от этих агентов и заболеваний, вызываемых ими. Иммунный ответ опосредован действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток или нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и систему комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из тела позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, *например*, активацию или ингибирование Т-клеток, *например*, эффекторных Т-клеток, Th-клеток, CD4 + и CD8 + Т-клеток или Treg-клеток, или активацию или ингибирование любых других клеток иммунной системы, *например*, NK-клеток. Соответственно, иммунный ответ может включать гуморальный иммунный ответ (*например*, опосредованный В-клетками), клеточный иммунный ответ (*например*, опосредованный Т-клетками) или как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой «ингибирующий» иммунный ответ. Ингибирующий иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который блокирует или уменьшает действие стимула (например, терапии AAV). В определенных вариантах осуществления ингибирующий иммунный ответ включает образование ингибирующих антител против AAV.

[0163] Используемый в данном документе термин «терапевтический белок» относится к любому полипептиду, известному в данной области техники, который можно вводить субъекту. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок содержит белок, выбранный из фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, антитела, его функционального фрагмента или их комбинации. Используемый в данном документе термин «фактор свертывания крови» относится к молекулам или их аналогам, встречающимся в природе или полученным рекомбинантным путем, которые предотвращают или сокращают продолжительность эпизода кровотечения у субъекта. Другими словами, это означает, что молекулы, обладающие прокоагулянтной активностью, то есть ответственные за преобразование фибриногена в сетку нерастворимого фибрина, вызывая свертывание или образование сгустка крови. Используемый в данном документе

термин «фактор свертывания крови» включает активированный фактор свертывания крови, его зимоген или активируемый фактор свертывания крови. «Активируемый фактор свертывания крови» представляет собой фактор свертывания крови в неактивной форме (например, в форме зимогена), который может превращаться в активную форму. Термин «фактор свертывания крови» включает, помимо прочего, фактор I (FI), фактор II (FII), фактор V (FV), FVII, FVIII, FIX, фактор X (FX), фактор XI (FXI), фактор XII (FXII), фактор XIII (FXIII), фактор фон Виллебранда (VWF), прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок C, белок S, белок Z, ингибитор протеина Z-родственной протеазы (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевый активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), ингибитор активатора плазминогена-2 (PAI2), их зимогены, их активированные формы или любую их комбинацию.

[0164] Активность свертывания крови, как используется в данном документе, означает способность участвовать в каскаде биохимических реакций, кульминацией которых является образование фибринового сгустка и/или снижение тяжести, продолжительности или частоты кровотечений или эпизодов кровотечения.

[0165] Используемый в данном документе термин «фактор роста» включает любой фактор роста, известный в данной области техники, включая цитокины и гормоны. В некоторых вариантах осуществления фактор роста выбран из аденомедуллина (AM), ангиопоэтина (Ang), фактора аутокринной миграции, костного морфогенетического белка (BMP) (например, BMP2, BMP4, BMP5, BMP7), члена семейства цилиарных нейротрофических факторов (например, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), лейкоз-ингибирующего фактора (LIF), интерлейкина-6 (IL-6)), колониестимулирующего фактора (например, колониестимулирующего фактора макрофагов (m-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)), эпидермального фактора роста (EGF), эфрина (например, эфрина A1, эфрина A2, эфрина A3, эфрина A4, эфрина A5, эфрина B1, эфрина B2, эфрина B3), эритропоэтина (EPO), фактора роста фибробластов (FGF) (например, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23), соматотропин плода крупного рогатого скота (FBS), члена семейства GDNF (например, нейротрофического фактора линии глиальных клеток (GDNF), нейротурина, персефина, артемина), фактора дифференцировки роста-9 (GDF9), фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста гепатомы (HDGF), инсулина, инсулиноподобных факторов роста (например, инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) или IGF-2,

интерлейкина (IL) (например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7), фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора, стимулирующего миграцию (MSF), белка, стимулирующего макрофаги (MSP или белка, подобного фактору роста гепатоцитов (HGFLP)), миостатина (GDF-8), нейрегулина (например, нейрегулина 1 (NRG1), NRG2, NRG3, NRG4), нейротрофина (например, нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), фактора роста нервов (NGF), нейротрофина-3 (NT-3), NT-4, плацентарного фактора роста (PGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF), реналазы (RNLS), фактора роста Т-клеток (TCGF), тромбопоэтина (TPO), трансформирующего фактора роста (например, трансформирующего фактор роста альфа (TGF- α), TGF- β , фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

[0166] В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок кодируется геном, выбранным из X-сцепленного дистрофина, MTM1 (миотубуларина), тирозингидроксилазы, AADC, циклогидролазы, SMN1, FXN (фратаксина), GUCY2D, RS1, CFH, HTRA, ARMS, CFB / CC2, CNGA/CNGB, Prf65, ARSA, PSAP, IDUA (MPS I), IDS (MPS II), PAH, GAA (кислая альфа-глюкозидаза), рецептора липопротеинов низкой плотности, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе, GBA, MECP2, SCN1A, UBE3A, DMPK, FMR1, GJB1, CaMK2, HTT, ATX3, PMP22, CAPN3, DYSF, SGCA, SGCB, SGCG, SGCD, TNN, и ANO5, или любой их комбинации. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном аденозиндезаминазы человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном A1AT человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном гемоглобина (β -цепь) человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном p53 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном ABCD1 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном CHM человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном аденилциклазы 6 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном CTFR человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном дистрофина человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном альфа-галактозидазы А человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном пути BDNF человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном цитозиндезаминазы человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном фактора VIII человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном фактора IX человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном LDLR человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном хантингтина человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном липопротеинлипазы человека. В

некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном ND4 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном ARSA человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном IDUA человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном IDS человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном SGSH человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном AADC человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном кислой альфа-глюкозидазы человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном человеческого коллагена C7. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном RPE65 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном SMN1 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном VEGF человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном WAS человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном MTM1 человека. В некоторых аспектах терапевтический белок кодируется геном RPGR человека.

[0167] Используемые в данном документе термины «гетерологичный» или «экзогенный» относятся к таким молекулам, которые, как правило, не встречаются в данном окружении, например, в клетке или в полипептиде. Например, экзогенная или гетерологичная молекула может быть введена в клетку и присутствует только после манипуляции с клеткой, например, путем трансфекции или других форм генной инженерии, или гетерологичная аминокислотная последовательность может присутствовать в белке, в котором она не встречается в природе.

[0168] Используемый в данном документе термин «гетерологичная нуклеотидная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая не встречается в природе с данной полинуклеотидной последовательностью. В одном варианте осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, способный увеличивать период полужизни терапевтического белка, например, фактора свертывания крови, например, FVIII. В другом варианте осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, который увеличивает гидродинамический радиус терапевтического белка, например, фактора свертывания крови, например, FVIII. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, который улучшает одно или более фармакокинетических свойств терапевтического белка без значительного влияния на его биологическую активность или функцию (например, прокоагулянтную активность). В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок связан или связан с полипептидом, кодируемым гетерологичной нуклеотидной последовательностью

линкером. Неограничивающие примеры полипептидных фрагментов, кодируемых гетерологичными нуклеотидными последовательностями, включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбумин-связывающий фрагмент, трансферрин, полипептиды PAS по заявке на патент США № 20100292130, НАР последовательность, трансферрин или его фрагмент, С-концевой пептид (СТР) β -субъединицу хорионического гонадотропина человека, альбумин-связывающая небольшая молекула, последовательность XTEN, FcRn-связывающие части (например, полные области Fc или их части, которые связываются с FcRn), одноцепочечные области Fc (области ScFc, например, как описано в US 2008/0260738, WO 2008/012543 или WO 2008/1439545), полиглициновые линкеры, полисериновые линкеры, пептиды и короткие полипептиды из 6-40 аминокислот из двух типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), с вторичной структурой в различной степени от менее 50% до более чем 50%, среди прочего, или две или более их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый гетерологичной нуклеотидной последовательностью, связан с неполипептидным фрагментом. Неограничивающие примеры неполипептидных фрагментов включают полиэтиленгликоль (PEG), небольшие молекулы, связывающие альбумин, полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производные или любые их комбинации.

[0169] Используемый в данном документе термин «область Fc» определяется как часть полипептида, которая соответствует области Fc нативного Ig, то есть образованная димерной ассоциацией соответствующих доменов Fc двух его тяжелых цепей. Нативная область Fc образует гомодимер с другой областью Fc. Напротив, термин «генетически слитая область Fc» или «одноцепочечная область Fc» (область scFc), используемый в данном документе, относится к синтетической димерной области Fc, состоящей из доменов Fc, генетически связанных в одной полипептидной цепи (т.е. закодированных в единственной непрерывной генетической последовательности).

[0170] В одном варианте осуществления «область Fc» относится к части одной тяжелой цепи Ig, начинающейся в шарнирной области непосредственно выше сайта расщепления папаина (т.е. остаток 216 в IgG, принимая за первый остаток константной области тяжелой цепи 114) и оканчивается на С-конце антитела. Соответственно, полный домен Fc содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3.

[0171] Область Fc константной области Ig, в зависимости от изотипа Ig, может включать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие область Fc Ig, наделяют химерный белок несколькими желательными свойствами, включая повышенную стабильность, увеличенный период полужизни в

сыворотке (см. Capon et al., 1989, Nature 337: 525), а также связывание с Fc-рецепторами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn) (патент США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0172] «Лечить», «лечение» или «лечащий» в контексте данного документа относится, например, к снижению степени тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности течения болезни; улучшению или устранению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; обеспечению благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или патологического состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или состояния или его симптомов.

[0173] Термины «предотвращать» или «предотвращение» в контексте данного описания относятся к уменьшению или снижению частоты возникновения или серьезности конкретного исхода. В некоторых вариантах осуществления предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения.

II. Композиции по изобретению

[0174] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, например, экзосомам, содержащим AAV и каркасный белок, при этом AAV находится в просвете экзосомы. В некоторых вариантах осуществления ВВ содержит число AAV в просвете, которое превышает число AAV в просвете эталонной ВВ, в которой отсутствует каркасный белок. В некоторых аспектах ВВ с большей вероятностью будет поглощать AAV, чем ВВ, в котором отсутствует каркасный белок, например, в смешанной популяции ВВ, которые либо содержат, либо не содержат каркасный белок, более высокий процент ВВ включает каркасный белок и AAV в просвете, чем ВВ, которые содержат только AAV в просвете.

II.A. Внеклеточные везикулы (ВВ)

[0175] ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе, представляют собой внеклеточные везикулы с диаметром около 20-300 нм. В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, по настоящему изобретению имеет диаметр от около 20 нм до около 290 нм, от около 20 нм до около 280 нм, от около 20 нм до около 270 нм, от около 20 нм до около 260 нм, 20 нм до около 250 нм, от около 20 нм до около 240 нм, от около 20 нм до около 230 нм, от около 20 нм до около 220 нм, от около 20 нм до около 210 нм, от около 20 нм до около 200 нм, от около 20 нм до около 190 нм, от около 20 нм до около 180 нм, от около 20 нм до около 170 нм, от около 20 нм до около 160 нм, от около 20 нм до около 150 нм, от около 20 нм до около 140 нм, от около 20 нм до около 130 нм, от

[illegible]

[illegible]

[0176] ВВ, например экзосомы, по настоящему изобретению содержат мембрану («мембрана ВВ»), содержащую внешнюю поверхность (например, внеклеточную поверхность) и внутреннюю поверхность (например, поверхность просвета). В некоторых вариантах осуществления внутренняя поверхность обращена к внутреннему ядру (т.е. просвету) ВВ, например, экзосомы. В определенных вариантах осуществления внешняя поверхность может быть приведена в контакт с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента.

[0177] В некоторых вариантах осуществления мембрана ВВ, например, экзосомы содержит билипидную мембрану, например, липидный бислой. В некоторых вариантах осуществления мембрана ВВ, например, экзосомы, содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления мембрана ВВ, например, экзосомы содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерин, холестерин и фосфатидилсерин.

[0178] В некоторых вариантах осуществления мембрана ВВ, например, экзосомы, содержит внутреннюю и внешнюю мембраны. Состав внутренней и внешней мембран может быть определен с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники., см., например, Kuypers *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1985 819:170. В некоторых вариантах осуществления состав внешней мембраны составляет около 70-90% холинфосфолипидов, около 0-15% кислых фосфолипидов и около 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых вариантах осуществления состав внутренней мембраны составляет около 15-40% холинфосфолипидов, около 10-50% кислых фосфолипидов и около 30-60% фосфатидилэтаноламина.

[0179] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, мембрана содержит один или более полисахаридов, таких как гликан.

[0180] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосома, содержит одно или более мультиламеллярных тел внутри просвета ВВ, например, экзосомы. В некоторых вариантах осуществления ААВ по настоящему изобретению находится внутри мультиламеллярного тела. В некоторых вариантах осуществления ААВ по настоящему изобретению не находится внутри мультиламеллярного тела.

[0181] В некоторых аспектах ВВ включает поверхностный антиген, который ингибирует поглощение ВВ макрофагом. В некоторых аспектах поверхностный антиген связан с внешней поверхностью ВВ (например, экзосомы). В некоторых аспектах поверхностный антиген выбран из CD47, CD24, их фрагментов и любой их комбинации. В некоторых аспектах поверхностный антиген включает CD47, например, человеческий CD47 (UniProtKB - Q08722). В некоторых аспектах поверхностный антиген включает

фрагмент CD47, например, CD47 человека. В некоторых аспектах поверхностный антиген включает CD24, например, CD24 человека. В некоторых аспектах поверхностный антиген включает фрагмент CD24, например, CD24 человека.

II.A.1. Нацеленные фрагменты

[0182] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, дополнительно модифицируется для экспонирования дополнительного белка (или его фрагмента), который может помочь направлять поглощение ВВ (например, нацеленный фрагмент). В определенных аспектах ВВ, *например*, экзосома, раскрытая в настоящем документе, дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, который может модифицировать распределение ВВ *in vivo* или *in vitro*. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент может являться биологической молекулой, такой как белок, пептид, липид или синтетическая молекула.

[0183] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент по настоящему раскрытию специфически связывается с маркером дендритной клетки. В некоторых аспектах маркер экспрессируется только на дендритной клетке. В некоторых аспектах дендритные клетки включают дендритные клетки-предшественники (Pre), воспалительные дендритные моноциты, плазматцитоидные дендритные клетки (pDC), миелоидные/конвенциональные дендритные клетки 1 (cDC1), миелоидные/конвенциональные дендритные клетки 2 (cDC2), воспалительные дендритные клетки, полученные из моноцитов, клетки Лангерганса, дермальные дендритные клетки, лизоцим-экспрессирующие дендритные клетки (LysoDCs), клетки Купфера, неклассические моноциты или любую их комбинацию. Маркеры, которые экспрессируются на этих дендритных клетках, известны в данной области техники. См., *например*, Collin *et al.*, *Immunology* 154(1):3-20 (2018). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой белок, причем белок представляет собой антитело или его фрагмент, который может специфически связываться с маркером, выбранным из DEC205, CLEC9A, CLEC6, DCIR, DC-SIGN, LOX-1, MARCO, Clec12a, Clec10a, DC-азиалогликопротеинового рецептора (DC-ASGPR), DC-иммунорецептора 2 (DCIR2), Dectin-1, макрофагального маннозного рецептора (MMR), BDCA-2 (CD303, Clec4c), дектина-2, Bst-2 (CD317), лангерина, CD206, CD11b, CD11c, CD123, CD304, XCR1, AXL, Siglec 6, CD209, SIRPA, CX3CR1, GPR182, CD14, CD16, CD32, CD34, CD38, CD10 или любой их комбинация. В некоторых аспектах маркер, применимый для настоящего раскрытия, содержит лектин-подобный домен С-типа. В определенных аспектах маркером является Clec9a, а дендритной клеткой является cDC1.

[0184] В некоторых аспектах раскрытый в данном документе нацеливающий фрагмент может связываться с Clec9a как человека, так и мыши, включая любые их варианты. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент по настоящему раскрытию может связываться с Clec9a других видов, включая, но не ограничиваясь ими, шимпанзе, макак-резус, собаку, корову, лошадь или крысу. Последовательности такого белка Clec9a известны в данной области техники. *См., например*, патенты США № 8 426 565 В2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0185] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент по настоящему раскрытию специфически связывается с маркером Т-клетки. В определенных аспектах Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку.

[0186] В некоторых аспектах нацеленный фрагмент по настоящему изобретению специфически связывается с маркером мышечной клетки. В некоторых аспектах мышечная клетка представляет собой гладкомышечную клетку. В некоторых аспектах мышечная клетка представляет собой клетку скелетных мышц. В некоторых аспектах мышечная клетка представляет собой клетку сердечной мышцы. В некоторых аспектах маркер на мышечной клетке выбран из альфа-актина гладких мышц, VE-кадгерина, кальдесмона/CALD1, кальпонины 1, гексима 1, гистамина H2 R; мотилина R / GPR38, трансгелина /TAGLN и любой их комбинации. В некоторых аспектах маркер на мышечной клетке выбран из альфа-саркогликана, бета-саркогликана, ингибиторов кальпаина, креатинкиназы MM / CKMM, eIF5A, энолазы 2 / нейрон-специфической энолазы, эпсилон-саркогликана, FABP3/H-FABP, GDF-8/миостатина, GDF-11 / GDF-8, интегрина альфа-7, интегрина альфа-7/бета-1, интегрина бета-1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, миогенина, ингибиторов киназы легких цепей миозина, NCAM-1/CD56, тропонина I и любой их комбинации. В некоторых аспектах маркер мышечной клетки представляет собой тяжелую цепь миозина, легкую цепь миозина или их комбинацию.

[0187] В некоторых аспектах нацеленный фрагмент по настоящему изобретению специфически связывается с маркером, специфичным для ткани-мишени, такой как печень, мозг, мочевой пузырь, почки, легкие или глаз. В некоторых аспектах нацеленный фрагмент по настоящему изобретения специфически связывается с маркером, экспрессируемым на опухолевой клетке. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на опухолевую клетку, дендритную клетку, Т-клетку, В-клетку, макрофаг, моноцит, шванновскую клетку, нейрон, гепатоцит, клетку Купфера, клетку миелоидной линии (например, нейтрофил, клетка-супрессор миелоидного происхождения (MDSC, например, моноцитарный MDSC или гранулоцитарный MDSC), миоцит, моноцит, макрофаг, гемопоэтические стволовые

клетки, базофил, нейтрофил или эозинофил) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на клетку миелоидной линии. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на макрофаг. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на печень, сердце, легкие, мозг, почки, центральную нервную систему, периферическую нервную систему, мышцы, кости, сустав, кожу, кишечник, мочевой пузырь, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию.

[0188] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, раскрытый в данном документе, связывается с белком CD3 человека или его фрагментом. Последовательности белка CD3 человека известны в данной области техники.

[0189] В некоторых аспектах раскрытый в данном документе нацеливающий фрагмент может связываться с CD3 как человека, так и мыши, включая любые их варианты. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент по настоящему раскрытию может связываться с CD3 других видов, включая, но не ограничиваясь ими, шимпанзе, макака-резус, собаку, корову, лошадь или крысу. Последовательности такого белка CD3 также известны в данной области техники.

[0190] В некоторых аспектах раскрытый в данном документе нацеливающий фрагмент может способствовать большему поглощению ВВ (*например*, экзосомы) клеткой, экспрессирующей маркер, специфичный для нацеливающего фрагмента (*например*, CD3: CD4⁺ Т-клетка и/или CD8⁺ Т-клетка; Сlec9a: дендритные клетки; или маркер мышечных клеток). В некоторых аспектах поглощение ВВ увеличивается по меньшей мере приблизительно в 1 раз, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 30 раз, по меньшей мере приблизительно в 40 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 600 раз, по меньшей мере приблизительно в 700 раз, по меньшей мере приблизительно в 800 раз, по меньшей мере приблизительно в 900 раз, по меньшей мере приблизительно в 1000 раз, по меньшей мере

приблизительно в 2000 раз, по меньшей мере приблизительно в 3000 раз, по меньшей мере приблизительно в 4000 раз, по меньшей мере приблизительно в 5000 раз, по меньшей мере приблизительно в 6000 раз, по меньшей мере приблизительно в 7000 раз, по меньшей мере приблизительно в 8000 раз, по меньшей мере приблизительно в 9000 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 000 раз или более по сравнению с эталоном (*например*, с соответствующей ВВ без нацеливающего фрагмента или со средством доставки, не являющимся ВВ). В некоторых аспектах эталон включает ВВ (*например*, экзосому), которая не экспрессирует нацеливающий фрагмент, раскрытый в данном документе.

[0191] Описанный в данном документе нацеленный фрагмент может включать пептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химическое соединение или любую их комбинацию.

[0192] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой пептид, который может специфически связываться с Clec9a. См, *например*, Yan *et al.*, *Oncotarget* 7(26): 40437-40450 (2016). Например, в определенных аспектах пептид включает растворимый фрагмент Clec9a. Неограничивающий пример такого пептида описан в патенте США № 9 988 431 В2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В определенных аспектах пептид включает лиганд (природный или синтетический) Clec9a, такой как те, которые описаны в публикации Ahrens *et al.*, *Immunity* 36(4): 635-45 (2012); и Zhang *et al.*, *Immunity* 36(4): 646-57 (2012). Неограничивающий пример пептида, содержащего лиганд Clec9a, описан в международной публикации № WO 2013/053008 А2, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0193] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой пептид, который может специфически связываться с CD3. Например, в определенных аспектах пептид включает растворимый фрагмент CD3. В определенных аспектах пептид содержит лиганд (природный или синтетический) CD3.

[0194] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv антитела. В определенных аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент F(ab) антитела. В определенных аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой нанотело. В определенных аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой моноклонал.

[0195] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), раскрытая в данном документе, содержит один или более (*например*, 2, 3, 4, 5 или более) нацеливающих фрагментов. В определенных аспектах один или более нацеливающих фрагментов экспрессируются в комбинации с другими экзогенными биологически активными

молекулами, раскрытыми в данном документе (*например*, терапевтической молекулой, адъювантом или иммуномодулятором). В некоторых аспектах одна или более нацеливающих фрагментов могут экспрессироваться на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Соответственно, в определенных аспектах один или более нацеливающих фрагментов связаны с каркасным фрагментом (*например*, каркасным белком X) на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Когда один или более нацеливающих фрагментов экспрессируются в комбинации с другими экзогенными биологически активными молекулами (*например*, терапевтической молекулой, адъювантом или иммуномодулятором), другие экзогенные биологически активные молекулы могут экспрессироваться на поверхности (*например*, на внешней поверхности или на поверхности просвета) или в просвете ВВ, *например*, экзосомы.

II.B. Аденоассоциированный вирус (AAV)

[0196] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, например, экзосоме, содержащей AAV, при этом AAV присутствует в просвете ВВ.

[0197] AAV представляет собой одноцепочечный ДНК-вирус без оболочки семейства *Parvoviridae*. В отличие от большинства других членов семейства *Parvoviridae*, AAV является дефектным по репликации и способен эффективно реплицироваться только в присутствии хелперного вируса, такого как аденовирус или вирус герпеса.

[0198] Впервые об AAV было сообщено в середине 1960-х годов как о контаминанте вирусных препаратов аденовируса. См. Atchison *et al. Science* 149(3685), 754-756 (1965). С тех пор были разработаны все более безопасные и эффективные методы использования AAV в качестве рекомбинантного ДНК-вектора. См., например, Hermonat and Muzyczka *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(20), 6466-6470 (1984); Laughlin *et al. Gene*, 23(1), 65-73 (1983). Matsushita T., *et al. Gene Ther.* 5(7), 938-945 (1998); Xiao *et al. Journal of Virology*. 72(3) 2224-2232 (1998). Сообщалось, что небольшое количество геномов AAV может интегрироваться в хромосому хозяина (Cheung *et al. J. Virol.* 1980; 33: 739-748). AAV иммунологически отличается от любого известного антигена аденовируса. Капсид AAV содержит геном в виде одноцепочечной ДНК (оцДНК) (Rose *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1969;64:863-869.

[0199] AAV имеет геном в виде одноцепочечный ДНК размером 4,7 т.п.н., кодирующий гены репликации (*rep*), и гены капсида (*cap*), фланкированные двумя ITR. Он преимущественно не интегрируется и образует устойчивые эписомы в неделяющейся ткани. Несмотря на высокую серологическую распространенность среди взрослого населения, он не был связан с какими-либо заболеваниями человека. См. Gonçalves, M. *Virol. J.* 2, 43 (2005). Стабильная экспрессия AAV в тканях, отсутствие патогенности и простота

получения высоких титров сделали его очень привлекательной и популярной платформой для переноса генов.

[0200] Рекомбинантный AAV представляет собой генетически модифицированный AAV, в котором часть или все гены *her* и *cap* заменены гетерологичными последовательностями. Так же, как AAV дикого типа, rAAV может запускать долгосрочную экспрессию трансгена в постмитотических тканях, скорее всего, потому, что рекомбинантный геном rAAV сохраняется в виде в значительной степени кольцевых эписом в ядре. Единственным цис-элементом rAAV, необходимым для продукции rAAV, является ITR AAV, тогда как гены хелперного аденовируса *rep*, *cap* и аденовируса могут быть представлены в *транс*-положении. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, rAAV содержат только трансгенную ДНК, фланкированную ITR, и этот геном инкапсидирован в серотип-специфический капсид.

[0201] AAV обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки. Вызванная AAV инфекция клеток в культуре, как правило, не является цитопатической, а естественное инфицирование людей и других животных протекает скрыто и бессимптомно. Более того, AAV инфицирует множество различных типов клеток млекопитающих, что дает возможность воздействовать на многие различные ткани *in vivo*. AAV также обладают дополнительными преимуществами, которые делают его особенно привлекательной вирусной системой для доставки генов, включая стимулирование более мягкого иммунного ответа по сравнению с другими формами доставки генов и устойчивую экспрессию как в делящихся, так и в покоящихся клетках в качестве неинтегрирующегося вектора. Кроме того, AAV выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56 до 65 °C в течение нескольких часов), что делает холодную консервацию вакцин на основе rAAV менее критичной.

[0202] Хелперный вирус не требуется для трансдукции AAV и проникновения генома AAV в клетку-мишень. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, инкапсидацией и интеграцией AAV, содержатся в ITR генома AAV, внутренняя часть генома размером примерно 4,7 т.п.н. (кодирующая белки репликации и структурного капсида, *her-cap*) может быть заменена чужеродной ДНК, например, генной кассетой, содержащей промотор, представляющей интерес ДНК и сигналом полиаденилирования, без потери какой-либо функциональности, критичной для применения AAV в качестве генно-терапевтического агента.

[0203] Векторы AAV могут включать дополнительные элементы, которые функционируют в *цис*- или *транс*-положении. В конкретных вариантах осуществления

вектор AAV, который включает векторный геном, также имеет одну или более последовательностей ITR, которые фланкируют 5'- или 3'-конец донорной последовательности; элемент контроля экспрессии, который управляет транскрипцией (например, промотор или энхансер) донорной последовательности, например конститутивный или регулируемый элемент контроля или тканеспецифический элемент контроля экспрессии; последовательность интрона, спейсерную или филлерную полинуклеотидную последовательность полинуклеотида; и/или полиадениновую последовательность, расположенную на 3' донорной последовательности.

[0204] В некоторых вариантах осуществления AAV реплицируется с использованием хелперного вируса. В данной области техники известно множество таких хелперных вирусов для AAV, включая аденовирусы, герпесвирусы, бакуловирусы и поксвирусы, например, вирус осповакцины. Отдельные типы аденовирусов включают ряд различных подгрупп, хотя чаще всего используется аденовирус типа 5 из подгруппы C. Известно множество аденовирусов человека, млекопитающих и птиц, которые могут быть получены в депозитариях, таких как ATCC. К вирусам семейства герпеса относятся, например, вирусы простого герпеса (HSV) и вирусы Эпштейна-Барра (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV); которые также доступны в депозитариях, таких как ATCC.

[0205] Во время продукции ВВ молекулы, присутствующие в цитозоле продуцирующей клетки поблизости от формирующейся ВВ, естественным образом захватываются формирующейся ВВ. В результате клетка, продуцирующая как ВВ, так и AAV, естественным образом дает некоторые ВВ с по меньшей мере одним AAV в просвете ВВ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, которые имеют больше AAV в просвете ВВ, чем обычно, например, они пассивно захватываются формирующейся ВВ. В некоторых вариантах осуществления количество AAV в просвете ВВ больше, чем количество AAV в просвете эталонной ВВ. В некоторых вариантах осуществления эталонная ВВ содержит AAV, которая была связана с AAV посредством этого естественного процесса. Точное количество AAV, которое естественным образом захватывается в просвете формирующейся ВВ, например, эталонной ВВ, не содержащей каркасного белка, будет варьироваться. В некоторых вариантах осуществления количество AAV, присутствующих в эталонном ВВ с помощью этого механизма, составляет около 1 AAV на ВВ, около 2 AAV на ВВ, около 3 AAV на ВВ или около 4 AAV на ВВ. В некоторых вариантах осуществления количество AAV, присутствующих в эталонном ВВ, составляет менее около 7, менее около 6, менее около 5, менее около 4, менее около 3 или менее около 2 AAV на ВВ.

[0206] В некоторых вариантах осуществления количество AAV в просвете BB по настоящему изобретения в по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз или в по меньшей мере около 10 раз больше, чем количество AAV в просвете эталонного BB. В некоторых вариантах осуществления количество AAV во BB в около 2–10 раз, около 3–10 раз, около 4–10 раз, около 5–10 раз, около 2–9 раз, около 2–8 раз, около 2–7 раз, около 2–6 раз, около 2–5 раз, около 2–4 раза, около 2–3 раза, около 3–9 раз, около 3–8 раз, около 3–7 раз, около 3–6 раз, около 3–5 раз, около 3–4 раза, около 4–9 раз, около 4–8 раз, около 4–7 раз, около 4–6 раз, около 4–5 раз, около 5–9 раз, около 5–8 раз, около 5–7 раз, или в около 5–6 раза больше, чем количество AAV в просвете эталонной BB. В некоторых вариантах осуществления количество AAV во BB по настоящему изобретению в по меньшей мере около 2 раза выше, чем количество AAV в просвете эталонного BB. В некоторых вариантах осуществления количество AAV во BB по настоящему изобретению в по меньшей мере около 3 раза выше, чем количество AAV в просвете эталонного BB. В некоторых вариантах осуществления количество AAV во BB по настоящему изобретению в по меньшей мере около 4 раза выше, чем количество AAV в просвете эталонного BB. В некоторых вариантах осуществления BB и эталонная BB имеют примерно одинаковый размер.

[0207] В некоторых аспектах по меньшей мере от около 0,01% до около 100% BB, например экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы. В некоторых аспектах от по меньшей мере 0,1% до около 100%, от по меньшей мере около 1% до около 100%, от по меньшей мере около 5% до около 100%, от по меньшей мере около 10% до около 100%, от по меньшей мере около 15% до около 100%, от по меньшей мере около 20% до около 100% от по меньшей мере около 25% до около 100%, от по меньшей мере около 30% до около 100%, от по меньшей мере около 40% до около 100%, от по меньшей мере около 50% до около 100%, от по меньшей мере около 60% до около 100%, от по меньшей мере около 70% до около 100%, от по меньшей мере около 80% до около 100%, от по меньшей мере около 90% до около 100% BB, например, экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы. В некоторых аспектах по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 5%, 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 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% BB, например, экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы.

[0208] В некоторых аспектах процент ВВ, например, экзосом, содержащих каркасный фрагмент и по меньшей мере одну молекулу AAV, в просвете ВВ, например, экзосомы, в образце, содержащем более одной ВВ, увеличивается по сравнению с процентом ВВ, например, экзосом, содержащим AAV, но лишенных каркасного фрагмента. В некоторых аспектах от по меньшей мере около 0,01% до около 100% ВВ, например, экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы и каркасный фрагмент. В некоторых аспектах от по меньшей мере 0,1% до около 100%, от по меньшей мере около 1% до около 100%, от по меньшей мере около 5% до около 100%, от по меньшей мере около 10% до около 100%, от по меньшей мере около 15% до около 100%, от по меньшей мере около 20% до около 100% от по меньшей мере около 25% до около 100%, от по меньшей мере около 30% до около 100%, от по меньшей мере около 40% до около 100%, от по меньшей мере около 50% до около 100%, от по меньшей мере около 60% до около 100%, от по меньшей мере около 70% до около 100%, от по меньшей мере около 80% до около 100%, от по меньшей мере около 90% до около 100% ВВ, например, экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы и каркасный фрагмент. В некоторых аспектах по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 5%, 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 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% ВВ, например, экзосом, содержат AAV в просвете экзосомы и каркасный фрагмент.

[0209] В некоторых вариантах осуществления ВВ содержит по меньшей мере около 2 AAV, по меньшей мере около 3 AAV, по меньшей мере около 4 AAV, по меньшей мере около 5 AAV, по меньшей мере около 6 AAV, по меньшей мере около 7 AAV, по меньшей мере около 8 AAV, по меньшей мере около 9 AAV, по меньшей мере около 10 AAV, по меньшей мере около 11 AAV, по меньшей мере около 12 AAV, по меньшей мере около 13 AAV, по меньшей мере около 14 AAV, по меньшей мере около 15 AAV, по меньшей мере около 16 AAV, по меньшей мере около 17 AAV, по меньшей мере около 18 AAV, по меньшей мере около 19 AAV, по меньшей мере около 20 AAV, по меньшей мере около 21 AAV, по меньшей мере около 22 AAV, по меньшей мере около 23 AAV, по меньшей мере около 24 AAV, по меньшей мере около 25 AAV, по меньшей мере около 26 AAV, по меньшей мере около 27 AAV, по меньшей мере около 28 AAV, по меньшей мере около 29 AAV, по меньшей мере около 30 AAV, по меньшей мере около 35 AAV, по меньшей мере около 40 AAV, по меньшей мере около 45 AAV, по меньшей мере около 50 AAV, по меньшей мере около 60 AAV, по меньшей мере около 70 AAV, по меньшей мере около 80 AAV, по меньшей мере около 90 AAV, по меньшей мере около 100 AAV, по меньшей мере

[illegible]

содержит по меньшей мере около 14 AAV в просвете BB. В некоторых вариантах осуществления BB содержит по меньшей мере около 15 AAV в просвете BB.

[0212] В некоторых вариантах осуществления BB по настоящему изобретению содержат AAV во BB более однородным образом (например, количество AAV во BB) по сравнению с эталонными BB, полученными без каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления BB по настоящему изобретению содержат от около 5 до около 10, от около 6 до около 10, от около 7 до около 10, от около 8 до около 10 AAV во BB, в то время как в эталонных BB количество AAV может варьироваться по от 0 до 5. В других вариантах осуществления BB по настоящему изобретению могут контролировать количество AAV во BB с помощью каркасного белка, описанного в данном документе. Например, применение каркасного белка позволяет AAV прикрепляться к поверхности просвета BB, когда BB формируются клетками, и отделяться от BB в месте повреждения или в мишене. В других вариантах осуществления применение каркасного белка (например, партнеров химически индуцированного димера) позволяет AAV прикрепляться к поверхности просвета BB, когда BB формируются клетками, и отделяться от BB после того, как химическое вещество удаляется с BB. Следовательно, BB в соответствии с настоящим изобретением позволяют эффективно и равномерно загружать AAV в BB.

[0213] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к BB, например, экзосоме, содержащей AAV и каркасный белок, где AAV связан с внешней поверхностью BB. В некоторых вариантах осуществления BB по настоящему изобретения содержат AAV, связанные с поверхностью AAV более однородным образом, чем другие способы связывания AAV с BB, например, в качестве полезной нагрузки просвета. В некоторых вариантах осуществления с поверхностью BB может быть связано больше AAV, чем может быть загружено в просвет AAV, увеличивая количество AAV, которое может быть доставлено субъекту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 100 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 200 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 300 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 400 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 500 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 600 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 700 AAV связаны с внешней поверхностью BB, например, экзосомой. В некоторых вариантах

[illegible]

[illegible]

[0214] Любой AAV, известный в данной области техники, можно использовать в композициях по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, Rh10, Rh74, AAV-2i8, змеиногo AAV, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, синтетического AAV и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 2, например, AAV2. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 3A, например, AAV3A. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 3B, например, AAV3B. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 4, например, AAV4. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 5, например, AAV5. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 6, например, AAV6. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 7, например, AAV7. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 8, например, AAV8. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 9, например, AAV9. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV типа 10, например, AAV10. В определенных вариантах осуществления AAV представляет собой синтетический AAV.

[0215] В некоторых аспектах AAV обладает различными способностями нацеливания на ткани (например, тканевые тропизмы). В некоторых вариантах осуществления AAV дополнительно демонстрирует повышенную трансдукцию или тропизм в одном или более типах стволовых клеток человека по сравнению с невариантными исходными капсидными полипептидами. В некоторых вариантах осуществления типы стволовых клеток человека включают, но не ограничиваются ими, эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки взрослой ткани (т.е. соматические стволовые клетки), костный мозг, клетки-предшественники, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и перепрограммируемые стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления взрослые стволовые клетки могут включать органоидные стволовые клетки (т.е. стволовые клетки, полученные из любого представляющего интерес органа или системы органов в организме). В некоторых вариантах осуществления целевая ткань AAV представляет собой гонаду, диафрагму, сердце, желудок, печень, селезенку, поджелудочную железу или почки. В некоторых вариантах осуществления AAV нацелены на органы тела, включая, помимо прочего, кожу, волосы, ногти, чувствительные рецепторы, потовую железу, слюнные железы, кости, мышцы, головной мозг, спинной мозг, нерв, гипофиз, шишковидную

железу, гипоталамус, щитовидную железу, паращитовидную железу, тимус, надпочечники, поджелудочную железу (островок Лангерганса), сердце, кровеносные сосуды, лимфатические узлы, лимфатические сосуды, тимус, селезенку, миндалины, нос, глотку, гортань, трахею, бронхи, легкие, рот, глотку, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, прямую кишку, анальный канал, зубы, слюнные железы, язык, печень, желчный пузырь, поджелудочную железу, аппендикс, почки, мочеточники, мочевого пузырь, уретру, яички, семявыносящий (семявыводящий) проток, уретру, предстательную железу, половой член, мошонку, яичники, матку, маточные (фаллопиевы) трубы, влагалище, вульву и молочные железы (груды). Системы органов тела включают, но не ограничиваются ими, покровную систему, костную систему, мышечную систему, нервную систему, эндокринную систему, сердечно-сосудистую систему, лимфатическую систему, дыхательную систему, пищеварительную систему, мочевыделительную систему и репродуктивную систему. В некоторых вариантах осуществления трансдукция и/или тропизм увеличиваются на по меньшей мере около 5%, 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 99%, или по меньшей мере около 100%. В некоторых вариантах осуществления трансдукция и/или тропизм увеличиваются от по меньшей мере около 5% до по меньшей мере около 80%, от по меньшей мере около 10% до по меньшей мере около 70%, от по меньшей мере около 20% до по меньшей мере около 60%, или от по меньшей мере около 30% до по меньшей мере около 60%.

[0216] В некоторых аспектах AAV по настоящему изобретению имеет одно или более измененных свойств по сравнению с AAV, не связанным с ВВ, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления измененное свойство включает лучший терапевтический эффект, чем AAV в отдельности. В некоторых вариантах осуществления лучший терапевтический эффект включает улучшенное уклонение от иммунитета, улучшенное свойство к введению повторной дозы, улучшенное свойство в подборе дозы или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления AAV по настоящему изобретению с меньшей вероятностью вызывают иммунный ответ у субъекта. В частности, это позволяет вводить AAV по настоящему изобретению субъекту с уже существующими нейтрализующими антителами. В некоторых вариантах осуществления AAV по

настоящему изобретению обеспечивает более быстрое поглощение и/или улучшенную кинетику трансдукции по сравнению с AAV, не связанным с BB, как описано в данном документе.

II.B.1.

Слитые конструкции AAV

[0217] В некоторых вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с белком AAV. В некоторых аспектах BB, например, экзосома, содержит AAV и каркасный белок, при этом AAV связан с поверхностью просвета экзосомы.

[0218] В некоторых аспектах BB, например, экзосома, содержит AAV и каркасный белок, при этом AAV связан с внешней поверхностью экзосомы. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит внешний домен, например, домен, расположенный на внешней стороне мембраны BB, где AAV связан с внешним доменом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок дополнительно содержит трансмембранную область, где трансмембранная область прикреплена к мембране BB.

[0219] AAV может быть прямо или косвенно связан с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком одной или более ковалентными связями. В других вариантах осуществления AAV связан с каркасным белком посредством одного или более нековалентных взаимодействий.

[0220] В некоторых вариантах осуществления связь между каркасным белком и AAV происходит между каркасным белком и белком AAV.

[0221] Одноцепочечный геном AAV включает три гена: *rep* (репликация), *cap* (капсид) и *aap* (сборка). Эти три гена дают начало по меньшей мере девяти генным продуктам за счет применения трех промоторов, альтернативных стартовых сайтов трансляции и дифференциального сплайсинга, включая три капсидных белка.

[0222] Экспрессия гена *cap* приводит к образованию белков вирусного капсида (VP1, VP2 и VP3), которые образуют внешнюю оболочку капсида, которая защищает вирусный геном, а также активно участвует в связывании и интернализации клетками. Подсчитано, что вирусная оболочка состоит из 60 белков, образующих икосаэдрическую структуру. В некоторых вариантах осуществления капсиды AAV состоят из 60 копий 3 белков VP1, VP2 и VP3 в соотношении 1:1:10, например, 5 белков VP1, 5 белков VP2 и 50 белков VP3.

[0223] Ген *rep* кодирует четыре белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые необходимы для репликации и упаковки вирусного генома. Ген *aap* кодирует белок, активирующий сборку (AAP) в альтернативной рамке считывания, перекрывающей ген *cap*.

Считается, что этот ядерный белок обеспечивает функцию каркаса для сборки капсида и играет роль в ядрышковой локализации белков VP в некоторых серотипах AAV.

[0224] В некоторых вариантах осуществления один или более генов *rep*, *cap*, или *aap* встречаются в природе, например гены *rep*, *cap*, или *app* включают все или часть генов *rep*, *cap* или *aap* парвовируса. В некоторых вариантах осуществления один или более генов *rep*, *cap*, или *aap* содержат синтетическую последовательность.

[0225] В одном варианте осуществления ген *rep* содержит синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления ген *cap* содержит синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления ген *aap* содержит синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления гены *rep* и *cap* содержат синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления гены *rep* и *aap* содержат синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления гены *cap* и *aap* содержат синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления гены *rep*, *cap* и *aap* содержат синтетическую последовательность.

[0226] В некоторых вариантах осуществления *rep* происходит из генома AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV1. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV2. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV3. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV4. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV5. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV6. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV7. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV8. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV9. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV10. В конкретном варианте осуществления *rep* происходит из генома AAV11.

[0227] В некоторых вариантах осуществления *cap* происходит из генома AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV1. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV2. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV3. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV4. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV5. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV6. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV7. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV8. В

конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV9. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV10. В конкретном варианте осуществления *cap* происходит из генома AAV11.

[0228] В некоторых вариантах осуществления *aap* из генома AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV1. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV2. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV3. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV4. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV5. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV6. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV7. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV8. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV9. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV10. В конкретном варианте осуществления *aap* происходит из генома AAV11.

[0229] Следует понимать, что конкретный описанный в данном документе геном AAV может иметь гены из разных геномов AAV (например, геномы из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11). Таким образом, в данном документе описаны AAV, которые содержат любую возможную перестановку *rep*, *cap*, или *aap*.

[0230] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, AAV представляет собой рекомбинантный AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует один или более из гена *rep*, гена *cap*, и гена *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *cap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep* и ген *cap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep* и ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *cap* и ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep*, ген *cap*, и ген *aap*.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, гAAV модифицируют так, что один или более из гена *rep*, гена *cap* и гена *aap* подвергают мутации, так что изменяется экспрессия одного или более генов AAV. В некоторых вариантах осуществления ген *rep* подвергнут мутации. В некоторых вариантах осуществления ген *cap* подвергнут мутации. В некоторых вариантах осуществления ген *aap* подвергнут мутации. В некоторых вариантах осуществления ген *rep* и ген *cap* подвергнуты мутации. В некоторых

[0233] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован по меньшей мере с одним белком VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с каждым из 5 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с каждым из 4 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с каждым из 3 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с каждым из 2 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с 1 из белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP2, который не связан или не ассоциирован с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP2, которые не связаны или не ассоциированы с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP2, которые не связаны или не ассоциированы с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP2, которые не связаны или не ассоциированы с каркасным белком.

[illegible]

[0237] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP1, связанный или ассоциированный с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP1, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP1, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP1, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP1, связанных или ассоциированных с каркасными белками.

[0238] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит белок 1 VP3, связанный или ассоциированный с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP3, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP3, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP3, связанных или ассоциированных с каркасными белками. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP3, связанных или ассоциированных с каркасными белками.

[0239] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с AAV, например, капсидным белком AAV, одной или более пептидными связями. Каркасный белок может быть связан или ассоциирован с капсидным белком AAV на N-конце или С-конце капсидного белка или между N-концом и С-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с N-концом капсидного белка. В других вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с С-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления N-конец каркасного белка связан с С-концом капсидного белка AAV. В других вариантах осуществления С-конец каркасного белка связан с N-концом капсидного белка AAV.

[0240] Каркасный белок может быть связан или ассоциирован с капсидным белком AAV прямо или опосредованно, например, посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан или ассоциирован с капсидным белком посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер включает по меньшей мере около 2 аминокислот, по меньшей мере около 3 аминокислот, по меньшей мере около 4 аминокислот, по меньшей мере около 5 аминокислот, по меньшей мере около 6

аминокислот, по меньшей мере около 7 аминокислот, по меньшей мере примерно 8 аминокислот, по меньшей мере около 9 аминокислот, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 11 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 13 аминокислот, по меньшей мере около 14 аминокислот, по меньшей мере около 15 аминокислот, по меньшей мере около 16 аминокислот, по меньшей мере около 17 аминокислот, по меньшей мере около 18 аминокислот, по меньшей мере около 19 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 25 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 35 аминокислот, по меньшей мере около 40 аминокислот, по меньшей мере около 45 аминокислот, или по меньшей мере около 50.

[0241] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, содержащему AAV и каркасный белок, где AAV связан или ассоциирован с партнером по связыванию или димеризующим агентом химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован по меньшей мере с одним белком VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 5 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 4 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 3 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 2 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с 1 из белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP1, который не связан или не ассоциирован с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP1, которые не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP1, которые не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP1, который не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию.

[0242] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован по меньшей мере с одним белком VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 5 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 4 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 3 белков VP2 AAV. В

некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с каждым из 2 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с 1 из белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP2, который не связан или не ассоциирован с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP2, которые не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP2, которые не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP2, который не связаны или не ассоциированы с партнером по связыванию.

[illegible]

[illegible]

[0244] В некоторых вариантах осуществления количество VP3, связанных или ассоциированных с партнером по связыванию, в около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз, около 10 раз, около 11 раз, около 12 раз, около 13 раз, около 14 раз, около 15 раз, около 20 раз, около 30 раз, около 35

раз, около 40 раз, около 45 раз, около 50 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного белка VP3, не связанного или не ассоциированного с партнером по связыванию.

[0245] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит белок 1 VP2, связанный или ассоциированный с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP2, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP2, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP2, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP2, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию.

[0246] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP1, связанный или ассоциированный с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP1, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP1, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP1, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP1, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию.

[0247] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит белок 1 VP3, связанный или ассоциированный с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP3, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP3, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP3, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP3, связанных или ассоциированных с партнерами по связыванию.

[0248] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с N-концом капсидного белка. В других вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с C-концом капсидного белка. В других вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, между N-концом и C-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, во внутреннюю петлю, например, ряд аминокислот, которые образуют петлевую структуру, которая находится на поверхности капсидного белка. В некоторых вариантах

осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, непосредственно ниже аминокислоты 455 (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Gly₄₅₃ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₄ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₅ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых аспектах первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₆ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Gln₄₅₇ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Ser₄₅₈ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Arg₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены ⁴⁵³GTTTQSR₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44) или в гомологичную область белков VP других серотипов AAV. В конкретных вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен по меньшей мере в один белок VP3 путем замены Thr₄₅₅ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В конкретных вариантах осуществления партнер по связыванию вставлен по меньшей мере в один белок VP3 путем замены ⁴⁵³GTTTQSR₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44) или в гомологичную область белков VP других серотипов AAV. В некоторых аспектах первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, в сайте, выбранном из Arg₅₈₅, Arg₅₈₇ и Arg₅₈₈, или любой их комбинации относительно аминокислотной последовательности VP2 AAV2. В некоторых аспектах капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, модифицирован для включения в него внутреннего сайта миристоилирования. В некоторых аспектах капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, модифицирован для включения в него внутреннего сайта миристоилирования в расположенную на поверхности внутреннюю петлю.

[0249] Партнер по связыванию может быть связан или ассоциирован с капсидным белком AAV прямо или опосредованно, например, посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан или ассоциирован с капсидом

посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер включает по меньшей мере около 2 аминокислот, по меньшей мере около 3 аминокислот, по меньшей мере около 4 аминокислот, по меньшей мере около 5 аминокислот, по меньшей мере около 6 аминокислот, по меньшей мере около 7 аминокислот, по меньшей мере примерно 8 аминокислот, по меньшей мере около 9 аминокислот, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 13 аминокислот, по меньшей мере около 14 аминокислот, по меньшей мере около 15 аминокислот, по меньшей мере около 16 аминокислот, по меньшей мере около 17 аминокислот, по меньшей мере около 18 аминокислот, по меньшей мере около 19 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 25 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 35 аминокислот, по меньшей мере около 40 аминокислот, по меньшей мере около 45 аминокислот, или по меньшей мере около 50.

[0250] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию, связанный или ассоциированный с капсидным белком AAV, выбран из одного партнера по связыванию химически индуцированного димера, выбранного из группы, состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с FKBP. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с FRB. В некоторых вариантах осуществления FRB представляет собой FRB mTOR. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с кальциневрином A. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с GyrB. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с GAI. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с GID1. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с GAI. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан

или ассоциирован со Snap-tag. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с GAI. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с eDHFR. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с BCL-xL. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с eDHFR. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан или ассоциирован с Fab.

[0251] В конкретных вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный или ассоциированный с FRB, при этом FRB связан или ассоциирован с N-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный или ассоциированный с FRB, при этом FRB связан или ассоциирован с C-концом капсидного белка. В конкретных вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный или ассоциированный с FRB, при этом FRB вставлен в капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления FRB вставлен в капсидный белок в любом месте, описанном в данном документе.

II.B.2.

Молекула нуклеиновой кислоты AAV

[0252] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, содержащей AAV, при этом AAV содержит генетическую кассету, например, гетерологичную последовательность, кодирующую представляющий интерес ген. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из фактора свертывания крови, фактора роста, цитокина, хемокина или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует опухолевый супрессор. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует белок репарации ДНК. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует структурный белок. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует рецептор липопротеинов низкой плотности (РЛПНП). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует альфа-глюкозидазу. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе.

II.B.2.a. Терапевтические белки

[0253] В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует один терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует более одного терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует две или более копий одного и того же терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует два или более вариантов одного и того же терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета кодирует два или более различных терапевтических белка.

[0254] В некоторых вариантах осуществления ВВ связан по меньшей мере с двумя AAV, при этом каждый из по меньшей мере двух AAV содержит различную генетическую кассету, где каждая из разных генетических кассет кодирует другой терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления ВВ связан по меньшей мере с тремя AAV, по меньшей мере с четырьмя AAV или по меньшей мере с пятью AAV.

[0255] В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок включает фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из FI, FII, FIII, FIV, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII), VWF, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена, фибронектина, антитромбина III, кофактора гепарина II, белка C, белка S, белка Z, ингибитора протеина Z-родственной протеазы (ZPI), плазминогена, альфа-2-антиплазмина, тканевого активатора плазминогена (tPA), урокиназы, ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), ингибитора активатора плазминогена-2 (PAI2), любого их зимогена, любой их активной формы и любой их комбинации. В одном из вариантов осуществления фактор свертывания крови включает FVIII или его вариант, или фрагмент. В еще одном варианте осуществления фактор свертывания крови включает FIX или его вариант, или фрагмент. В еще одном варианте осуществления фактор свертывания крови включает FVII или его вариант, или фрагмент. В еще одном варианте осуществления фактор свертывания крови включает VWF или его вариант, или фрагмент.

II.B.2.a.i. Фактор VIII

[0256] «Фактор VIII», сокращенно обозначаемый в настоящей заявке как «FVIII», в контексте данного документа означает функциональный полипептид FVIII, который играет свою естественную роль в свертывании, если не указано иное. Таким образом, термин FVIII включает вариантные полипептиды, которые являются функциональными. «Белок FVIII» используется взаимозаменяемо с полипептидом (или белком) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают, помимо прочего, способность активировать коагуляцию, способность действовать в качестве кофактора фактора IX или способность образовывать

комплекс теназы с фактором IX в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов, которые затем преобразует Фактор X в активированную форму Xa. Белок FVIII может быть белком FVIII человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Кроме того, сравнения между FVIII от человека и других видов выявили консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6251632). Полноразмерные полипептидные и полинуклеотидные последовательности известны, как и многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные версии. Различные аминокислотные и нуклеотидные последовательности FVIII раскрыты, например, в публикациях США № 2015/0158929 A1, 2014/0308280 A1 и 2014/0370035 A1 и в международной публикации № WO 2015/106052 A1. Полипептиды FVIII включают, например, полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII без Met на N-конце, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полным или частичным удалением домена B. Варианты FVIII включают делеции домена B, частичные или полные.

[0257] В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FVIII, при этом нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована. В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета содержит нуклеотидную последовательность, которая раскрыта в публикации международной заявки № WO 2019/032898; WO/2017/136358; или WO2017/136358; или опубликованной заявке США № 2015-0361158, которые полностью включены посредством ссылки.

[0258] В некоторых вариантах осуществления генетическая кассета содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FVIII, при этом нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность кодирует полноразмерный полипептид FVIII. В других вариантах осуществления кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность кодирует полипептид FVIII с удаленным доменом B (BDD), в котором удален весь или часть домена B FVIII.

II.B.2.a.ii. Фактор IX

[0259] В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок содержит полипептид FIX. В некоторых вариантах осуществления полипептид FIX включает FIX или его вариант, или фрагмент, при этом FIX или его вариант, или фрагмент обладают активностью FIX.

[0260] Человеческий FIX представляет собой сериновую протеазу, которая является важным компонентом внутреннего пути каскада свертывания крови. «Фактор IX» или

«FIX» в контексте данного документа относится к белку фактора свертывания крови и его видам и вариантам последовательностей, и включает, но не ограничивается, 461-аминокислотную одноцепочечную последовательность полипептида-предшественника человеческого FIX («препро»), 415-аминокислотную одноцепочечную последовательность зрелого человеческого FIX и варианта R338L FIX (Padua). FIX включает любую форму молекулы FIX с типичными характеристиками свертывания крови для FIX (см., например, Choo et al., Nature 299:178-180 (1982); Fair et al., Blood 64:194-204 (1984); и Kurachi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 79:6461-6464 (1982); US 7939632, каждый из которых включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0261] Многие функциональные варианты FIX известны в данной области техники. В международной публикации под номером WO 02/040544 A3 на странице 4, строках 9-30 и странице 15, строках 6-31 описаны мутанты, которые проявляют повышенную устойчивость к ингибированию гепарином. В международной публикации под номером WO 03/020764 A2 в таблицах 2 и 3 (на страницах 14-24) и на странице 12, в строках 1-27 описаны мутанты FIX с пониженной Т-клеточной иммуногенностью. В международной публикации под номером WO 2007/149406 A2 со страницы 4, строки 1 до страницы 19, строки 11 описаны функциональные мутантные молекулы FIX, которые демонстрируют повышенную стабильность белка, увеличенный период полужизни *in vivo* и *in vitro* и повышенную устойчивость к протеазам. В WO 2007/149406 A2 со страницы 19, строки 12 до страницы 20, строки 9 также описаны химерные и другие варианты молекул FIX. В международной публикации под номером WO 08/118507 A2 со страницы 5, строки 14 до страницы 6, строки 5 описаны мутанты FIX, которые проявляют повышенную свертывающую активность. В международной публикации под номером WO 09/051717 A2 со страницы 9, строки 11 до страницы 20, строки 2 описаны мутанты FIX, имеющие повышенное количество сайтов N-связанного и/или O-связанного гликозилирования, что приводит к увеличению периода полужизни и/или восстановления. В международной публикации под номером WO 09/137254 A2 со страницы 2, абзаца [006] до страницы 5, абзаца [011] и со страницы 16, абзаца [044] до страницы 24, абзаца [057] также описаны мутанты фактора IX с увеличенным количеством сайтов гликозилирования. В международной публикации под номером WO 09/130198 A2 со страницы 4, строки 26 до страницы 12, строки 6 описаны функциональные мутантные молекулы FIX, которые имеют повышенное количество сайтов гликозилирования, что приводит к увеличению периода полужизни. В международной публикации под номером WO 09/140015 A2 со страницы 11, абзаца [0043] до страницы 13, абзаца [0053] описаны функциональные мутанты FIX с увеличенным числом остатков Cys, которые можно использовать для конъюгации полимера

(например, PEG). Полипептиды FIX, описанные в международной заявке № PCT/US2011/043569, поданной 11 июля 2011 г. и опубликованной как WO 2012/006624 12 января 2012 г., также полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления полипептид FIX включает полипептид FIX, слитый с альбумином, например, FIX-альбумин. В некоторых вариантах осуществления полипептид FIX представляет собой IDELVION® или rIX-FP.

[0262] В некоторых вариантах осуществления FIX выбран из FIX, описанного в патенте США № 7404956; 9062299; или 9670475; опубликованной заявке США № 2015-0252345; 2016-0000888; или 2017-0260516; или в международной публикации № WO/2017/024060.

II.B.2.a.iv. Факторы роста

[0263] В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок включает фактор роста. Фактор роста может быть выбран из любого фактора роста, известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой гормон. В других вариантах осуществления фактор роста представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой хемокин.

[0264] В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой аденомедуллин (AM). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой ангиопоэтин (Ang). В некоторых вариантах реализации фактор роста представляет собой фактор аутокринной миграции. В некоторых вариантах реализации фактор роста представляет собой костный морфогенетический белок (BMP). В некоторых вариантах осуществления BMP выбран из BMP2, BMP4, BMP5 и BMP7. В некоторых вариантах осуществления фактор роста является членом семейства цилиарных нейротрофических факторов. В некоторых вариантах осуществления член семейства цилиарных нейротрофических факторов выбран из цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), лейкоз-ингибирующего фактора (LIF), интерлейкина-6 (IL-6). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой колониестимулирующий фактор. В некоторых вариантах осуществления колониестимулирующий фактор выбран из макрофагального колониестимулирующего фактора (m-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой эпидермальный фактор роста (EGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой эфрин. В некоторых вариантах осуществления эфрин выбран из эфрина A1, эфрина A2, эфрина A3, эфрина A4, эфрина A5, эфрина B1, эфрина B2 и эфрина B3. В некоторых вариантах осуществления фактор роста

представляет собой эритропоэтин (EPO). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста фибробластов (FGF). В некоторых вариантах осуществления FGF выбран из FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, и FGF23. В некоторых вариантах реализации фактор роста представляет собой соматотропин плода крупного рогатого скота (FBS). В некоторых вариантах осуществления фактор роста является членом семейства GDNF. В некоторых вариантах осуществления член семейства GDNF выбран из нейротрофического фактора линии глиальных клеток (GDNF), нейротурина, персефина и артемина. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор дифференцировки роста-9 (GDF9). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста гепатоцитов (HGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста гепатомы (HDGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой инсулиноподобный фактор роста. В некоторых вариантах осуществления инсулиноподобный фактор роста представляет собой инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) или IGF-2. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой интерлейкин (IL). В некоторых вариантах осуществления IL выбран из IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста кератиноцитов (KGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой стимулирующий миграцию фактор (MSF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой стимулирующий макрофаги белок (MSP или подобный фактору роста гепатоцитов белок (HGFLP)). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой миостатин (GDF-8). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой нейрегулин. В некоторых вариантах осуществления нейрегулин выбран из нейрегулина 1 (NRG1), NRG2, NRG3 и NRG4. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой нейротрофин. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста нервов (NGF). В некоторых вариантах осуществления NGF представляет собой нейротрофин-3 (NT-3) или NT-4. В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой плацентарный фактор роста плаценты (PGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста тромбоцитов (PDGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой реналазу (RNLS). В некоторых вариантах осуществления фактор роста

представляет собой фактор роста Т-клеток (TCGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой тромбопоэтин (TPO). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой трансформирующий фактор роста. В некоторых вариантах осуществления трансформирующий фактор роста представляет собой трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α) или TGF- β . В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α). В некоторых вариантах осуществления фактор роста представляет собой фактор роста эндотелия сосудов (VEGF).

[0265] В некоторых вариантах реализации терапевтический белок включает субъединицу комплекса Rab-геранилгеранилтрансферазы (ГГТаза). В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок включает компонент А Rab-ГГТаза 1 (REP1). В некоторых вариантах осуществления REP1 содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 45. Дефицит REP1 связан с хориоидеремией (CHM), редкой X-связанной прогрессирующей дегенерацией сосудистой оболочки, пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторов глаза. Типичное естественное течение у больных мужчин представляет собой начало ночной слепоты в подростковом возрасте, а затем прогрессирующая потеря периферического зрения в течение 20-30 лет, что приводит к полной слепоте в 40-х годах. Женщины-носители имеют легкие симптомы, в первую очередь ночную слепоту, но иногда могут иметь более тяжелый фенотип.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотная последовательность REP1 (SEQ ID NO: 45)

MADTLPSEFDVIVIGTGLPESIIAAACSRSGRRVLHVDSRSYYGGNWASFSGSL LSWLKEYQENSDIVSDSPVWQDQILENEEAIALSRKDKTIQHVEVFCYASQDLH EDVEEAGALQKNHALVTSANSTEAAADSAFLPTEDESLSTMSCMLTEQTPSSDP ENALEVNGAEVTGEKENHCDDKTCVPSTSAEDMSENVPIAEDTTEQPKKNRITY SQIIEGRRFNIDLVSLLYSRGLLIDLLIKSNVSRYAIEFKNITRILAFREGRVEQV PCSRADVFNKQLTMVEKRMLMKFLTFCMEYEKYPDEYKGYEEITFYEYLKTQ KLTPNLQYIVMHSIAMTSETASSTIDGLKATKNFLHCLGRYGNTPLFPLYGQGE LPQCFCRMCAVFGGIYCLRHVSQCLVVDKESRKCKAIDQFGQRIISEHFLVEDS YFPENMCSRQYRQISRAVLITDRSVLKTDSQDQISILTVPAEETPGTFAVRVIELC SSTMTCKMGTYLVHLTCTSSKTAREDLSEVVQKLFVPYTEMEIENEQVEKPRIL
--

WALYFNMRDSSDISRSCYNLPSNVYVCSGPDCGLGNDNAVKAETLFQEICP
NEDFCPPPPNPEDIILDGDSLQPEASESSAIPEANSETFKESTNLGNLEESSE

[0266] Заболевание вызвано мутациями в гене REP1 (Rab сопровождающий белок 1), который расположен в области 21q X-хромосомы. В большинстве клеток организма белок REP2, который на 75% гомологичен REP1, компенсирует дефицит REP1. На первый взгляд, однако, по причинам, которые еще не ясны, REP2 не может компенсировать дефицит REP1. Следовательно, в глазу активность полипептида REP недостаточна для поддержания нормального пренилирования целевых белков (Rab-ГТФаз), что приводит к клеточной дисфункции и окончательной гибели, в первую очередь затрагивая внешнюю сетчатку и сосудистую оболочку.

II.B.2.b. Последовательность AAV

[0267] В некоторых вариантах осуществления AAV дополнительно содержит первый ITR, например, 5'-ITR, и второй ITR, например, 3'-ITR. Как правило, ITR участвуют в репликации ДНК парвовируса (например, AAV) и освобождении или вырезании из прокариотических плазмид (Samulski *et al.*, 1983, 1987; Senapathy *et al.*, 1984; Gottlieb and Muzyczka, 1988). Кроме того, сообщается, что ITR являются минимальными последовательностями, необходимыми для интеграции провирусов AAV и для упаковки ДНК AAV в вирионы (McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989). Эти элементы необходимы для эффективного размножения генома парвовируса.

[0268] В некоторых вариантах осуществления ITR включает природный ITR, например, ITR включает всю или часть ITR парвовируса. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления первый ITR или второй ITR содержит синтетическую последовательность. В другом варианте осуществления каждый из первого ITR и второго ITR содержит синтетическую последовательность. В некоторых вариантах осуществления первый ITR или второй ITR содержит природную последовательность. В еще одном варианте осуществления каждый из первого ITR и второго ITR содержит природную последовательность.

[0269] В некоторых вариантах осуществления ITR включает ITR из генома AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR генома AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления ITR представляет собой ITR из генома AAV2. В определенных вариантах осуществления ITR представляет собой ITR AAV2, а капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV5. В другом варианте осуществления ITR представляет собой генетически сконструированную синтетическую последовательность, которая включает на своих 5'- и 3'-концах ITR или их фрагменты, полученные из одного или более геномов AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR происходят из одного и того же генома, например, из генома одного и того же вируса, или из разных геномов, например, из геномов двух или более разных геномов AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR происходят из одного и того же генома AAV. В конкретном варианте осуществления два ITR, присутствующие в молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению, являются одинаковыми и могут, в частности, быть ITR AAV2, ITR AAV5 или ITR AAV9. В одном конкретном варианте осуществления первый ITR и второй ITR идентичны.

[0270] В некоторых вариантах осуществления ITR образуют структуры по типу «петля-шпилька». В одном варианте осуществления первый ITR образует шпилечную структуру. В еще одном варианте осуществления второй ITR образует шпилечную структуру. Еще в другом варианте осуществления как первый ITR, так и второй ITR образуют шпилечные структуры.

[0271] В некоторых вариантах осуществления ITR в описанной в данном документе молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой активируемый транскрипцией ITR. Активируемый транскрипцией ITR может включать весь или часть ITR дикого типа, который был активирован транскрипцией путем включения по меньшей мере одного транскрипционно активного элемента. В этом контексте подходят различные типы транскрипционно активных элементов. В некоторых вариантах осуществления транскрипционно активный элемент является конститутивным транскрипционно активным элементом. Конститутивные транскрипционно активные элементы обеспечивают постоянный уровень транскрипции гена и предпочтительны, когда желательно, чтобы трансген экспрессировался на постоянной основе. В других вариантах реализации транскрипционно активный элемент представляет собой индуцибельный транскрипционно активный элемент. Индуцируемые транскрипционно активные элементы обычно проявляют низкую активность в отсутствие индуктора (или индуцирующего условия) и активируются в присутствии индуктора (или переключаются в индуцирующее состояние).

Индукцируемые транскрипционно активные элементы могут быть предпочтительными, когда экспрессия желательна только в определенное время или в определенных местах, или когда желательно изменять уровень экспрессии с использованием индуцирующего агента. Транскрипционно активные элементы также могут быть тканеспецифичными; то есть они проявляют активность только в определенных тканях или типах клеток.

[0272] Транскрипционно активные элементы могут быть включены в ITR различными способами. В некоторых вариантах реализации транскрипционно активный элемент вставлен на 5'-конец относительно любой части ITR или 3'-конец относительно любой части ITR. В других вариантах осуществления транскрипционно активный элемент активируемого транскрипцией ITR находится между двумя последовательностями ITR. Если транскрипционно активный элемент содержит два или более элементов, которые должны быть разнесены, эти элементы могут чередоваться с частями ITR. В некоторых вариантах осуществления шпильчатую структуру ITR удаляют и заменяют инвертированными повторами транскрипционного элемента. Эта последнее расположение создаст шпильку, имитирующую удаленную часть в структуре. Множественные тандемные транскрипционно активные элементы могут также присутствовать в активируемом транскрипцией ITR, и они могут быть смежными или разнесенными. Кроме того, сайты связывания с белками (например, сайты связывания Rep) могут быть введены в транскрипционно активные элементы активируемых транскрипцией ITR. Транскрипционно активный элемент может содержать любую последовательность, обеспечивающую контролируемую транскрипцию ДНК с помощью РНК-полимеразы с образованием РНК, и может содержать, например, транскрипционно активный элемент, как определено ниже.

[0273] Активируемые транскрипцией ITR обеспечивают как активацию транскрипции, так и функции ITR для молекулы нуклеиновой кислоты в относительно ограниченной длине нуклеотидной последовательности, которая эффективно максимизирует длину трансгена, который может переноситься и экспрессироваться из молекулы нуклеиновой кислоты. Включение транскрипционно активного элемента в ITR может быть выполнено множеством способов. Сравнение последовательности ITR и требований к последовательности транскрипционно активного элемента может дать представление о способах кодирования элемента в ITR. Например, транскрипционная активность может быть добавлена к ITR посредством внесения определенных изменений в последовательность ITR, которая реплицирует функциональные элементы транскрипционно активного элемента. В данной области существует ряд методов для эффективного добавления, удаления и/или изменения конкретных нуклеотидных

последовательностей в определенных сайтах (см., например, Deng and Nickoloff (1992) *Anal. Biochem.* 200:81-88). Другой способ создания активируемых транскрипцией ITR включает введение сайта рестрикции в желаемое место ITR. Кроме того, несколько транскрипционно активируемых элементов могут быть включены в активируемую транскрипцией ITR с использованием способов, известных в данной области техники.

[0274] В качестве иллюстрации, активируемые транскрипцией ITR могут быть получены путем включения одного или более транскрипционно активных элементов, таких как: TATA-бокс, GC-бокс, CCAAT-бокс, сайт Sp1, область Inr, сайт CRE (регуляторный элемент цАМФ), сайт ATF-1/CRE, APB β -бокс, APB α -бокс, CArG-бокс, CCAC-бокс или любой другой элемент, участвующий в транскрипции, как известный в данной области техники.

[0275] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит генетическую кассету, кодирующую более одного терапевтического белка. В AAV, кодирующих более одного терапевтического белка, некоторые варианты осуществления включают такие элементы, как IRES или 2A, для их совместной экспрессии с одного промотора. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит области, кодирующие белок, разделенные элементом IRES. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит две области, кодирующие белок, разделенные элементом 2A. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три области, кодирующие белок, разделенные элементом IRES между областями, кодирующими белок. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три области, кодирующие белок, разделенные элементами 2A между областями, кодирующими белок.

[0276] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит регуляторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит не кодирующую регуляторную ДНК. В некоторых вариантах осуществления геном AAV содержит регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые регулируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция AAV, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т. д. В некоторых вариантах осуществления геном AAV

содержит сайты донора/акцептора сплайсинга мРНК. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, аденовирусного главного позднего промотора (AdMLP) и полиомы. Альтернативно можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, таких как промоторная система SRa, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинного концевой повтора вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). В определенных вариантах осуществления регуляторная последовательность включает тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор управляет экспрессией представляет гена в ткани, выбранной из группы, состоящей из сердца, печени, легких, глаз, нервной системы, лимфатической системы, мышечных и стволовых клеток.

II.B.2.c. Способы и применение AAV

[0277] Способы получения рекомбинантных AAV, содержащих желаемый капсидный белок, хорошо известны в данной области техники. (См., например, US 2003/0138772, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки). Как правило, способы включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV или его фрагмент; функциональный ген *rep*; рекомбинантный вектор AAV, состоящий из ITR AAV и трансгена; и достаточное количество хелперных функциональных элементов, позволяющих упаковывать рекомбинантный вектор AAV в капсидные белки AAV. Вспомогательные функции для увеличения продукции AAV могут быть обеспечены путем трансфекции плазмидной ДНК или путем совместного инфицирования аденовирусом.

[0278] Компоненты, которые должны культивироваться в клетке-хозяине для упаковки вектора γ AAV в капсид AAV, могут быть представлены в клетке-хозяине в *транс*-положении. Альтернативно, один или более требуемых компонентов (например, рекомбинантный вектор AAV, последовательности *rep*, последовательности *cap* и/или хелперные функциональные элементы) могут обеспечиваться стабильной клеткой-хозяином, которая была искусственно создана таким образом, чтобы содержать один или более требуемых компонентов, с помощью методов, известных специалистам в данной области техники. Наиболее соответствующим образом, такая стабильная клетка-хозяин

будет содержать требуемый(-е) компонент(-ы) под контролем индуцибельного промотора. Однако требуемый(-е) компонент(-ы) могут находиться под контролем конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцибельных и конститутивных промоторов представлены в данном документе при обсуждении регуляторных элементов, подходящих для использования с трансгеном. В еще одном альтернативном варианте выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(-е) компонент(-ы) под контролем конститутивного промотора и другие выбранные компоненты под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть создана стабильная клетка-хозяин, которая была получена из клеток 293 (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), но которая содержит белки гер и/или сар под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева также могут быть получены специалистом в данной области техники.

[0279] Рекомбинантный вектор AAV, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функциональные элементы, необходимые для продуцирования гAAV по данному изобретению, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (вектора). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая способы, описанные в данном документе. Способы, используемые для конструирования любого варианта данного изобретения, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы. См., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Аналогичным образом, способы получения вирионов гAAV хорошо известны, и выбор подходящего способа не ограничивает настоящее изобретение. См., например, K. Fisher *et al.*, *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) и патент США № 5478745.

[0280] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с использованием способа тройной трансфекции (подробно описанного в патенте США № 6001650). Обычно рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантным вектором AAV (содержащим трансген) для упаковки в частицы AAV, хелперный функциональный вектор AAV и вспомогательный функциональный вектор. Хелперный функциональный вектор AAV кодирует последовательности «функционального элемента хелперного AAV» (то есть гер и сар), которые функционируют в *транс*-положении в отношении продуктивной репликации и инкапсулирования AAV. Предпочтительно, хелперный функциональный вектор AAV поддерживает эффективное

продуцирование вектора AAV без образования каких-либо детектируемых вирионов AAV дикого типа (то есть вирионов AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры векторов, подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают pHLP19, описанный в патентах США № 6001650, и вектор pРербсар6, описанный в патенте США № 6156303, причем оба документа включены в данный документ посредством ссылки. Вспомогательный функциональный вектор кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функций, не являющихся производными AAV, от которых зависит репликация AAV (то есть, «вспомогательные функциональные элементы»). Вспомогательные функциональные элементы включают те функциональные элементы, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, те части, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, специфическом для стадии сплайсинга мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии сар и сборке капсида AAV. Вирусные вспомогательные функциональные элементы могут быть приобретены из любого из известных хелперных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1), бакуловир, и вирус осповакцины. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV получают с использованием транзientной трансфекции клеток HEK293 тройной плазмидной системой, описанной в данном документе.

[0281] В некоторых аспектах изобретение относится к трансфицированным клеткам-хозяевам. Термин «трансфекция» используется для обозначения поглощения чужеродной ДНК клеткой, и клетка «трансфицирована», когда экзогенная ДНК введена внутрь клеточной мембраны. Ряд способов трансфекции, как правило, известен в данной области техники. См., например, Graham *et al.* (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis *et al.* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, и Chu *et al.* (1981) *Gene* 13:197. Такие методики можно использовать для введения одной или более экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор интеграции нуклеотидов и других молекул нуклеиновых кислот, в подходящие клетки-хозяева.

[0282] Термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая содержит или способна нести представляющее интерес вещество. Часто клеткой-хозяином является клетка млекопитающего. Клетка-хозяин может использоваться в качестве реципиента хелперной конструкции AAV, вспомогательного функционального вектора или другого ДНК-переносчика, связанного с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к клетке,

которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК. В некоторых вариантах осуществления AAV получают с использованием транзientной или стабильной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетки HEK293, HeLa, клетки ВНК или клетки sf9. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии или по комплементарной последовательности геномной или общей ДНК с исходной родительской клеткой вследствие природных, случайных или умышленных мутаций.

[0283] Используемый в данном документе термин «клеточная линия» относится к популяции клеток, способных к непрерывному или продолжительному росту и делению *in vitro*. Часто клеточные линии представляют собой клональные популяции, полученные из одной клетки-предшественника. Кроме того, в данной области известно, что спонтанные или индуцированные изменения могут происходить в кариотипе во время хранения или переноса таких клональных популяций. Следовательно, клетки, полученные из указанной клеточной линии, могут не быть в точности идентичными предковым клеткам или культурам, и указанная клеточная линия включает такие варианты.

[0284] Используемый в данном документе термин «рекомбинантная клетка» относится к клетке, в которую был введен экзогенный сегмент ДНК, такой как сегмент ДНК, который приводит к транскрипции биологически активного полипептида или продукции биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

[0285] Используемый в данном документе термин «вектор» включает любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т. д., который способен к репликации, когда он связан с соответствующими регуляторными элементами и который может переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает носители для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления подходящими векторами считаются те векторы, в которых транскрибируемый сегмент нуклеиновой кислоты расположен под транскрипционным контролем промотора. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенному синтетическому аппарату, необходимому для инициации специфической транскрипции гена. Фразы «функционально расположенный», «под контролем» или «под транскрипционным контролем» означают, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте, чтобы контролировать инициацию РНК-полимеразы и экспрессию гена. Термин «вектор или конструкт экспрессии» означает любой тип

генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, в которой часть или вся кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты способна транскрибироваться. В некоторых вариантах осуществления экспрессия включает транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, для создания биологически активного полипептидного продукта или ингибирующей РНК (например, кшРНК, миРНК, ингибитора миРНК) из транскрибируемого гена.

[0286] В некоторых вариантах осуществления AAV или gAAV очищают с использованием градиента плотности йодиксанола. В некоторых вариантах осуществления пустые капсиды мигрируют с плотностью около $1,3 \pm 0,05$ г/мл (например, 1,3–1,32 г/мл). В некоторых вариантах осуществления капсиды, содержащие геном, мигрируют с плотностью около $1,4 \pm 0,05$ г/мл (например, 1,35–1,42 г/мл).

II.C. Каркасные белки

[0287] В некоторых аспектах настоящего изобретения ВВ содержит AAV и один или более каркасных белков. В некоторых вариантах осуществления ВВ по настоящему изобретения содержат мембрану, модифицированную по своему составу. Например, составы их мембран могут быть изменены путем изменения содержания белков, липидов или гликанов в мембране.

[0288] В некоторых вариантах осуществления сконструированные на поверхности ВВ, например, экзосомы получают химическими и/или физическими методами, такими как индуцированное PEG-слияние и/или ультразвуковое слияние. В других вариантах осуществления сконструированные на поверхности ВВ, например, экзосомы, получают с помощью генной инженерии. ВВ, *например*, экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать модифицированные мембранные композиции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные на поверхности ВВ, например экзосомы, содержат каркасный белок с более высокой или более низкой плотностью (например, с большим числом) или включают вариант или фрагмент каркасного белка.

[0289] В некоторых вариантах осуществления сконструированные на поверхности ВВ получают из клетки (например, клеток HEK293), трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей каркасный белок (например, белки экзосом или каркасный белок, описанные в данном документе) или его вариант или фрагмент. ВВ, содержащие каркасный белок, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать мембраны с модифицированным составом.

[0290] Различные модификации или фрагменты каркасного белка могут использоваться для вариантов осуществления настоящего изобретения. Например, каркасный белок, модифицированный с целью повышения аффинности к связывающему агенту, может быть использован для создания сконструированных на поверхности ВВ, которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать каркасные белки, модифицированные для более эффективного нацеливания на ВВ и/или мембраны. Также можно использовать каркасные белки, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на экзосомные мембраны.

[0291] Каркасный белок может быть сконструирован для экспрессии в виде слитой молекулы, например, слитой молекулы мембранного белка экзосомы с AAV. Например, слитая молекула может содержать каркасный белок, описанный в данном документе (например, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или его фрагмент или вариант), связанный с капсидным белком AAV, либо напрямую, либо через промежуточное соединение (например, химически индуцируемый димер, антигенсвязывающий домен или рецептор). В случае слитой молекулы химически индуцируемый димер, антигенсвязывающий домен и/или рецептор могут быть природным пептидом, рекомбинантным пептидом, синтетическим пептидом или любой их комбинацией.

[0292] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе сконструированные на поверхности ВВ демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ, известными в данной области техники. Например, сконструированные на поверхности ВВ содержат на поверхности модифицированные белки в больших количествах, чем встречающиеся в природе ВВ или ВВ, полученные с применением обычных белков экзосом. Более того, сконструированные на поверхности ВВ по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению с ВВ, встречающимися в природе, или ВВ, полученными с использованием обычных белков экзосом.

[0293] Каркасные белки по настоящему изобретению можно использовать для закоривания на внешней поверхности или поверхности просвета (внутренней поверхности). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок способен прикреплять гетерологичный полипептид к внешней поверхности ВВ, например, каркасный белок имеет внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок способен прикреплять гетерологичный полипептид к внутренней поверхности ВВ, например, каркасный белок имеет внутриклеточный (просветный) домен.

В некоторых вариантах осуществления каркасный белок способен прикреплять гетерологичный полипептид либо к внешней поверхности ВВ, либо к поверхности просвета ВВ, либо к обеим, например, каркасный белок имеет внеклеточный домен и внутриклеточный домен, например ВВ представляет собой трансмембранный белок.

II.C.1. Трансмембранные каркасные белки

[0294] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок (например, каркас X) включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (полипептид PTGFRN). Белок PTGFRN может также называться партнером 1 CD9 (CD9P-1), белком F, содержащим мотив Glu-Trp-Ile EWI (EWI-F), регуляторным белком рецептора простагландина F2-альфа, белком, связанным с рецептором простагландина F2-альфа или CD315. Полноразмерная аминокислотная последовательность белка PTGFRN человека (номер доступа в базе данных Uniprot Q9P2B2) показана в ТАБЛИЦЕ 3 как SEQ ID NO: 1. Полипептид PTGFRN содержит сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 25 из SEQ ID NO: 1), внеклеточный домен (аминокислоты с 26 по 832 из SEQ ID NO: 1), трансмембранный домен (аминокислоты с 833 по 853 из SEQ ID NO: 1) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 854 по 879 из SEQ ID NO: 1). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 1 без сигнального пептида, т.е. аминокислот с 26 по 879 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в контексте настоящего изобретения, включает трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других осуществления изобретения фрагмент полипептида PTGFRN, пригодный для настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN и (i) по меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 110, по меньшей мере приблизительно 120, по меньшей мере приблизительно 130, по меньшей мере приблизительно 140, по меньшей мере приблизительно 150 аминокислот на N-конце трансмембранного домена, (ii) по меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20 или по меньшей мере приблизительно 25 аминокислот на C-конце трансмембранного домена или как (i), так и (ii).

[0295] В некоторых вариантах осуществления фрагменты полипептида PTGFRN лишены одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0296] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична аминокислотам 26–879 SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 2 (соответствует положениям 687–878 SEQ ID NO: 1).

[0297] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и одну аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 2.

[0298] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию

или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191.

ТАБЛИЦА 2. Иллюстративные последовательности каркасных белков

Белок	Последовательность
Белок PTGFRN (SEQ ID NO: 1)	MGRLASRPLLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSD YDGPSEQNFDWSF SSLGSSFVELASTWEVGFPALYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKN VQPSDQGHYKCS TPSTDATVQGNVEDTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELR CTAASASPLHTH LALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVG SDAYRLSVSRALSA DQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNV SVAEGKELDLTCN ITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLHSSPHVAL SHVDARSYHLLV RDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLE PDYQVYLNASKVPGF ADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAV MDGDWTLKYGERSK QRAQDGDFFISKEHTDTFNRIQRTTEEDRGNYCVCVSAWTKQRNNS WVKSKDVFSKPVN IFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIM AEKPVGDLSSPN ETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFYRMYQTQ VSDAGLYRCMVTAW SPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLF CIITVEGAAL

	DPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLS LERVSVLEFLLQV HGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSP TGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLN AFKYPLLIGVGLS TVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEMD
--	---

Фрагмент белка PTGFRN (SEQ ID NO: 2)	GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVH SFGLDKAPVLLSSLDKIGIVTTSRRDWKSDLSLERSVSVLEFLLQVHGS EDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFK YPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCKKEVQET RRERRRLMSMEM 687–878 SEQ ID NO: 1
Белок BSG (SEQ ID NO: 3)	MAAALFVLLGFALLGTHGASGAAGFVQAPLSQQRWVGGSVELHCEA VGSPVPEIQWWFEGQGPNDTCSQLWDGARLDRVHIHATYHQHAASTI SIDTLVEEDTGTYECRASNDPDRNHLTRAPRVKWVRAQAVVLVLEPG TVFTTVEDLGSKILLTCSLNDSEVTGHRWLKGGVVLKEDALPGQK TEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRVKAVKSSEHINE GETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSEDKALMNGSESRRFFVSSSQG RSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGSQDAITLRVRSHLAALWPFL GIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDAGSAPLKSSGQHQNCKGK NVRQRNSS
Белок IGSF8 (SEQ ID NO: 4)	MGALRPTLLPPSLPLLLLLMLGMGCWAREVLVPEGPLYRVAGTAVSI SCNVTGYEGPAQQNFEWFLYRPEAPDTALGIVSTKDTQFSYAVFKSR VVAGEVQVQRLQGDVVLKIALRLQAQDAGIYECHTPSTDTRYLGYSY GKVELRVLPDVLQVSAAPPGRGRQAPTSPPRMTVHEGQELALGCLA RTSTQKHTHLAVSFGRSVPEAPVGRSTLQEVVGIRSDLAVEAGAPYAE RLAAGELRLGKEGTDRYRMVVGGAQAGDAGTYHCTAAEWIQDPDG SWAQIAEKRAVLAHVDVQTLSSQLAVTVGPGERRIGPGEPELLECNV SGALPPAGRHAAYSVGWEMAPAGAPGPGRLVAQLDTEGVGSLGPGY EGRHIAMEKVASRTYRLRLEAARPGDAGTYRCLAKAYVRGSGTRLR EAASARSRLPVHVREEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVR GGPPGLRLAASWWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGVAVELGVRPG GGPVSVELVGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQ AGSARSGPVTVPYPMHALDTLFLVPLLVTGVALVTGATVLGTITCCF MKRLRKR

Белок ITGB1 (SEQ ID NO: 5)	MNLQPIFWIGLISSVCCVFAQTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGW CTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKGCPPDDIENPRGSKDIKKKN VTNRSKGTAEKLPEDITQIQPQQLVLRLRSGEPQTFTLKFKRAEDYPI DLYYLMDL SYSMKDDLENVKSLGTDLMNEMRRITSDFRIGFGSFVEK TVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTNKGEVFNELVGK QRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHFA GDGKLGGIVLPNDGQCHLENNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLENNIQ TIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTL SANSSNVIQLIIDAYNSLSSEVI LENGKLSEGV TISYKSYCKNGVNGTG ENGRKCSNISIGDEVQFEISITS NKCPKKDSDSFKIRPLGFTEEVEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNG TFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEDMDAYCRKENSSEICSNNG ECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGASNGQICNGRGICECGVCKCTDPKFQ GQTCEMCQTCLGVCAEHKECVQCRAFNKGEKKDTCTQECSYFNITK VESRDKLPQPVPDPVSHCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEVMVHV VENPECPTGPDIIPIVAGVVAGIVLIGLALLLIWKLLMIHHRREFAKFE KEKMNAKWDGTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
-------------------------------------	---

Белок ITGA4 (SEQ ID NO: 6)	MAWEARREPGPRRAAVRETVMLLLCLGVPTGRPYNVDTESALLYQG PHNTLFGYSVVLHSHGANRWLLVGAPTANWLANASVINPGAIYRCRI GKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLRQPGENG IVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKRIAPCYQDYV KKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGSSYWTGSLFVYNITTNKYK AFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFERSQHTTEVVGGAPQHEQIGKAYI FSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGASVCAVDLNADGFSDLLVGAPMQ STIREEGRVFVYINSGSGAVMNAMETNLVGSDKYAARFGESIVNLGDI DNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIYIYNGRADGISSTFSQRIEGLQISKSL SMFGQSISGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRPVVIVDASLS HPESVNRKTFDCVENGWPSVCIDLTLCFSYKGKEVPGYIVLFYNMSL DVNRKAESPFRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCRTHQAFMRKDVR DILTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPPLQPILQQKKEKDIMKKTINFA RFAHENC SADLQVSAKIGFLKPHENKTYLAVGSMKTLMLNVSLFNA GDDAYETTLHVKL PVGLYFIKILEEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIG YIYVDHL SRIDISFLLDVSSLSRAEEDLSITVHATCENEEEMDNLKHSR VTVAIPLKYE VKLTVHGFVNPTSFVYGSNDENEPETCMVEKMNLTFH VINTGNSMAPNV SVEIMVPNSFSPQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQ RVCALEQQKSAMQTLKGIVRFLSKTDKRLLYCIKADPHCLNFLCNFG KMESGKEASVHIQLEGRPSILEMDETSALKFEIRATGFPEPNPRVIELN KDENV AHVLLLEGLHHQRPKRYFTIVISSSLLLGLIVLLLISYVMWKAG FFKRQYKSILQEENRRDSWSYINSKSNDD
-------------------------------------	---

Белок SLC3A2, где первый Мет обработка н. (SEQ ID NO: 7)	MELQPPEASIAVVSIPRQLPGSHSEAGVQGLSAGDDSELGSHCVAQTG LELLASGDPLPSASQNAEMIETGSDCVTQAGLQLLASSDPPALASKNA EVTGTMSQDTEVDMKEVELNELEPEKQPMNAASGAAMSLAGAEKN GLVKIKVAEDEAEAAAAAKFTGLSKEELLKVAGSPGWVRTRWALLL LFWLGWLGMLAGAVVIIVRAPRCRELPAQKWWHTGALYRIGDLQAF QGHGAGNLAGLKGRLDYLSSLKVKGLVLGPIHKNQKDDVAQTDLLQ IDPNFGSKEDFDSLLQSAKKKSIRVILDLTTPNYRGENSEWSTQVDTVA TKVKDALEFWLQAGVDGFQVRDIENLKDASSFLAEWQNITKGFSEDR LLIAGTNSSDLQQILSLLESNKDLLLLTSSYLSDSGSTGEHTKSLVTQYL NATGNRWCSWSLSQARLLTSFLPAQLRLRYQLMLFTLPGTPVFSYGD EIGLDAAALPGQPMEAPVMLWDESSFPDIPGAVSANMTVKGQSEDPG SLLSLFRRLSDQRSKERSLLHGDFHAFSAGPGLFSYIRHWDQNERFLV VLNFGDVGLSAGLQASDLPASASLPAKADLLLSTQPGREEGSPLELER LKLEPHEGLLLRFPYAA
Фрагмен т 1 PTGFRN (SEQ ID NO:186)	PSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHHLALLWEVHRGPARRSVL ALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGS YRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNVSVAE GKELDLTCNITTDRAADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRS WHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRV VDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYG ERSKQRAQDGFIFSKHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYCYVSAWTKQ RNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDVSVVKARQPKPFFAAGNTFEM TCKVSSKNIKSPRYSVLMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLEN WTDASRVDGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPV RGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPINFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIIT VEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRD WKSDLSLERSVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTGSWQ KEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSH WCKKKEVQETRERRRLMSMEMD

Фармен Т 2 PTGFRN (SEQ ID NO:187)	VATVVIQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRAADDVRPEVTW SFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLVRD VSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPD YQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMN RRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDGFIFSKEHTDTF NFRIQRTTEEDRGNYCYVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWA LEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAIEKP VGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFR YRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVH SFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGS EDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFK YPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEM D
Фармен Т 3 PTGFRN (SEQ ID NO:188)	SPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEAN VRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQD GDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYCYVSAWTKQRNNSWVKSK DVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKS PRYSVLIMAIEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGV VLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAAT SLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDD MAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSV SVLEFLLQVHGS EDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFI TVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETR RERRRLMSMEMD
Фармен Т 4 PTGFRN (SEQ ID NO:189)	KPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYS VLIMAIEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLE KVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLS NPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAF DVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVL EFLQVHGS EDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITV KMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRE RRRLMSMEMD

Фрагмент 5 PTGFRN (SEQ ID NO:190)	VRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCII TVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRR DWKSDLSLERSVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYCYCSVTPWVKSP TGSW QKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSS HWCKKKEVQETRERRRRLMSMEMD
Фрагмент 6 PTGFRN (SEQ ID NO:191)	SKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCKK EVQETRERRRRLMSMEMD
Сигнальный пептид PTGFRN (SEQ ID NO:192)	MGRLASRPLLLALLSLALCRG
Фрагмент 1 белка BSG (SEQ ID NO: 193)	PGTVFTTVEDLGSKILLTCSLND SATEVTGHRWLKGGVVLKEDALPG QKTEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRVKAVKSSEHI NEGETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSEDKALMNGSESRRFFVSSS QGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGSDQAII TLVRSHLAALWP FLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDAGSAPLKSSGQHQN DK GKNVRQRNSS
Фрагмент 2 белка BSG (SEQ ID NO: 194)	HGPPRVKAVKSSEHINEGETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSEDK ALMNGSESRRFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGSDQ AII TLVRSHLAALWPFLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDA GSAPLKSSGQHQN DKGKNVRQRNSS
Фрагмент 3 белка BSG (SEQ ID NO: 195)	SHLAALWPFLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDAGSAPLKSS GQHQN DKGKNVRQRNSS

Сигналь ный пептид белка BSG (SEQ ID NO: 196)	MAAALFVLLGFALLGTHG
Фрагмен т №1 белка IGSF8 (SEQ ID NO: 197)	APPGPRGRQAPTSPRMTVHEGQELALGCLARTSTQKHTHLAVSFGR SVPEAPVGRSTLQEVVGIRSDLA VEAGAPYAERLAAGELRLGKEGTD RYRMVVGGAQAGDAGTYHCTAAEWIQDPDGSWAQIAEKRAVLAVH DVQTLSSQLAVTVGPGERRIGPGELELLCNVSGALPPAGRHAAYS VSWEMAPAGAPGPGRLVAQLDTEGVGSLGPGYEGRHIAMEKVASR TYRLRLEAARPGDAGTYRCLAKAYVRGSGTRLREAASARSRPLPVH VREEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRGGPPGLRLAASW WVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGVAELGVRPGGGPVSVELVGPR SHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQAGSARSGPVT VYPYMHALDITLFLVPLLVGTGVALVTGATVLGTITCCFMKRLRKR
Фрагмен т №2 белка IGSF8 (SEQ ID NO: 198)	AHVDVQTLSSQLAVTVGPGERRIGPGELELLCNVSGALPPAGRHA AAYSVGWEMAPAGAPGPGRLVAQLDTEGVGSLGPGYEGRHIAMEK VASRTYRLRLEAARPGDAGTYRCLAKAYVRGSGTRLREAASARS RPLPVHVREEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRGGPP GLRLAASWWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGVAELGVRP GGGPVSVELVGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHAD YSWYQAGSARSGPVTVPYMHALDITLFLVPLLVGTGVALVTG ATVLGTITCCFMKRLRKR
Фрагмен т №3 белка IGSF8 (SEQ ID NO: 199)	REEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRGGPPGLRLAAS WWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGVAELGVRPGGGPVSVEL VGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQAGS ARSGPVTVPYMHALDITLFLVPLLVGTGVALVTGATVLGTITCC FMKRLRKR

Фрагмент белка №4 IGSF8 (SEQ ID NO: 200)	VALVTGATVLGTITCCFMKRLRKR
Белок IGSF8 - сигнальный пептид (SEQ ID NO: 201)	MGALRPTLLPPSLPLLLLLMLGMGCWA
Белок IGSF2 (SEQ ID NO: 202)	MAGISYVASFFLLLTkLSIGQREVTVQKGPLFRAEGYPVSiGCNVTGH QGPSEQHFQWSVYLPTNPTQEVQIISTKDAAFSYAVYTQVRVRSQDVY VERVQGNsvLLHISKLQMKDAGEYECHTPNTDEKYYGSYSAKTNLIV IPDTLSATMSSQTLGKEEGEPLALTCEASKATAQHThLSVTWYLTQD GGGSQATEIISLSKDFILVPGPLYTERFAASDVQLNKLGPttFRLSIERL QSSDQGGQLFCEATEWIQDPDETWMFITKKQTDQTTLRIQPAVKDFQV NITADSLFAEGKPLELVCLVSSGRDPQLQGIWFFNGTEIAHIDAGGV LGLKNDYKERASQGELQVSKLGPKAFSLKIFSLGPEDEGAYRCVVAE VMKTRTGSWQVLQRKQSPDSHVHLRKPAAARSVVMSTKNKQQVVWE GETLAFLCKAGGAESPLSVSWWHIPRDQTQPEFVAGMGQDGIVQLGA SYGVPSYHGNTREKMDWATFQLEITFTAITDSGTyECRVSEKSRNQ ARDLSWTQKISVTVKSLESSLQVSLMSRQPQVMLTNTFDLSCVVRAG YSDLKVPLTVTWQFQPASSHIFHQLIRITHNGTIEWGNFLSRFQKKTK VSQSLFRSQLLVHDATEEETGVYQCEVEVYDRNSLYNNRPPRASAISH PLRIAVTLPEskLVNSRSQVQELSINSNTDIECSILSRsNGNLQLAIW YFSPVSTNASWLKILEMDQTNVIKTGDEFHTPQRKQKFHTEKVSQDLF QLHILNVEDSDRGKYHCAVEEWLLSTNGTWHKLGEKKSGLTElKLK PTGSKVRVSKVYWTENVTEHREVAIRCSLESVGSSATLYSVMWYWN RENSGSKLLVHLQHDGLLEYGEEGLRRHLHCYRSSSTDFVLKLHQVE MEDAGMYWCRVAEWQLHGHPskWINQASDESQRMVLTVPSEPTL PSRICSSAPLLYFLFICPFVLLLLLLISLLCLYWKARKLSTLRsNTRKEK ALWVDLKEAGGVTTNRREDEEEDEGN

Белок IGSF3 (SEQ ID NO: 203)	MKCFPPVLSCLAVLGVVSAQRQVTVQEGPLYRTEGSHITIWCNVSGY QGPSEQNFQWSIYLPSSPEREVQIVSTMDSSFPYAIYTQRVRGGKIFIER VQGNSTLLHITDLQARDAGEYECHTPSTDKQYFGSYSAKMNLVVIPD SLQTTAMPQTLHRVEQDPLELTCEVASETIQHSHLSVAWLRQKVGEK PVEVISLSRDFMLHSSSEYAQRQSLGEVRLDKLGRTTFRLTIFHLQPSD QGEFYCEAAEWIQDPDGSWYAMTRKRSEGAVVNVQPTDKEFTVRLE TEKRLHTVGEPVEFRCLAEQNVPDRYFAVSWAFNSSLIATMGPNAV VLNSEFAHREARGQLKVAKESDSVFLKIYHLRQEDSGKYNCRVTER EKTVTGEFIDKESKRPKNIPHVLPLKSSISVEVASNASVILEGEDLRFSC SVRTAGRPQGRFSVIWQLVDRQNRRSNIMWLDRDGTVPQGSYWER SSFGGVQMEQVQPNFSLSLGFNSRKEDEGQYECHVTEWVRAVDGEW QIVGERRASTPISITALEMGFAVTAISRTPGVITYSDSFDLQCIKPHYPA WVPVSVTWRFQPVGTVEFHDLVTFTRDGGVQWGDRSSSFRTRTAIEK AESSNNVRLSISRASDTEAGKYQCVAELWRKNYNNTWTRLAERTSNL LEIRVLQPVTKLQVSKSKRTLTLVENKPIQLNCSVKSQTSQNSHFAVL WYVHKPSDADGKLILKTTHNSAFEYGTAAEEGLRARLQFERHVS GGGLFSLTVQRAEVSDSGSYCHVEEWLLSPNYAWYKLAEVSGRTEVT VQKQPDRLRLSQAQGNLSVLETRQVQLECVVLNRTSITSQLMVEWFW WVWVKNHPERETVARLSRDATFHYGEQAANKNLKGRHLHLESPSPGVYRLF FIQNVAVQDSGTYSCHVEEWLPSPSGMWYKRAEDTAGQTALTVMRPD DASLQVDTVVPNATVSEKAAFQLDCSIVSRSSQDSRFVAVWYSLRTKA KAGGKRSSPGLEEQUEEEEEEEEEEDDDDDPTERTALLSVGPDAVFGP PVEGSPWEGRLRFQRLSPVLYRLTVLQASPQDTGNYSCHVEEWLPSQK QKEWYRLTEESAPIGIRVLDTSPTLQSIICSNDALFYFVFFYPFIFGILIITI ITILLVRFKSRNSSKNSDGKNGVPLLWIKEPHLNYSPTCLEPPVLSIH PGAID
---------------------------------------	---

Белок ATP1A1 (SEQ ID NO: 204)	MGKGVGRDKYEPAAVSEQGDKKGKKGKKDRDMDELKKEVSMDDH KLSLDELHRKYGTDLSRGLTSARAAEILARDGPNALTPPPTTPEWIKF CRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSIQAATEEEPQNDNLYLGVVLSAVV IITGCFSYQEAKESSKIMESFKNMVPQQALVIRNGEKMSINAEVVG DLVEVKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDFTNENPL ETRNIAFFSTNCVEGTARGIVVYTGDRITVMGRIATLASGLEGGQTPIA AEIEHFIHITGVAVFLGVSFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLL ATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQN RMTVAHMFWDNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLALSRIAGLCNR AVFQANQENLPILKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYAKI VEIPFNSTNKYQLSIHKNPNTSEPQHLLVMKGAPERILDRCSSILLHGK EQPLDEELKDAFQNAYLELGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFDTD DVNFPIDNLCFVGLISMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPIT AKAIAKGVGIISEGNETVEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVVHGSDLK DMTSEQLDDILKYHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGV NDSPALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGR LIFDNLKKSIAYTLTSNIPEITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCIDLGDMVPA ISLAYEQAESDIMKRQPRNPKTDLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFF TYFVILAENGFLPIHLLGLRVDWDDRWINDDVEDSYGQQWTYEQRKIV EFTCHTAFFVSIVVVQWADLVICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFEET ALAAFLSYCPGMGVALRMYPLKPTWWFCAPYSLLIFVYDEVKLIIR RRPGGWVEKETYY
Белок ATP1A2 (SEQ ID NO: 205)	MGRGAGREYSPAATTAENGGGKKKQKEKELDELKKEVAMDDHKLS LDELGRKYQVDLSKGLTNQRAQDVLARDGPNALTPPPTTPEWVKFC RQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAMEDEPSNDNLYLGVVLAAVVI VTGCFSYQEAKESSKIMDSFKNMVPQQALVIREGEKMQINAEVVG DLVEVKGGDRVPADLRIISSHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPEFTHENPL ETRNI

Белок ATP1A3 (SEQ ID NO: 206)	CFFSTNCVEGTARGIVIATGDRTVMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIEHF IQLITGVAVFLGVSFFVLSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVT VCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTV AHMWFDNQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTALSRIAGLCNRAVFK AGQENISVSKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMRDRNPKVAEIPF NSTNKYQLSIHEREDSPQSHVLVMKGAPERILDRCSTILVQGKEIPLDK EMQDAFQNAYMELGGLGERVLGFCQLNLPSGKFPRGFKFDTDELNFP TEKLCFVGLMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAI AKGVGIISEGNETVEDIAARLNIPMSQVNPREAKACVVHGSDLKDMT SEQLDEILKNHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSP ALKKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDN LKKSIAYTLTSNIPEITPFLLFIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMPAISLA YEAESDIMKRQPRNSQTDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYF VILAENGFLPSRLLGIRLDWDDRTMNDLEDSYGQEWTYEQRKVVEFT CHTAFFASIVVQWADLICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLLEETALA AFLSYCPGMGVALRMYPLKVTWWFCAFPYSLLIFIYDEVKLLILRRYP GGWVEKETYY
--	--

Белок	MGSGGSDSYRIATSQDKKDDKDSPKKNKGKERRDLDDLKKEVAMTE
ATP1A4	HKMSVEEVCRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTPPPTTPEWV
(SEQ ID	KFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNLYLGIVLAAV
NO: 207)	VIITGCFSSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEKMQVNAEEVV
	VGDLVEIKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDCTHD
	NPLETRNITFFSTNCVEGTARGV VVATGDRTVMGRIATLASGLEVGK
	TPIAIEIEHFIQLITGVAVFLGVSFILSLILGYTWLEAVIFLIGIIVANVPE
	GLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTL
	TQNRMTVAHMFWDNQIHEADTTEDQSGTSFDKSSHTWVALSHIAGL
	CNRAVFKGGQDNIPVLKRDVAGDASESALLKCIELSSGSVKLMRERN
	KKVAEIPFNSTNKYQLSIHETEDPNDNRYLLVMKGAPERILDRCSTILL
	QGKEQPLDEEMKEAFQNAYLELGGLGERVLGFCHYYLP EEQFPKGFA
	FDCDDVNFTTDNLCFVGLMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVT
	GDHPITAKAIAKGVGIHSEGNETVEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVIH
	GTDLKDFTSEQIDEILQNHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVT
	GDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGV
	EEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLLFIMANIPLPLGTITILCIDLGTD
	MVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPRTDKLVNERLISMAYGQIGMIQAL
	GGFFSYFVILAENGFLPGNLVGIRLNWDDRTVNDLEDSYGQQWTYEQ
	RKVVEFTCHTAFFVSIVVVQWADLIICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGL
	FEETALAAFLSYCPGMDVALRMYPLKPSWWFCAFPYSFLIFVYDEIRK
	LILRRNPGGWVEKETYY

Белок ATP1B3 (SEQ ID NO: 208)	MGLWGKKGTVAPHDQSPRRRPKKGLIKKKMVKREKQKRNMEELKK EVVMDDHKL TLEELSTKYSVDLTKGHSHQRAKEILTRGGPNTVTPPP TTPEWVKFCKQLFGGFSLLLWTGAILCFVAYSIIQIYFNEEPTKDNLYLS IVLSVVVIVTGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRGGEKMQIN VQEVVLGDLVEIKGGDRVPADLRLISAQGCKVDNSSLTGESEPQSRSP DFTHENPLETRNICFFSTNCVEGTARGIVIATGDSTVMGRIASLTSGLA VGQTPIAAEIEHFIHLITVAVFLGVTFFALSLLLGYGWLEAIIIFLIGIIV ANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSD KTGTLTQNRMTVAHMFDMTVYEADTTEEQTGKTFTKSSDTWFML ARIAGLCNRADFKANQEILPIAKRATTGDASESALLKFIEQSYSSVAEM REKNPKVAEIPFNSTNKYQMSIHLREDSSQTHVLMMKGAPERILEFCS TFLLNGQEYSMNDEMKEAFQNAYLELGGLGERVLGFCFLNLPSSFSK GFPFNTDEINFPMDNLCFVGLISMIDPPRAAVPDAVSKCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAKGVGIIEGTETAEEVAARLKIPISKVDASAAKAIVV HGAELKDIQSKQLDQILQNHPEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRLGAVVA VTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTG VEEGR LIFDNLKKSIMYTLTSNIPEITPFLMFILGIPLPLGTITILCIDLGT DMVPAISLAYESAESDIMKRLPRNPKTDNLVNHRLIGMAYGQIGMIQ ALAGFFTYFVILAENGFRPVDLLGIRLHWEDKYLNLEDSEYQQWQTY EQRKVVEFTCQTAFVTIVVVQWADLIISKTRRNSLFQQGMRNKVLIF GILEETLLAAFLSYTPGMDVALRMYPLKITWWLCAIPYSILIFVYDEIR KLLIRQHPDGWVERETYY
Белок ATP2B1 (SEQ ID NO: 209)	MTKNEKKSLNQSLAEWKLFYINPTTGEFLGR TAKSWGLILLFYLVFY GFLAALFSFTMWVMLQTLNDEV PKYRDQIPSPGLMVFPKPVTALEYT FSRSDPTSYAGYIEDLKKFLKPYTLEEQKNLTVCPDGALFEQKGPVYV ACQFPISLLQACSGMNDPDFGYSQGNPCILVKMNRIIGLKPEGVPRIDC VSKNEDIPNVAVYPHNGMIDLYFPYYGKKLHVGYLQPLVAVQVSF APNNTGKEVTVECKIDGSANLKSQDDRDKFLGRVMFKITARA

Белок ATP2B2 (SEQ ID NO: 210)	MGDMANNSVAYSGVKNSLKEANHDGDFGITLAELRALMELRSTDAL RKIQESYGDVYGICTKLKTSPNEGLSGNPADLERREAVFGKNFIPPKP KTFLQLVWEALQDVTLIILEIAAIVSLGLSFYQPPEGDNALCGEVSUGE EEGEGETGWIEGAAILLSVVCVVLVTAFNDWSKEKQFRGLQSRIEQE QKFTVIRGGQVIQIPVADITVGDIQVKYGDLLPADGILIQGNDLKIDE SSLTGESDHVKKSLDKDPLLLSGTHVMEGSGRMVVTAVGVNSQTGII FTLLGAGGEEEEKKDEKKKEKKKQDGA IENRNKAKAQDGAAME MQPLKSEEGGDGDEKDKKKANLPKKEKSVLQGKLTCLAVQIGKAGL LMSAITVILVLYFVIDTFWVQKRPWLAECTPIYIQYFVKFFIIGVTVLV VAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMKDNNLVRHLDACETMGNATAICS DKTGTLTMNRMTVVQAYINEKHKKVPEPEAIPPNILSYLVTGISVNC AYTSKILPPEKEGGLPRHVGKTECALLGLLLDLKRDYQDVRNEIPEE ALYKVYTFNSVRKSMSTVLKNSDGSYRIFSKGASEIILKKCFKILSANG EAKVFRPRDRDDIVKTVIEPMASEGLRTICLAFRDFPAGEPEPEWDNE NDIVTGLTCIAVVGIEDPVRPEVPDAIKKCQRAGITVRMVTGDNINTA RAIATKCGILHPGEDFLCLEGKDFNRRIRNEKGEIEQERIDKIWPKL RV LARSSPTDKHTLVKGIIDSTVSDQRQVVAVTGDGTNDGPALKKADVG FAMGIAGTDVAKEASDIILTDDNFTSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQ LTVNVVAVIVAFTGACITQDSPLKAVQMLWVNLIMDTLASLALATEP PTESLLLRKPYGRNKPLISRTMMKNILGHAFYQLVVVFLLFAGEKFF DIDSGRNAPLHAPPSEHYTIVFNTFVLMQLFNEINARKIHGERNVFEGI FNNAIFCTIVLGTFFVQIIIVQFGGKPFSCSELSIEQWLWSIFLGMGTLL WGQLISTIPTSRKFLKEAGHGTQKEEIP EEELAE DVEEIDHAERELRR GQILWFRGLNRIQTQMDVVNAFQSGSSIQ GALRRQPSIASQHHDVTNI STPTHIRVVNAFRSSLYEGLEKPESRSSIHNFMTHPEFRIEDSEPHIPLID DTDAEDDAPTKRNSPPPPSPNKNNNAVDSGIH LTIEMNKSATSSSPGSP LHSLETSL
--	---

Белок ATP2B3 (SEQ ID NO: 211)	MGDMTNSDFYSKNQRNESSHGGEFGCTMEELRSLMELRGTEAVVKI KETYGDTEAICRRLKTSPVEGLPGTAPDLEKRKQIFGQNFIPPKPKTF LQLVWEALQDVTLLILEIAAIIISLGLSFYHPPGEGNEGCATAQGGAEDE GEAEAGWIEGAAILLSVICVVLVTAFNDWSKEKQFRGLQSRIEQE QKF TVVRAGQVVQIPVAEIVVGDIAQVKYGDLLPADGLFIQGNDLKIDESS LTGESDQVRKSVDKDPMLLSGTHVMEGSGRMLVTAVGVNSQTGIIFT LLGAGGEEEEKKDKKGVKKGDGLQLPAADGAAASNAADSANASLV NGKMQDGNVDASQSKAKQQDGAAAMEMQPLKSAEGGDADDRKKA SMHKKEKSVLQGKLTCLAVQIGKAGLVMSAITVIII VLYFTVDTFVV NKKPWLPECTPVYVQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSV KKMMKDNNLVRHLDACETMGNATAICSDKTGTLTTNRMTVVQAYV GDVHYKEIPDPSSINTKTMELLINAIAINSAYTTKILPPEKEGALPRQVG NKTECGLLGFVLDLKQDYEPVRSQMPEEKLYKVYTFNSVRKSMSTVI KLPDESEFRMYSGASEIVLKKCKILNGAGEPRVFRPRDRDEMVKKVI EPMACDGLRTICVAYRDFPSSPEPDWDNENDILNELTCICVVGIEDPV RPEVPEAIRKCQRAGITVRMVTGDNINTARAIKCGIIHPGEDFLCLE GKEFNRRIRNEKGEIEQERIDKIWPKLRVLARSSPTDKHTLVKGIIDST HTEQRQVVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDIIL TDDNFSSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAVIVAFTGACIT QDSPLKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEPPTETLLLRKPYGRNKPLIS RTMMKNILGHAVYQLALIFTLLFVGEKMFQIDSGRNAPLHSPPEHYT IIFNTFVMMQLFNEINARKIHGERNVFDGIFRNPIFCTIVLGTFAIQIVIV QFGGKPFSCSPLQLDQWMWCIFIGLGELVWGQVIATIPTSRLKFLKEA GRLTQKEEIPPEELNEDVEEIDHAERELRRGQILWFRGLNRIQTQIEVV NTFKSGASFQALRRQSSVTSQSQDIRVVKAFRSSLYEGLEKPESTRSI HNFMAHPEFRIEDSQPHIPLIDDTDLEEDAALKQNSSPPSSLNKNNSAI DSGINLTDTSTKSATSSSPGSPHISLETSL
--	---

Белок ATP2B4 (SEQ ID NO: 212)	MGDMANSSIEFHPPKQQQRDVPQAGGFGCTLAELRTLMELRGAEAL QKIEEAYGDVSGLCRRLKTSPTTEGLADNTNDLEKRRQIYGQNFIPPKQ PKTFLQLVWEALQDVTLLILEVAAIVSLGLSFYAPPGESEACGNVSGG AEDEGEAEAGWIEGAAILLSVICVVLVTAFNDSKEKQFRGLQSRIEQ EQKFTVIRNGQLLQVPVAALVVGDIQVKYGDLLPADGVLIQANDLK IDESSLTGESDHVRKSADKDPMLLSGTHVMEGSGRMVVTAVGVNSQ TGIIFTLLGAGGEEEEKKDKKGKQQDGAMESSQTKAKKQDGAVAME MQPLKSAEGGEMEEREKKKANAPKKEKSVLQGKLTCLAVQIGKAGL VMSAITVILVLYFVIETFVVEGRTWLAECTPVYVQYFVKFFIIGVTVL VVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMKDNNLVRHLDACETMGNATAIC SDKTGTLTTNRMTVVQSYLGDTHYKEIPAPSALTPKILDLLVHAISINS AYTTKILPPEKEGALPRQVGNKTECALLGFVLDLKRDFQPVREQIPED KLYKVYTFNSVRKSMSTVIRMPDGGFRLFSKGASEILLKKCTNILNSN GELRGFRPRDRDDMVRKIIPEMACDGLRTICIAYRDFSAGQEPDWDN ENEVVGDLTCIAVVGIEDPVRPEVPEAIRKCQRAGITVRMVTGDNINT ARAIAAKCGIIQPGEDFLCLEGKEFNRRIRNEKGEIEQERLDKVWPKLR VLARSSPTDKHTLVKGIIDSTTGEQRQVVAVTGDGTNDGPALKKADV GFAMGIAGTDVAKEASDIILTDDNFTSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQF QLTVNVVAVIVAFTGACIT
--	---

[0299] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает базигин (белок BSG), представленный SEQ ID NO: 3. Белок BSG также известен как 5F7, фактор стимуляции коллагеназы, индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса (EMMPRIN), антиген активации лейкоцитов М6, антиген группы крови ОК, фактор стимуляции коллагеназы опухолевых клеток (TCSF) или CD147. Номер в базе данных Uniprot белка BSG человека: P35613. Сигнальный пептид белка BSG представляет собой аминокислоты с 1 по 21 из SEQ ID NO: 3. Аминокислоты 138–323 из SEQ ID NO: 3 представляют собой внеклеточный домен, аминокислоты с 324 по 344 представляют собой трансмембранный домен, а аминокислоты с 345 по 385 из SEQ ID NO: 3 представляют собой цитоплазматический домен.

[0300] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около

100% идентична аминокислотам 22–385 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления фрагменты полипептида BSG лишены одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV, например, аминокислот 221–315 из SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 193, 194 или 195. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, 194 или 195, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, 194 или 195 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 193, 194 или 195.

[0301] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает члена суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IgSF8 или белок IGSF8), который также известен как партнер 3 CD81, белок 2, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-2), кератиноцит-ассоциированный трансмембранный белок 4 (KCT-4), LIR-D1, подобный регулятору простагландина белок (PGRL) или CD316. Полноразмерный белок IGSF8 человека имеет номер доступа в базе данных Uniprot Q969P0 и показан как SEQ ID NO: 4 в данном документе. Белок IGSF8 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 27 из SEQ ID NO: 4), внеклеточный домен (аминокислоты 28–579 из SEQ ID NO: 4), трансмембранный домен (аминокислоты с 580 по 600 из SEQ ID NO: 4) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 601 по 613 из SEQ ID NO: 4).

[0302] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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

мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична аминокислотам 28–613 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления белок IGSF8 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200. В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200.

[0303] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает члена суперсемейства 3 иммуноглобулинов (IgSF3 или белок IGSF3), который также известен как белок 3, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-3), и представлен в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 203. Белок IGSF3 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 19 из SEQ ID NO: 203), внеклеточный домен (аминокислоты 20–1124 из SEQ ID NO: 203), трансмембранный домен (аминокислоты с 1125 по 1145 из SEQ ID NO: 203) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 1146 по 1194 из SEQ ID NO: 203).

[0304] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична аминокислотам 28–613 SEQ ID NO: 203. В некоторых вариантах

осуществления белок IGSF3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0305] В других аспектах каркасный белок представляет собой белок IGSF2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 202 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок IGSF2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0306] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по включает интегрин-бета-1 (белок ITGB1), также известный как бета-субъединица рецептора фибронектина, гликопротеин IIa (GPIIa), бета-субъединица VLA-4 или CD29, и приведен в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. Белок ITGB1 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 20 из SEQ ID NO: 5), внеклеточный домен (аминокислоты 21–728 из SEQ ID NO: 5), трансмембранный домен (аминокислоты с 729 по 751 из SEQ ID NO: 5) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 752 по 798 из SEQ ID NO: 5).

[0307] В других вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична аминокислотам 21–798 SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления белок ITGB1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0308] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ITGA4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 6 без сигнального пептида (аминокислоты с 1 по 33 из SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления белок ITGA4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0309] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок SLC3A2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 7 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок SLC3A2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0310] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP1A1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 204 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP1A1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0311] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP1A2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 205 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP1A2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0312] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP1A3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 206 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP1A3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0313] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP1A4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 207 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP1A4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0314] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP1B3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 208 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP1B3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0315] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP2B1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 209 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP2B1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0316] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP2B2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 210 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок ATP2B2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0317] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок ATP2B3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 211 без сигнального пептида. В

некоторых вариантах осуществления белок АТР2В3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0318] В других вариантах осуществления каркасный белок представляет собой белок АТР2В4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 212 без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления белок АТР2В4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0319] Неограничивающие примеры других каркасных белков можно найти в патенте США № US10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который полностью включен посредством ссылки.

[0320] В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент каркасного белка, в котором отсутствует по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот от N-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент каркасного белка, в котором отсутствует по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот от C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент каркасного белка, в котором отсутствует по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот как от N-конца, так и от C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления

последовательность кодирует фрагмент каркасного белка, в котором отсутствует один или более функциональных или структурных доменов нативного белка.

II.C.2. Заякоренные в просвете каркасные белки

[0321] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок (например, каркас Y) взаимодействует с поверхностью просвета мембраны BB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок прикреплен к поверхности просвета мембраны BB. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен», при этом ND и/или ED ассоциированы с поверхностью просвета BB, например, экзосомы.

[0322] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит внутриклеточный (просветный) домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, где AAV связан с внеклеточным доменом каркасного белка, и при этом внутриклеточный (просветный) домен каркасного белка взаимодействует с поверхностью просвета мембраны BB. В некоторых осуществления каркасный белок прикреплен к поверхности просвета мембраны BB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по настоящему изобретению содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен; причем внутриклеточный домен содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен», при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета BB, например, экзосомы.

[0323] В некоторых аспектах каркасы по настоящему изобретению могут быть ассоциированы с поверхностью просвета BB, 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 поверхностью просвета BB, а ED ассоциирован с поверхностью просвета BB 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.

[0324] В других вариантах осуществления каркасный белок (например, внутриклеточный (просветный) домен каркасного белка) содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с просветной поверхностью BB, а ED ассоциирован с просветной поверхностью BB 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.

[0325] В других вариантах осуществления ED дополнительно содержит одну или более 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 вариантах осуществления 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).

[0326] В некоторых аспектах ND ассоциирован с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством липидирования, например, посредством миристоилирования. В некоторых аспектах ND имеет Gly на N-конце. В некоторых аспектах N-концевой Gly является миристоилированным.

[0327] В некоторых аспектах ED ассоциирован с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых аспектах ED ассоциирован с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатическое взаимодействие.

[0328] 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 аспектах основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, при этом n является целым числом от 1 до 10.

[0329] В некоторых варианты осуществления ED содержит (i) лизиновый повтор в ED или (ii) лизиновый повтор в ND, например, K на C-конце в ND и K на N-конце в ED, при этом ND и ED связаны непосредственно, т.е. пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления минимальное количество аминокислот, которые способны заякоривать гетерологичный фрагмент, например, биологически активную молекулу, в просвете BB, например, экзосомы, составляет, например, от около семи до около 15, от около семи до около 14, от около семи до около 13, от около семи до около 12, от около семи до около 11, от около семи до около 10, от около семи до около 9 или от около семи до около 8 аминокислотных фрагментов.

[0330] 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. В некоторых вариантах осуществления ED содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд.

[0331] В некоторых аспектах ED содержит K, KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), R, RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ED содержит Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) 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 выбирают из группы, состоящей из Lys, Arg и His. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах X4 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met.

[0332] В некоторых аспектах 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, 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, и где ED связан с X6 с помощью пептидной связи и содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED.

[0333] В некоторых аспектах ND каркасного белка Y, 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 любую 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.

[0334] В некоторых аспектах аминокислоту X3 выбирают из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0335] В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых аспектах 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 линкеров могут быть связаны в тандеме. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предотвращают/уменьшают стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более участков, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены 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.

[0336] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, 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.

[0337] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин/сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$ (SEQ ID NO: 46), где n является целым числом от 1 до 100, а m является целым числом от 1 до 100. В других аспектах глицин/сериновый линкер представляет собой линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$ (SEQ ID NO: 47), где x является целым числом от 1 до 4, y равно 0 или 1, а z является целым числом от 1 до 50.

В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность Gn (SEQ ID NO: 48), где n может являться целым числом от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность (GlyAla)n (SEQ ID NO: 49), где n является целым числом от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность (GlyGlySer)n (SEQ ID NO: 50), где n является целым числом от 1 до 100.

[0338] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не слит 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).

[0339] 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.

[0340] В настоящем изобретении также предложена выделенная BB, например, экзосома, содержащая биологически активную молекулу, связанную с каркасным белком, где каркасный белок включает ND—ED, где: а. ND включает G:X2:X3:X4:X5:X6; при этом: 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 любую 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; и с. ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), которые связаны с X6 посредством пептидной связи или одной или более аминокислотами, или (ii) по меньшей мере один лизин, который непосредственно связан с X6 посредством пептидной связи.

[0341] В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают 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 выбирают 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.

[0342] В некоторых аспектах ED в каркасном белке содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

[0343] В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20) или (v) любой их комбинации.

[0344] В некоторых аспектах ND в каркасном белке содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 51), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 52), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 53), (iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 54), или (v) любой их комбинации и ED в каркасном белке содержит (i) K, KK, KKK, KKKG (SEQ ID NO: 55), KKKGY (SEQ ID NO: 56), KKKGYN (SEQ ID NO: 57), KKKGYNV (SEQ ID NO: 58), KKKGYNVN (SEQ ID NO: 59), KKKGYS (SEQ ID NO: 60), KKKGYG (SEQ ID NO: 61), KKKGYGG (SEQ ID NO: 62), KKKGS (SEQ ID NO: 63), KKKGSG (SEQ ID NO: 64), KKKGSG (SEQ ID NO: 65), KKKGSGS (SEQ ID NO: 66), KKKS (SEQ ID NO: 67), KKKS (SEQ ID NO: 68), KKKS (SEQ ID NO: 69), KKKS (SEQ ID NO: 70), KKKS (SEQ ID NO: 71), KKKS (SEQ ID NO: 72), KKKS (SEQ ID NO: 73), и KRFSFKKS (SEQ ID NO: 74).

[0345] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка по настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20) или (v) любой их комбинации.

[0346] В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22),

(ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29), и (ix) любой их комбинации.

[0347] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка по настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29) и (ix) любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд.

[0348] В некоторых аспектах длина каркасного белка, составляет по меньшей мере приблизительно 8, по меньшей мере приблизительно 9, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 11, по меньшей мере приблизительно 12, по меньшей мере приблизительно 13, по меньшей мере приблизительно 14, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 16, по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 19, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 21, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 23, по меньшей мере приблизительно 24, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 26, по меньшей мере приблизительно 27, по меньшей мере приблизительно 28, по меньшей мере приблизительно 29, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 31, по меньшей мере приблизительно 32, по меньшей мере приблизительно 33, по меньшей мере приблизительно 34, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 36, по меньшей мере приблизительно 37, по меньшей мере приблизительно 38, по меньшей мере приблизительно 39, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 41, по меньшей мере приблизительно 42, по меньшей мере приблизительно 43, по меньшей мере приблизительно 44, по меньшей мере приблизительно 45, по меньшей мере приблизительно 46, по меньшей мере приблизительно 47, по меньшей мере приблизительно 48, по меньшей мере приблизительно 49, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 55, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 65, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно

[illegible]

[0349] В некоторых аспектах длина каркасного 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.

[0350] В некоторых аспектах, каркасный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSKKKKKGYS GG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSKKKKKSGGGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

[0351] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка по настоящему изобретению состоит из (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSKKKKKGYS GG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSKKKKKSGGGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

[0352] Неограничивающие примеры каркасного белка, применимого в контексте настоящего изобретения, перечислены ниже. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок состоит из аминокислотной последовательности, представленной в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4. Иллюстративные каркасные белки

SEQ ID NO:	Каркасный белок: GX2X3X4X5X6-ED
75	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAA
76	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGA

77	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEG
78	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAE
79	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA
80	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK
81	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
82	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD
83	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEK
84	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
85	GGKLSKKKKGYNVNDEKAK
86	GGKLSKKKKGYNVNDEKA
87	GGKLSKKKKGYNVNDEK
88	GGKLSKKKKGYNVNDE
89	GGKLSKKKKGYNVND
32	GGKLSKKKKGYNVN
90	GGKLSKKKKGYNV
91	GGKLSKKKKGYN
92	GGKLSKKKKGY
93	GGKLSKKKKG
94	GGKLSKKKK
22	GGKLSKKK
17	GGKLSKK
95	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
96	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
97	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
98	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
99	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
100	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
101	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK
102	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSF
103	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFS
104	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGF
105	GAKKSKKRFSFKKSFKLSG
106	GAKKSKKRFSFKKSFKLS
107	GAKKSKKRFSFKKSFKL

108	GAKKSKKRFSFKKSFK
109	GAKKSKKRFSFKKSF
42	GAKKSKKRFSFKKS
110	GAKKSKKRFSFKK
111	GAKKSKKRFSFK
112	GAKKSKKRFSF
113	GAKKSKKRFS
114	GAKKSKKRF
115	GAKKSKKR
116	GAKKSKK
117	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
118	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
119	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
120	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
121	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
122	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
123	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFK
124	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSF
125	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFS
126	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGF
127	GAKKAKKRFSFKKSFKLSG
128	GAKKAKKRFSFKKSFKLS
129	GAKKAKKRFSFKKSFKL
130	GAKKAKKRFSFKKSFK
131	GAKKAKKRFSFKKSF
132	GAKKAKKRFSFKKS
133	GAKKAKKRFSFKK
134	GAKKAKKRFSFK
135	GAKKAKKRFSF
136	GAKKAKKRFS
137	GAKKAKKRF
138	GAKKAKKR
139	GAKKAKK
140	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKK

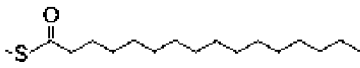
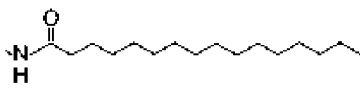
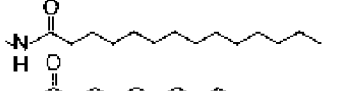
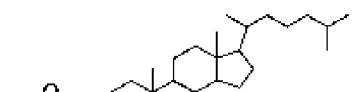
141	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK
142	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSF
143	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFS
144	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGF
145	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSG
146	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLS
147	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKL
148	GAQESKKKKKKRFSFKKSFK
149	GAQESKKKKKKRFSFKKSF
150	GAQESKKKKKKRFSFKKS
151	GAQESKKKKKKRFSFKK
152	GAQESKKKKKKRFSFK
153	GAQESKKKKKKRFSF
154	GAQESKKKKKKRFS
155	GAQESKKKKKKRF
156	GAQESKKKKKKR
157	GAQESKKKKKK
158	GAQESKKKKK
159	GAQESKKKK
160	GAQESKKK
161	GAQESKK
162	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK
163	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNR
164	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRN
165	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKR
166	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFK
167	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSF
168	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLS
169	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGL
170	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSG
171	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLS
172	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKL
173	GSQSSKKKKKKFSFKKPFK
174	GSQSSKKKKKKFSFKKPF

175	GSQSSKKKKKKFSFKKP
176	GSQSSKKKKKKFSFKK
177	GSQSSKKKKKKFSFK
178	GSQSSKKKKKKFSF
179	GSQSSKKKKKKFS
180	GSQSSKKKKKKF
181	GSQSSKKKKKK
182	GSQSSKKKKK
183	GSQSSKKKK
184	GSQSSKKK
185	GSQSSKK

[0353] В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению не содержит N-концевой Met. В некоторых аспектах каркасный белок содержит липидированную аминокислоту, например, миристоилированную аминокислоту, на N-конце каркасного белка, которая функционирует как липидный якорь. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly. Присутствие N-концевого Gly является абсолютным 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.

[0354] В других аспектах липидный якорь может представлять собой любой липид, Якорь известный из уровня 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 5: Группы модификаций

Модификация	Группа модификации
S-пальмитоилирование	
N-пальмитоилирование	
N-миристоилирование	
O-ацилирование	
Фарнезилирование	
Геранилгеранилирование	
Холестерин	

[0355] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок выбран из группы, состоящей из MARCKS, MARKSL1, BASP1, любого их функционального фрагмента, варианта или производного или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок включает белок Sgc или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит последовательность, описанную, например, в патенте США № 9611481, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

ТАБЛИЦА 6. Иллюстративные последовательности каркасных белков

Белок	Последовательность
Белок MARCKS (SEQ ID NO: 8)	MGAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVASSPSKANGQENGHVKNVNGDAS PAAAESGAKEELQANGSAPAADKEEPAAAGSGAASPSAAEKGEPA AAPEAGASPVEKEAPAEGEAAEPGSPTAAEGEAASAASSTSSPKAEDG ATPSPSNETPKKKKKRFSFKKSLGFSFKKNKKEAGEGGEAEAPAA EGGKDEAAGGAAAAAAEAGAASGEQAAAPGEEAAAGEEGAAGGDP QEAKPQEAAVAPEKPPASDETKAAEPPSKVEEKKAEEAGASAAACEA PSAAGPGAPPEQEAPAEPPAAAAASSACAAPSQEAQPECSPEAPPAE AAE
Белок MARKSL1	MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGDLSPKGEG ESPPVNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAEAKGEVPPKETPKKKKKFSF

(SEQ ID NO: 9)	KKPFKLSGLSFKRNRKEGGGDSSASSPTEEEQEQQGEIGACSDGTAQEG KAAATPESQEPQAKGAEASAASEEEEAGPQATEPSTPSGPESGPTPASAE QNE
Белок BASP1 (SEQ ID NO: 10)	MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDCKKAEGAATEEEGTPKESEPQAAA EPAAEAKGKEKPDQDAEGKAEKEGEKDAAAAGEEAPKAEPKTEGA AEAKAEPPKAPEQEQAAPGPAAGGEAPKAAEAAAAPAESAAPAAGEE PSKEEGEPKKTEAPAAPAAQETKSDGAPASDSKPGSSEAAPSSKETPAA TEAPSSTPKAQGPAASAEERPVEAPAAANSQTVTVKE

[0356] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок по настоящему изобретению включает 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 аспектах каркасный белок по настоящему изобретению включает зрелый белок MARCKS (т.е. без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению 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.

[0357] В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению содержит белок MARCKSL1 (номер доступа в Uniprot P49006), также известный как MARCKS-подобный белок 1, и субстрат макрофагальной миристилированной богатой аланином С-киназы. Полноразмерный белок MARCKSL1 человека имеет длину 195 аминокислот. Белок MARCKSL1 имеет эффекторный домен, участвующий в связывании липидов и кальмодулина в аминокислотных остатках 87-110. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению включает зрелый белок MARCKSL1 (т.е. без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению 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.

[0358] В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению включает 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 аспектах каркасный белок по настоящему изобретению включает зрелый белок BASP1 (т.е. без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению 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.

[0359] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности со зрелой формой SEQ ID NO: 8 (MARCKS), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности с функциональным фрагментом зрелой формы SEQ ID NO: 8 (MARCKS), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 8.

[0360] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности со зрелой формой SEQ ID NO: 9 (MARCKSL1), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности с функциональным фрагментом зрелой формы SEQ ID NO: 9 (MARCKSL1), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 9.

[0361] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности со зрелой формой SEQ ID NO: 10 (BASP1), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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% или на около 100% идентичности последовательности с функциональным фрагментом зрелой формы SEQ ID NO: 10 (BASP1), то есть без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 10.

II.C.3. Слитые конструкции каркасных белков

[0362] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с одним или более гетерологичными белками. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с N-концом каркасных фрагментов. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков связаны как с N-концом, так и с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека.

[0363] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок можно использовать для связывания любого фрагмента с поверхностью просвета и/или внешней поверхностью экзосомы. Например, полипептид PTGFRN можно использовать для связывания AAV, например, капсидного белка AAV, внутри просвета (например, на поверхности просвета) в дополнение к внешней поверхности ВВ, например, экзосомы. Следовательно, в некоторых

вариантах осуществления каркасный белок может использоваться для двойных целей, например, AAV на поверхности просвета и вторая полезная нагрузка на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы, или AAV на внешней поверхности экзосомы, и вторая полезная нагрузка на поверхности просвета ВВ, например, экзосомы.

[0364] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с AAV, например, капсидным белком AAV, посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер включает по меньшей мере около 2 аминокислот, по меньшей мере около 3 аминокислот, по меньшей мере около 4 аминокислот, по меньшей мере около 5 аминокислот, по меньшей мере около 6 аминокислот, по меньшей мере около 7 аминокислот, по меньшей мере примерно 8 аминокислот, по меньшей мере около 9 аминокислот, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 11 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 13 аминокислот, по меньшей мере около 14 аминокислот, по меньшей мере около 15 аминокислот, по меньшей мере около 16 аминокислот, по меньшей мере около 17 аминокислот, по меньшей мере около 18 аминокислот, по меньшей мере около 19 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 25 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 35 аминокислот, по меньшей мере около 40 аминокислот, по меньшей мере около 45 аминокислот, или по меньшей мере около 50.

[0365] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера, а AAV, например, капсидный белок AAV, связан с соответствующим партнером по связыванию. В этих вариантах осуществления каркасный белок и AAV, например, капсидный белок AAV, связываются друг с другом в присутствии химического вещества, которое индуцирует димеризацию партнеров по связыванию. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию связан с просветным доменом каркасного белка.

[0366] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию, связанный с каркасным белком, выбран из одного партнера по связыванию химически индуцированного димера, выбранного из группы, состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737); где AAV, например, капсидный белок AAV, связан с соответствующим партнером по связыванию, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления каркасный белок связан с FKBP. В определенных вариантах осуществления каркасный белок связан с FRB. В некоторых вариантах осуществления FRB представляет собой FRB mTOR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с кальциневрином A. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GyrB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GAI. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GID1. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с Snap-tag. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с eDHFR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с BCL-xL. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с Fab.

[0367] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FKBP, а капсидный белок AAV связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FRB, а капсидный белок AAV связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FKBP, а капсидный белок AAV связан с FRB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с кальциневрином A, а капсидный белок AAV связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FKBP, а каркасный белок AAV связан с кальциневрином A. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с CyP-Fas, а капсидный белок AAV связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FKBP, а капсидный белок AAV связан с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GyrB, а капсидный белок AAV связан с GyrB. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GAI, а капсидный белок AAV связан с GID1. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с GID1, а капсидный белок AAV связан с GAI. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с Snap-тегом, а капсидный белок AAV связан с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления

каркасный белок связан с HaloTag, а капсидный белок AAV связан с Snap-tag. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с eDHFR, а каркасный белок AAV связан с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с HaloTag, а каркасный белок AAV связан с eDHFR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с BCL-xL, а каркасный белок AAV связан с Fab (AZ1). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с Fab (AZ1), а капсидный белок AAV связан с BCL-xL.

[0368] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с аффинным агентом. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с доменом просвета каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент включает полипептид, связывающий AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент включает рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент содержит антитело или антигенсвязывающий домен, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связывается с одним или более капсидными белками AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более капсидных белков AAV представляют собой белки, активирующие сборку AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент не связывается с мономером капсидного белка AAV.

[0369] В некоторых вариантах осуществления взаимодействие между аффинным агентом и AAV является временным. В некоторых вариантах осуществления AAV диссоциирует от аффинного агента при определенных условиях. В определенных вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от pH. В некоторых вариантах осуществления AAV диссоциирует от аффинного агента при pH по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11 или по меньшей мере около 12. В некоторых вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от концентрации кальция, магния, сульфата, фосфата или любой их комбинации в растворе, содержащем AAV и аффинный агент. В некоторых вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от концентрации соли и/или ионной силы раствора, содержащего AAV и аффинный агент. В некоторых вариантах осуществления AAV и аффинный агент диссоциируют в восстанавливающих условиях.

[0370] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан со связывающим AAV полипептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с доменом просвета каркасного белка.

[0371] В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, содержит «антигенсвязывающий домен». В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает мышинное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает химерное антитело (например, моноклональное антитело мыши/человека, мыши/примата или примата/человека) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент верблюжьего антитела, IgNAR акулы или антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает верблюжье антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает однодоменное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает IgNAR акулы или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0372] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает (scFv)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab'. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab1)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает

dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечный Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает фрагмент Fd.

[0373] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает диатело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает миниантитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает связанный с антителом полипептид. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит наноантитело.

[0374] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с рецептором. В некоторых вариантах осуществления рецептор связывает AAV, например, связывающий AAV пептид представляет собой рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с просветным доменом каркасного белка.

[0375] В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой рецептор AAV или его фрагмент (см., например, Pillay et al., Nature 530(7588):108-12 (2016), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Любой рецептор AAV, известный в данной области техники, или его AAV-связывающий фрагмент могут быть связаны с каркасными белками, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV представляет собой рецептор AAV, кодируемый геном KIAA0319L, например, рецептор AAV представляет собой AAVR (Pillay et al., 2016). AAVR представляет собой N-связанный гликозилированный белок с массой около 150 кДа. Полноразмерный AAVR представляет собой трансмембранный белок типа I, содержащий пять Ig-подобных доменов, называемых доменами поликистозной болезни почек (PKD). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD1 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD2 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD3 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD4 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD5 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1 и PKD2 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1,

PKD2, и PKD3 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1, PKD2, PKD3 и PKD4 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим домены PKD1, PKD2, PKD3, PKD4, PKD5 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD4. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD3. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD2. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD1. В некоторых вариантах реализации каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5 или домен PKD4. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5, домен PKD4 или домен PKD3. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, где фрагмент AAVR не содержит домен PKD5, домен PKD4, домен PKD3 или домен PKD2.

[0376] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с Fc-рецептором, а AAV, например, капсидный белок AAV, связан с Fc. В определенных вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор, выбранный из Fc-гамма-рецептора I (FcγR1), FcγRIIA, FcγRIIB, FcγIIIA и FcγIIIB; а Fc представляет собой Fc IgG. В определенных вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой FcγR1 s, а Fc представляет собой Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-альфа-рецептор I (FcαR1), и при этом Fc представляет собой Fc IgA. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-эпсилон-рецептор, выбранный из Fc-эпсилон I-рецептора (FcεRI) и FcεRII, и при этом Fc представляет собой Fc из IgE.

[0377] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с наноантителом; и AAV, например капсидный белок AAV, связан с константной областью иммуноглобулина (Fc). В некоторых вариантах осуществления наноантитело специфически связывается с Fc.

II.C.4. Дополнительные варианты ассоциации

[0378] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок и AAV, например, капсидный белок AAV, связаны через посредника. В некоторых вариантах осуществления

AAV, например, капсидный белок AAV, связан с Fc, а каркасный белок связан с Fc-рецептором, где Fc-рецептор каркасного белка связан с Fc AAV. В других вариантах осуществления AAV содержит антиген, и каркасный белок связан с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывает антиген AAV. В других вариантах осуществления AAV, например, капсидный белок AAV, связан с Fc, а каркасный белок связан с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывает Fc. В других вариантах осуществления каркасный белок связан с рецептором, причем AAV включает лиганд рецептора. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с рецептором AAV, причем рецептор AAV специфически взаимодействует с лигандом на AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV инкубируют с антителом или его фрагментом, например, с IgG, а каркасный домен связан с рецептором Fc, причем антитело или его фрагмент связывает AAV, а Fc-рецептор связывает Fc-часть антитела.

II.C.4.i. Лиганд – рецептор

[0379] В некоторых аспектах настоящего изобретения каркасный белок связан с рецептором, а AAV связан с лигандом. Можно использовать любую пару лиганд-рецептор, известную в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой Fc, а рецептор представляет собой Fc-рецептор. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан по меньшей мере с одним белком VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 5 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 4 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 3 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 2 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с 1 из белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP1, который не связан с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP1, которые не связаны с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP1, которые не связаны с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP1, которые не связаны с лигандом, например, Fc.

[0380] В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан по меньшей мере с одним белком VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 5 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 4 белков VP2 AAV. В некоторых

вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 3 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с каждым из 2 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления лиганд, например, Fc, связан с 1 из белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP2, который не связан с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP2, которые не связаны с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP2, которые не связаны с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP2, которые не связаны с лигандом, например, Fc.

[illegible]

[illegible]

[0382] В некоторых вариантах осуществления количество VP3, связанного с лигандом, например, Fc, в по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз, по меньшей мере около 50 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного белка VP3 не связан с лигандом, например, Fc.

[0383] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP2, связанный с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP2, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP2, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах

осуществления AAV содержит 4 белка VP2, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белка VP2, связанных с лигандом, например, Fc.

[0384] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP1, связанный с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP1, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP1, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP1, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP1, связанных с лигандом, например, Fc.

[0385] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP3, связанный с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP3, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP3, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP3, связанных с лигандом, например, Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP3, связанных с лигандом, например, Fc.

[0386] В некоторых вариантах осуществления AAV, например, капсидный белок AAV, связан с Fc, а каркасный белок связан с Fc-рецептором. Используемый в данном документе термин «Fc-рецептор» включает без ограничения фрагмент природного Fc-рецептора, где этот фрагмент сохраняет способность связываться с Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор, связанный с фрагментом каркаса, представляет собой Fc-гамма-рецептор, а Fc, связанный с AAV, представляет собой Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-гамма-рецептор выбран из Fc-гамма-рецептора I (FcγR1), FcγR2A, FcγR2B, FcγR3A и FcγR3B. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcγR1, а капсидный белок AAV связан с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcγR2A, а капсидный белок AAV связан с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcγR2B, а капсидный белок AAV связан с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcγR3A, а капсидный белок AAV связан с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcγR3B, а капсидный белок AAV связан с Fc IgG.

[0387] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с Fc-альфа-рецептором I (FcαR1), а капсидный белок AAV связан с Fc IgA.

[0388] В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-эпсилон-рецептор, выбранный из Fc-эпсилон I-рецептора (FcεR1) и FcεR2, и Fc

представляет собой Fc из IgE. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcεRI, а капсидный белок AAV связан с Fc IgE. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с FcεRII, а капсидный белок AAV связан с Fc IgE.

II.C.4.ii. Антиген – Антигенсвязывающий домен

[0389] В некоторых аспектах настоящего изобретения каркасный белок связан с антигенсвязывающим доменом, а AAV содержит антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает антиген на AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген на AAV представляет собой капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает VP1 на поверхности AAV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает VP2 на поверхности AAV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает VP3 на поверхности AAV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает как VP1, так и VP2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает как VP2, так и VP3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает как VP1, так и VP3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает VP1, VP2 и VP3.

[0390] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает антиген на AAV, при этом антиген на AAV не является природным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген гетерологично экспрессируется AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген присутствует в капсиде AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с белком AAV, например, капсидным белком.

[0391] В некоторых вариантах осуществления антиген связан по меньшей мере с одним белком VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 5 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 4 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 3 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 2 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с 1 из белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP1, который не связан с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP1, которые не связаны с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP1, которые не связаны с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP1, которые не связаны с антигеном.

[0392] В некоторых вариантах осуществления антиген связан по меньшей мере с одним белком VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 5 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 4 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 3 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с каждым из 2 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с 1 из белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP2, который не связан с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP2, которые не связаны с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP2, которые не связаны с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP2, которые не связаны с антигеном.

[illegible]

[0396] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP1, связанный с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP1, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP1, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP1, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP1, связанных с антигеном.

[0397] В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 1 белок VP3, связанный с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 2 белка VP3, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 3 белка VP3, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 4 белка VP3, связанных с антигеном. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит 5 белков VP3, связанных с антигеном.

[0398] В настоящем изобретении можно использовать любую пару антигенсвязывающий домен / антиген, известную в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой Fc, а антигенсвязывающий домен специфически связывает Fc. В некоторых вариантах осуществления AAV, например, капсидный белок AAV, связан с Fc, а каркасный белок связан с антигенсвязывающим доменом, где антигенсвязывающий домен специфически связывает Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgA. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgE.

[0399] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает мышиное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает химерное антитело (например, моноклональное антитело мыши/человека, мыши/примата или примата/человека) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент верблюжьего антитела, IgNAR акулы или антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает верблюжье антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления

антигенсвязывающий домен включает IgNAR акулы или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0400] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает (scFv)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab'. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab1)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечный Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает фрагмент Fd.

[0401] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает диантитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает миниантитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает связанный с антителом полипептид. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит наноантитело.

[0402] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает конформационный эпитоп на поверхности AAV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывает антиген на поверхности AAV, который присутствует только тогда, когда AAV является интактным и/или инфекционным.

II.C.4.iii. Рецептор AAV

[0403] В некоторых аспектах каркасный белок связан со связывающим AAV полипептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, содержит рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с AAV через рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV связан с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV связан с каркасным белком посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с внеклеточным доменом каркасного белка.

[0404] Любой рецептор AAV, известный в данной области техники, или его AAV-связывающий фрагмент могут быть связаны с каркасным белком, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV представляет собой рецептор AAV, кодируемый геном KIAA0319L, например, рецептор AAV представляет собой AAVR (см., например, Pillay et al., *Nature* 530(7588):108-12 (2016), который полностью включен посредством ссылки в данный документ). AAVR представляет собой N-связанный гликозилированный белок с массой около 150 кДа. Полноразмерный AAVR представляет собой трансмембранный белок типа 1, содержащий пять Ig-подобных доменов, называемых доменами поликистозной болезни почек (PKD). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD1 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD2 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD3 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD4 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домен PKD5 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1 и PKD2 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1, PKD2, и PKD3 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим по меньшей мере домены PKD1, PKD2, PKD3 и PKD4 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, содержащим домены PKD1, PKD2, PKD3, PKD4, PKD5 AAVR. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD4. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD3. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD2. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD1. В некоторых вариантах реализации каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5 или домен PKD4. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, при этом фрагмент AAVR не содержит домен PKD5, домен PKD4 или

домен PKD3. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с фрагментом AAVR, где фрагмент AAVR не содержит домен PKD5, домен PKD4, домен PKD3 или домен PKD2.

[0405] В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой стыковочный рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления рецептор выбран из протеогликана сульфата гепарина, N-связанной сиаловой кислоты, O-связанной сиаловой кислоты, N-связанной галактозы, CD9, ганглиозида GM1, LamR, EGFR, PDGFR, FGFR1, HGFR и любой их комбинации.

II.C.4.iv. Химически индуцированные димеры

[0406] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к ВВ, содержащему AAV и каркасный белок, где AAV связан с первым партнером по связыванию или димеризующим агентом химически индуцированного димера, а каркасный белок связан со вторым партнером по связыванию или димеризующим агентом химически индуцированного димера. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан по меньшей мере с одним белком VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 5 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 4 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 3 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 2 белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с 1 из белков VP1 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP1, который не связан с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP1, которые не связаны с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP1, которые не связаны с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP1, которые не связаны с партнером по связыванию.

[0407] В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан по меньшей мере с одним белком VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 5 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 4 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 3 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с каждым из 2 белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления первый

партнер по связыванию связан с 1 из белков VP2 AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит один белок VP2, который не связан с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два белка VP2, которые не связаны с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три белка VP2, которые не связаны с партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит четыре белка VP2, которые не связаны с партнером по связыванию.

[illegible]

[illegible]

[0409] В некоторых вариантах осуществления количество VP3, связанного с первым партнером по связыванию, в по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз, по меньшей мере около 50 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного белка VP3, который не связан с партнером по связыванию.

[0410] В некоторых вариантах осуществления AVV содержит белок 1 VP2, связанный с первым партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 2 белка VP2, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 3 белка VP2, связанных с первыми партнерами по

связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 4 белка VP2, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 5 белков VP2, связанных с первыми партнерами по связыванию.

[0411] В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 1 белок VP1, связанный с первым партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 2 белка VP1, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 3 белка VP1, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 4 белка VP1, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 5 белков VP1, связанных с первыми партнерами по связыванию.

[0412] В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 1 белок VP3, связанный с первым партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 2 белков VP3, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 3 белков VP3, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 4 белков VP3, связанных с первыми партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления AVV содержит 5 белков VP3, связанных с первыми партнерами по связыванию.

[0413] В некоторых аспектах партнер по связыванию связан с N-концом капсидного фрагмента. В других вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с C-концом капсидного белка. В других вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, между N-концом и C-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, во внутреннюю петлю, например, ряд аминокислот, которые образуют петлевую структуру, которая находится на поверхности капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, непосредственно ниже аминокислоты 455 (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, Gly₄₅₃ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₄ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₅ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых аспектах первый партнер по

связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены Thr₄₅₆ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Gln₄₅₇ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Ser₄₅₈ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем Arg₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен в капсидный белок, например, VP1, VP2 и/или VP3, путем замены ⁴⁵³GTTTQSR₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44). В конкретных вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен по меньшей мере в один белок VP3 путем замены Thr₄₅₅ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44) или в гомологичную область белков VP других серотипов AAV. В конкретных вариантах осуществления первый партнер по связыванию вставлен по меньшей мере в один белок VP3 путем замены ⁴⁵³GTTTQSR₄₅₉ (относительно нумерации SEQ ID NO: 44) или в гомологичную область белков VP других серотипов AAV.

[0414] Первый партнер по связыванию может быть связан с капсидным белком AAV. В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию связан с капсидом посредством линкера.

[0415] В некоторых вариантах осуществления второй партнер по связыванию связан с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV связан с каркасным белком. В некоторых вариантах осуществления рецептор AAV связан с каркасным белком посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления рецептор связан с внеклеточным доменом каркасного белка.

[0416] В некоторых вариантах осуществления первый партнер по связыванию, связанный с капсидным белком AAV, и второй партнер по связыванию, связанный с каркасным белком, выбраны из первого и второго партнеров по связыванию химически индуцированного димера, выбранного из группы, состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с FKBP, а каркасный белок связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок

AAV связан с FKBP, а каркасный белок связан с кальциневрином А (CNA). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с кальциневрином А (CNA), а каркасный белок связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с FKBP, а каркасный белок связан с CyP-Fas. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с CyP-Fas, а каркасный белок связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с FKBP, а каркасный белок связан с FRB. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с FRB, а каркасный белок связан с FKBP. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с GyrB, а каркасный белок связан с GyrB. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с GAI, а каркасный белок связан с GID1. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с GID1, а каркасный белок связан с GAI. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан со Snap-tag, а каркасный белок связан с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с HaloTag, а каркасный белок связан со Snap-tag. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с HaloTag, а каркасный белок связан с eDHFR. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с eDHFR, а каркасный белок связан с HaloTag. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с BCL-xL, а каркасный белок связан с Fab (AZ1). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с Fab(AZ1), а каркасный белок связан с BCL-xL.

[0417] В конкретных вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный с FRB, причем FRB связан с N-концом капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный с FRB, причем FRB связан с C-концом капсидного белка. В конкретных вариантах осуществления AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок (например, VP1, VP2 и/или VP3), связанный с FRB, причем FRB вставлен в капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления FRB вставлен в капсидный белок в любом месте, описанном в данном документе.

II.C.4.v. Аффинные агенты

[0418] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с аффинным агентом. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связан с внеклеточным доменом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления

аффинный агент включает полипептид, связывающий AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент включает рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент содержит антитело или антигенсвязывающий домен, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент связывается с одним или более капсидными белками AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более капсидных белков AAV представляют собой белки, активирующие сборку AAV. В некоторых вариантах осуществления аффинный агент не связывается с мономером капсидного белка AAV.

[0419] В некоторых аспектах аффинный агент способен связывать более одного серотипа AAV. В некоторых аспектах аффинный агент способен связывать более чем серотип AAV, выбранный из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, Rh10, Rh74, AAV-2i8, змеиного AAV, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, синтетического AAV и любой их комбинации. В некоторых аспектах аффинный агент специфически связывает серотип AAV9. В некоторых аспектах аффинный агент может связывать любой серотип AAV. В некоторых аспектах аффинный агент специфически связывает серотип AAV2. В некоторых аспектах аффинный агент специфически связывает серотип AAV4. В некоторых аспектах аффинный агент специфически связывает серотип AAV5.

[0420] В некоторых вариантах осуществления взаимодействие между аффинным агентом и AAV является временным. В некоторых вариантах осуществления AAV диссоциирует от аффинного агента при определенных условиях. В определенных вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от pH. В некоторых вариантах осуществления AAV диссоциирует от аффинного агента при pH по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11 или по меньшей мере около 12. В некоторых вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от концентрации кальция, магния, сульфата, фосфата или любой их комбинации в растворе, содержащем AAV и аффинный агент. В некоторых вариантах осуществления аффинность аффинного агента к AAV зависит от концентрации соли и/или ионной силы раствора, содержащего AAV и аффинный агент. В некоторых вариантах осуществления AAV и аффинный агент диссоциируют в восстанавливающих условиях.

[0421] В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан со связывающим AAV полипептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с N-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с C-концом каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, связан с внеклеточным доменом каркасного белка.

[0422] В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий AAV, содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает мышинное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает химерное антитело (например, моноклональное антитело мыши/человека, мыши/примата или примата/человека) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий фрагмент верблюжьего антитела, IgNAR акулы или антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает верблюжье антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает IgNAR акулы или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0423] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает (scFv)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fab'. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает F(ab1)₂. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает

одноцепочечный Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает фрагмент Fd.

[0424] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает диатело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает миниантитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает связанный с антителом полипептид. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит наноантитело.

II.D. Линкеры

[0425] Как описано выше, ВВ по настоящему изобретению (например, экзосомы и нановезикулы) могут содержать один или более линкеров, которые связывают первый элемент со вторым элементом (например, каркасный белок с капсидным белком, каркасный белок с партнером по связыванию, капсидный белок с партнером по связыванию, каркасный белок с наноантителом, каркасный белок с рецептором (например, Fc-рецептором), Fc с каркасным белком, каркасный белок с антигенсвязывающим доменом, AAVR с каркасным белком, антиген с капсидным белком, Fc с капсидным белком или любая их комбинация).

[0426] Линкер может быть любым химическим фрагментом, который, как известно в данной области техники, соединяет два элемента. В контексте данного документа 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 линкеров могут быть связаны в тандеме. Когда присутствует несколько линкеров, каждый из линкеров может быть одинаковым или разным. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предотвращают/уменьшают стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более участков, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности. В некоторых аспектах расщепляемый линкер позволяет высвобождать AAV.

[0427] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, 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.

[0428] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не слит 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).

[0429] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение AAV или каркасного белка. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с капсидным белком расщепляемым линкером, причем расщепление расщепляемого линкера высвобождает AAV. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера, как описано в данном документе, посредством расщепляемого линкера, где расщепление расщепляемого линкера отщепляет каркасный белок от партнера по связыванию. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера, как описано в данном документе, расщепляемым линкером, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет капсидный белок от партнера по связыванию. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с наноантителом посредством расщепляемого линкера, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет каркасный белок от наноантитела. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с антигенсвязывающим доменом, как описано в данном документе, с помощью расщепляемого линкера, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет каркасный белок из антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с рецептором (например, Fc-рецептором), как описано в данном документе, посредством расщепляемого линкера, где расщепление расщепляемого линкера отщепляет каркасный белок от рецептора (например, Fc-рецептора). В некоторых вариантах осуществления каркасный белок связан с AAVR, как описано в данном

документе, посредством расщепляемого линкера, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет каркасный белок от AAVR. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с антигеном, как описано в данном документе, с помощью расщепляемого линкера, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет капсидный белок от антигена. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV связан с Fc расщепляемым линкером, причем расщепление расщепляемого линкера отщепляет капсидный белок от Fc.

[0430] В некоторых аспектах линкер является «чувствительным к восстановлению линкером». В некоторых аспектах чувствительный к восстановлению линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых аспектах линкер является «кислотолабильным линкером». В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит гидразон. Подходящие кислотолабильные линкеры также включают, например, цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

[0431] В некоторых аспектах расщепляемый линкер включает динуклеотидный или тринуклеотидный линкер, дисульфид, имин, тиокеталь, дипептид val-cit или любую их комбинацию.

[0432] В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат, валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат или оба.

[0433] В некоторых аспектах расщепляемый линкер включает линкеры, расщепляемые окислительно-восстановительным методом, линкеры, расщепляемые реактивными формами кислорода (ROS), pH-зависимые расщепляемые линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, линкеры, расщепляемые протеазой, линкеры, расщепляемые эстеразой, линкеры, расщепляемые фосфатазой, фотоактивированные расщепляемые линкеры, саморасщепляющиеся линкеры или их комбинации. Дополнительное раскрытие, относящееся к одному или более из этих расщепляемых линкеров, представлено ниже и также известно в данной области техники, *см., например*, US 2018/0037639 A1; Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982); Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989); Cancer Res. 77(24):7027-7037 (2017); Doronina et al. Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003); US 7,754,681 B2; US 2006/0269480; US 2010/0092496; US 2010/0145036; US 2003/0130189; US 2005/0256030, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0434] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает редокс-расщепляемый линкер. В определенных аспектах такой линкер может содержать отщепляемую окислительно-восстановительным методом связывающую группу, которая отщепляется при восстановлении или при окислении.

[0435] В некоторых аспектах редокс-расщепляемый линкер содержит дисульфидную связь, т.е. он представляет собой расщепляемый дисульфидом линкер. В некоторых аспектах редокс-расщепляемый линкер может быть восстановлен, *например*, внутриклеточными меркаптанами, оксидазами, редуктазами или их комбинациями.

[0436] В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать расщепляемый линкер, который может расщепляться реактивными формами кислорода (ROS), такими как супероксид (O_2^-) или пероксид водорода (H_2O_2), генерируемыми, *например*, в результате процессов воспаления, *например*, активированными нейтрофилами. В некоторых аспектах расщепляемый линкер ROS представляет собой расщепляемый тиокеталом линкер. *См.*, *например*, патент США 8 354 455B2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0437] В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер», содержащий расщепляемую кислотой связывающую группу, которая представляет собой связывающую группу, которая селективно расщепляется в кислых условиях ($pH < 7$).

[0438] В некоторых аспектах расщепляемая кислотой связывающая группа отщепляется в кислой среде, *например*, около 6,0, около 5,5, около 5,0 или менее. В некоторых аспектах pH составляет приблизительно 6,5 или меньше. В некоторых аспектах линкер расщепляется агентом, таким как фермент, который может действовать как обычная кислота, *например*, пептидаза (которая может быть субстратспецифичной) или фосфатаза. Внутри клеток определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемой кислотой связывающей группы. Хотя pH сыворотки крови человека составляет 7,4, среднее значение pH в клетках немного ниже, от приблизительно 7,1 до 7,3. Эндосомы также имеют кислый pH в диапазоне от 5,5 до 6,0, а лизосомы около 5,0 при еще более кислом pH. Соответственно, pH-зависимые расщепляемые линкеры в данной области техники иногда называют эндосомно лабильными линкерами.

[0439] В некоторых аспектах расщепляемая кислотой группа может иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)-$. В другом неограничивающем примере углерод, присоединенный к сложноэфирному кислороду (алкоксигруппе), присоединен к арильной группе, замещенной алкильной группой или третичной алкильной группой, такой как, *например*, диметилпентил или трет-бутил. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваясь ими, амин, имин, сложный аминоэфир, бензойный имин, диортоэфир, полифосфоэфир, полифосфазен, ацеталь, виниловый эфир, гидразон, цис-аконитат, гидразид, тиокарбамоил, имизин, азидометилметилмалеиновый ангидрид,

тиопропионат, замаскированный эндосомолитический агент, цитраконильную группу или любую их комбинацию. Дисульфидные связи также чувствительны к pH.

[0440] В некоторых аспектах линкер содержит гидразоновую связь, неустойчивую к pH. Такие неустойчивые к кислотам связи широко используются в области конъюгатов, например, конъюгатов антитело-лекарственное средство. См., например, Zhou et al, *Biomacromolecules* 2011, 12, 1460-7; Yuan et al, *Acta Biomater.* 2008, 4, 1024-37; Zhang et al, *Acta Biomater.* 2007, 6, 838-50; Yang et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, 321, 462-8; Reddy et al, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006, 58, 229-36; Doronina et al, *Nature Biotechnol.* 2003, 21, 778-84, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0441] В некоторых аспектах линкер содержит лабильную связь при низком значении pH, выбранную из следующего: кетали, которые лабильны в кислой среде (например, pH менее 7, более чем приблизительно 4) с образованием диола и кетона; ацетали, которые в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) лабильны с образованием диола и альдегида; имины или иминий, которые лабильны в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) с образованием амина и альдегида или кетона; связи кремний-кислород-углерод, неустойчивые в кислых условиях; кремний-азотные (силазановые) связи; кремний-углеродные связи (например, арилсиланы, винилсиланы и аллилсиланы); малеаматы (амидные связи, синтезированные из производных малеинового ангидрида и аминов); ортоэфиры; гидразоны; активированные производные карбоновой кислоты (например, сложные эфиры, амиды), предназначенные для кислотно-катализируемого гидролиза); или виниловые эфиры.

[0442] Дополнительные примеры можно найти в патентах США №№ 9 790 494 B2 и 8 137 695 B2, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0443] В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать линкер, расщепляемый внутриклеточными или внеклеточными ферментами, например протеазами, эстеразами, нуклеазами, амидазами. Диапазон ферментов, которые могут расщеплять конкретный линкер в комбинации линкеров, зависит от конкретных связей и химической структуры линкера. Соответственно, пептидные линкеры можно расщеплять, например, пептидазами, линкеры, содержащие сложноэфирные связи, можно расщеплять, например, эстеразами; линкеры, содержащие амидные связи, могут расщепляться, например, амидазами; и т.п.

[0444] Некоторые линкеры расщепляются эстеразами («линкеры, расщепляемые эстеразой»). Только определенные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами и амидазами, присутствующими внутри или вне клеток. Сложные эфиры образуются при

конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с простыми спиртами, такими как алифатические спирты, а также с малыми циклическими и малыми ароматическими спиртами. Примеры расщепляемых связующих групп на основе сложных эфиров включают, но без ограничения ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемая сложным эфиром связывающая группа имеет общую формулу -C (O) O- или -OC (O)-.

[0445] В некоторых аспектах комбинация линкеров может включать расщепляемую связывающую группу на основе фосфата, отщепляемую агентом, который разрушает или гидролизует фосфатные группы. Примером агента, расщепляющего внутриклеточные фосфатные группы, является фермент, такой как внутриклеточная фосфатаза. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются —O—P (O) (OR_k) —O—, —O—P (S) (OR_k) —O—, —O—P (S) (SR_k) —O—, -S-P (O) (OR_k) -O-, -O-P (O) (OR_k) -S-, -S-P (O) (OR_k) -S-, -O-P (S) (OR_k) -S-, -SP (S) (OR_k) -O-, -OP (O) (R_k) -O-, -OP (S) (R_k) -O-, -SP (O) (R_k) -O-, -SP (S) (R_k) -O-, -SP (O) (R_k) -S- или -OP (S) (R_k) -S-.

[0446] В некоторых аспектах R_k может представлять собой любое из следующего: NH₂, BH₃, CH₃, C₁₋₆ алкил, C₆₋₁₀ арил, C₁₋₆ алкокси и C₆₋₁₀ арил-окси. В некоторых аспектах C₁₋₆ алкил и C₆₋₁₀ арил являются незамещенными. Дополнительные неограничивающие примеры включают -O-P (O) (OH) -O-, -O-P (S) (OH) -O-, -O-P (S) (SH) -O-, -S-P (O) (OH) -O-, -O-P (O) (OH) -S-, -S-P (O) (OH) -S-, -O-P (S) (OH) -S-, -S-P (S) (OH) -O-, -O-P (O) (H) -O-, -O-P (S) (H) -O-, -S-P (O) (H) -O-, -SP (S) (H) -O-, -SP (O) (H) -S-, -OP (S) (H) -S- или -O-P (O) (OH) -O-.

[0447] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает фотоактивированный расщепляемый линкер, например, нитробензильный линкер или линкер, содержащий нитробензильную реактивную группу.

[0448] В некоторых аспектах линкер включает нерасщепляемый линкер.

III. Клетка-продуцент для получения сконструированных экзосом

[0449] ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему раскрытию могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro*, или взятой из жидкости организма субъекта. Когда экзосомы, получают из клеточной культуры *in vitro*, могут быть использованы различные клетки-продуценты, *например*, клетки НЕК293, клетки CHO и MSC. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент не является дендритной клеткой, макрофагом, В-клеткой, тучной клеткой, нейтрофилом, клеткой Бровича — Купфера, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

[0450] Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения одной или более экзогенных последовательностей (*например*, кодирующих AAV,

каркасный белок или терапевтический белок) для получения описанных в данном документе экзосом. Генетически модифицированная клетка-продуцент может содержать экзогенную последовательность путем временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть трансформирована в виде плазмиды. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-продуцента, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых вариантах осуществления получают стабильную клеточную линию для получения сконструированных в просвете экзосом.

[0451] Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-продуцента, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-продуцент можно использовать различные способы, известные в данной области. Например, клетки, модифицированные с использованием различных способов редактирования генов (*например*, способы, использующие гомологичную рекомбинацию, систему, опосредованную транспозоном, систему loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN), входят в объем данного описания.

[0452] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую каркасный белок, описанный в данном документе, или его фрагмент или вариант. Дополнительная копия последовательности, кодирующей каркасный белок, может быть введена для получения описанной в данном документе экзосомы (*например*, имеющей более высокую плотность каркасного белка на поверхности, *например*, на поверхности просвета и/или внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы). Экзогенная последовательность, кодирующая модификацию или фрагмент каркасного белка, может быть введена для получения сконструированной в просвете экзосомы, содержащей модификацию или фрагмент каркасного белка.

[0453] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент может быть модифицирована, *например*, трансфицирована одним или более векторами, кодирующими каркасный белок, связанный с капсидным белком AAV, рецептором AAV, партнером по связыванию химически индуцированного димера, антигенсвязывающим доменом (*например*, наноантителом), Fc-рецептором, или любую их комбинацию.

[0454] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент, описанная в данном документе, дополнительно модифицируется для включения дополнительной экзогенной последовательности. *Например*, дополнительная экзогенная последовательность может быть введена для модуляции экспрессии эндогенного гена или получения экзосомы,

содержащей полезную нагрузку (например, AAV). В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы, а другая кодирует полезную нагрузку (например, AAV). В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент может быть дополнительно модифицирована для включения дополнительной экзогенной последовательности, придающей дополнительные функции экзосомам. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицирована для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует каркасный белок, описанный в данном документе, или его вариант или фрагмент, а другая кодирует AAV. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент дополнительно модифицируется для включения одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более дополнительных экзогенных последовательностей.

[0455] Любой из каркасных фрагментов, описанных в данном документе, может быть экспрессирован из плазмиды, экзогенной последовательности, встроенной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая матричная РНК (мРНК).

[0456] В некоторых вариантах осуществления ВВ и AAV продуцируются одной клеткой или одной популяцией клеток определенных типов. В некоторых вариантах осуществления ВВ продуцируется первой клеткой (или первой популяцией клеток), а AAV продуцируется второй клеткой (или второй популяцией клеток). В некоторых вариантах осуществления первая клетка и вторая клетки представляют собой клетки одного типа. В некоторых вариантах осуществления первая клетка и вторая клетка не являются клетками одного и того же типа.

IV. Фармацевтические композиции

[0457] В данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие ВВ, *например*, экзосомы, по данному изобретению, имеющие желаемую степень чистоты, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество 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, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем

требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[0458] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и экзосому, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления ВВ, например, экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, вводят до введения дополнительных терапевтических агентов. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, вводят после введения дополнительных терапевтических агентов. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, вводят одновременно с дополнительными терапевтическими агентами.

[0459] 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; циклогексано́л, 3-пентано́л; и м-крезо́л); 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 ЭДТА; сахара, 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 (ПЭГ).

[0460] Примеры носителей или разбавителей включают, без ограничений, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Применение таких сред и соединений в отношении фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или соединения являются несовместимыми с внеклеточными везикулами, описанными в данном документе, предусматривается их применение в

композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в эти композиции. Как правило, фармацевтическая композиция составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем ее введения. ВВ, *например*, экзосомы 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 фармацевтическую композицию, содержащую экзосомы, вводят внутривенно, *например*, путем инъекции. ВВ, *например*, экзосомы, можно необязательно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении заболевания, расстройства или состояния, для лечения которых предназначены ВВ, *например*, экзосомы.

[0461] Растворы или суспензии могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, нелетучие 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 (ЭДТК); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. РН можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многоразовые флаконы из стекла или пластмассы.

[0462] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Обычно композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, что она должна легко выходить из шприца. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, *например*, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и 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 можно выполнять посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например*

парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например*, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например* моностеарата алюминия и желатина.

[0463] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения ВВ, например экзосом, в эффективном количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения ВВ, например экзосом, описанных в настоящем документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и 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 вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. ВВ, *например*, экзосомы можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить устойчивое или пульсирующее высвобождение ВВ, *например*, экзосом.

[0464] Системное введение композиций, содержащих экзосомы, также может осуществляться через слизистые оболочки. Для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники, и включают в себя, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может быть осуществлено за счет использования *например*, назальных спреев.

[0465] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую экзосомы, вводят внутривенно субъекту, которому фармацевтическая композиция может принести пользу. В определенных других вариантах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, например, путем внутрилимфатической инъекции или внутриузловой инъекции (см., например, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)) или путем внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем внутриопухолевой инъекции, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[0466] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую экзосомы, 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 ВВ, например, экзосомы в кровоток или остается в форме депо.

[0467] 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.

[0468] 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.

[0469] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат ВВ (*например*, экзосомы), описанные в настоящем документе, и необязательно фармацевтически активный или терапевтический агент. Терапевтический агент может представлять собой биологический агент, агент на основе малой молекулы или агент на основе нуклеиновой кислоты.

[0470] Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, *например*, экзосомы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления дозированная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления дозированная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутриопухолевой инъекции.

[0471] В определенных вариантах осуществления препарат экзосом 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.

[0472] В некоторых вариантах осуществления препарат экзосом подвергают гамма-облучению с использованием дозы облучения более чем около 1, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 100 или более около 100 кГр.

[0473] В некоторых вариантах осуществления препарат экзосом подвергают облучению рентгеновскими лучами с использованием дозы облучения более чем около 0,1,

около 0,5, около 1, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000, около 10000, или более около 10000 мЗв.

V. Наборы

[0474] В данном документе также предложены наборы, содержащие одну или более экзосом, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащая один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одна или более экзосом, предложенных в данном документе, и необязательно инструкция по применению. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе.

VI. Способы получения экзосом

[0475] В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к способам получения экзосом, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает: получение ВВ, например, экзосомы, из клетки-продуцента и, необязательно, выделение полученной ВВ, например, экзосомы. В некоторых вариантах осуществления способ включает: модификацию клетки-продуцента путем введения двух или более компонентов экзосомы, описанной в данном документе (например, каркасного белка и AAV); получение ВВ, например, экзосомы из модифицированной клетки-продуцента; и необязательно выделение полученной ВВ, например, экзосомы. В дополнительных вариантах осуществления способ включает: получение экзосомы из клетки-продуцента; выделение полученной экзосомы; и модификацию выделенной экзосомы (например, путем вставки AAV). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает составление выделенной экзосомы в фармацевтическую композицию.

VI.A. Способы модификации клетки-продуцента

[0476] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления способ получения экзосомы включает модификацию клетки-продуцента одним или более фрагментами (например, каркасным белком и/или AAV). В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов содержат AAV. В некоторых вариантах осуществления один или

более фрагментов дополнительно содержат каркасный белок, описанный в данном документе.

[0477] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент может представлять собой клетку из линии клеток млекопитающих, линии клеток растений, линии клеток насекомых, линии клеток грибов или линии прокариотических клеток. В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой клетку из линии клеток млекопитающих. Неограничивающие примеры клеточных линий млекопитающих включают: линию клеток эмбриональной почки человека (НЕК), линию клеток яичника китайского хомячка (СНО), линию клеток НТ-1080, линию клеток HeLa, линию клеток PERC-6, линию клеток СВВЕС, линию клеток фибробластов, линию клеток амниоцитов, линию эпителиальных клеток, линию клеток мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и их комбинации. В определенных вариантах осуществления линия клеток млекопитающих включает клетки НЕК-293, клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], амниоциты CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент является первичной клеткой. В определенных вариантах осуществления первичная клетка может представлять собой первичную клетку млекопитающего, первичную клетку растения, первичную клетку насекомого, первичную клетку грибов или первичную прокариотическую клетку.

[0478] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент не является иммунной клеткой, такой как антигенпрезентирующая клетка, Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер (НК-клетка), макрофаг, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (Трег). В других вариантах осуществления клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой (например, дендритными клетками, макрофагами, В-клетками, тучными клетками, нейтрофилами, клеткой Бровича — Купфера, или клеткой, полученной из любых таких клеток).

[0479] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов могут представлять собой трансген или мРНК и введены в клетку-продуцент путем трансфекции, вирусной трансдукции, электропорации, экструзии, обработки ультразвуком, слияния клеток или других способов, которые известны специалистам в данной области техники.

[0480] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством трансфекции. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов могут быть введены в подходящие клетки-продуценты с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Papakretou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). В некоторых вариантах

осуществления катионные липиды образуют комплексы с одним или более фрагментами за счет зарядовых взаимодействий. В некоторых из этих вариантов осуществления положительно заряженные комплексы связываются с отрицательно заряженной поверхностью клетки и поглощаются клеткой посредством эндоцитоза. В некоторых других вариантах осуществления для трансфекции клеток-продуцентов может быть использован катионный полимер. В некоторых из этих вариантов осуществления катионный полимер представляет собой полиэтиленимин (PEI). В определенных вариантах осуществления химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен, могут использоваться для введения одного или более фрагментов в клетки-продуценты. Один или более фрагментов также могут быть введены в клетку-продуцент с использованием физического метода, такого как трансфекция, опосредованная частицами, «генная пушка», биолистика или технология бомбардировки частицами (Paparotrou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). Для оценки эффективности трансфекции клетки-продуцента можно использовать репортерный ген, такой как, например, бета-галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок.

[0481] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством вирусной трансдукции. В качестве носителей для переноса генов можно использовать ряд вирусов, включая вирус мышинного лейкоза (MMLV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус простого герпеса (HSV), лентивирусы и спумавирусы. Опосредованные вирусами носители для переноса генов содержат векторы на основе ДНК-вирусов, таких как аденовирус, аденоассоциированный вирус и вирус герпеса, а также векторы на основе ретровирусов.

[0482] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством электропорации. Электропорация создает переходные поры в клеточной мембране, что позволяет вводить в клетку различные молекулы. В некоторых вариантах осуществления ДНК и РНК, а также полипептиды и неполипептидные терапевтические агенты могут быть введены в клетку-продуцент посредством электропорации.

[0483] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент с помощью микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления для введения одного или более фрагментов в клетку-продуцент на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

[0484] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством экструзии.

[0485] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления клетку-продуцент подвергают воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение клеточной мембраны, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0486] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент путем слияния клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят путем электрического слияния клеток. В других вариантах осуществления слияния клеток-продуцентов используют полиэтиленгликоль (PEG). В дополнительных вариантах осуществления для слияния клеток-продуцентов используют вирус Сендай.

[0487] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем гипотонического лизиса. В таких вариантах осуществления клетка-продуцент может подвергаться воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать один или более фрагментов. В других вариантах осуществления для набухания клетки-продуцента и для создания пор в мембране клетки-продуцента может использоваться контролируемый диализ против гипотонического раствора. Затем клетка-продуцент подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[0488] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем обработки детергентом. В определенных вариантах осуществления клетку-продуцент обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану клетки-продуцента, создавая поры, позволяющие загружать один или более фрагментов. После загрузки клеток-продуцентов детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[0489] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов введены в клетку-продуцент посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных осуществления клетки-продуценты имеют поверхностный рецептор, который при связывании с одним или более фрагментами вызывает интернализацию рецептора и связанных фрагментов.

[0490] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем фильтрации. В определенных вариантах осуществления клетки-продуценты и один или более фрагментов могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у клетки-продуцента, что вызывает временное разрушение мембраны

клетки-продуцента и позволяет одному или более фрагментам проникать в клетку-продуцент.

[0491] В некоторых вариантах осуществления клетку-продуцент подвергают нескольким циклам замораживания-размораживания, что приводит к разрушению клеточной мембраны и позволяет загружать один или более фрагментов.

VI.B. Способы модификации экзосомы

[0492] В некоторых вариантах осуществления способ получения экзосомы включает модификацию выделенной экзосомы путем прямого введения одного или более фрагментов в ВВ. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов содержат AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов содержат каркасный белок, описанный в данном документе.

[0493] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводятся в экзосому путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов могут быть введены в ВВ с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Papapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В некоторых вариантах осуществления химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен, могут использоваться для введения одного или более фрагментов в ВВ.

[0494] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ посредством электропорации. В некоторых вариантах осуществления экзосомы подвергают воздействию электрического поля, которое вызывает временные отверстия в мембране ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0495] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ посредством микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления для введения одного или более фрагментов ВВ на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

[0496] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ посредством экструзии.

[0497] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ посредством обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления ВВ воздействуют звуковыми волнами высокой интенсивности, вызывающими временное разрушение мембраны ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0498] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов могут быть конъюгированы с поверхностью ВВ. Конъюгирование может быть достигнуто химическим или ферментативным способами, известными в данной области техники.

[0499] В некоторых вариантах осуществления ВВ содержит один или более фрагментов, которые химически конъюгированы. Химическая конъюгация может быть достигнута путем ковалентного связывания одного или более фрагментов с другой молекулой с применением линкера или без него. Образование таких конъюгатов находится в компетенции специалистов в данной области, и известны различные методы выполнения конъюгации, при этом выбор конкретной методики определяется материалами, которые подлежат конъюгации. В определенных вариантах осуществления полипептиды конъюгированы с ВВ. В некоторых вариантах осуществления неполипептиды, такие как липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы, являются конъюгированными с ВВ.

[0500] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят в ВВ путем гипотонического лизиса. В таких вариантах осуществления ВВ может подвергаться воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать один или более фрагментов. В других вариантах осуществления контролируемый диализ против гипотонического раствора может использоваться для набухания ВВ и для создания пор в мембране ВВ. ВВ подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[0501] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ путем обработки детергентом. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает работу мембраны ВВ, создавая поры, позволяющие загружать один или более фрагментов. После загрузки ВВ детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[0502] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных вариантах осуществления ВВ имеют поверхностный рецептор, который при связывании с одним или более фрагментами вызывает интернализацию рецептора и связанных фрагментов.

[0503] В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов вводят во ВВ путем механического воздействия. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы можно бомбардировать одним или более фрагментами, прикрепленным к тяжелой или заряженной частице, такой как золотые микроносители. В некоторых из этих вариантов осуществления частица может быть механически или электрически ускорена, так что она проходит через мембрану ВВ.

[0504] В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергают нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению мембраны ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

VI.C. Способы выделения ВВ, например, экзосомы

[0505] В некоторых вариантах осуществления способы получения ВВ, описанные в данном документе, включают выделение ВВ из клеток-продуцентов. В определенных вариантах осуществления ВВ высвобождаются клеткой-продуцентом в среду для культивирования клеток. Предполагается, что все известные способы выделения ВВ считаются подходящими для применения в настоящем изобретении. Например, для выделения ВВ из среды или другого исходного материала могут быть использованы их физические свойства, включая разделение на основе электрического заряда (например, электрофоретическое разделение), размера (например, фильтрация, молекулярное просеивание и т. п.), плотности (например, обычное или градиентное центрифугирование), постоянной Сведберга (например, осаждение с применением внешней силы или без нее и т. п.). Альтернативно или дополнительно, выделение может быть основано на одном или более биологических свойствах и включать методы, в которых могут использоваться поверхностные маркеры (*например*, для преципитации, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания с лигандом, неспецифического связывания с лигандом, аффинной очистки *и т.д.*).

[0506] Выделение и обогащение могут быть выполнены обычным и неселективным способом, обычно включая последовательное центрифугирование. Альтернативно, выделение и обогащение могут быть выполнены более специфичным и селективным способом, как с использованием ВВ или с использованием поверхностных маркеров, специфичных для клеток-продуцентов. Например, специфические поверхностные маркеры могут быть использованы при иммунопреципитации, сортировке FACS, аффинной очистке, магнитном разделении с лигандами, связанными с гранулами.

[0507] В некоторых вариантах осуществления для выделения ВВ можно использовать эксклюзионную хроматографию. Методы эксклюзионной хроматографии известны в данной области техники. В данном документе представлены иллюстративные, неограничивающие методы. В некоторых вариантах осуществления выделяют фракцию пустотного объема, которая содержит представляющие интерес ВВ. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления ВВ могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения методами центрифугирования (одной или более хроматографическими фракциями), как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, например, центрифугирование в градиенте плотности может использоваться для дальнейшего выделения внеклеточных везикул. В определенных вариантах осуществления может быть желательно дополнительно отделить ВВ, полученные из клеток-продуцентов от ВВ, полученных из другого источника. Например,

ВВ, полученные из клетки-продуцента, могут быть отделены от ВВ, полученных не из клеток-продуцентов, путем захвата на иммуносорбенте с использованием антигена и антитела, специфичного для клетки-продуцента.

[0508] В некоторых вариантах осуществления выделение ВВ может включать комбинации методов, которые включают, без ограничений, дифференциальное центрифугирование, мембранную фильтрацию на основе размеров, иммунопреципитацию, сортировку методом проточной цитометрии и магнитную сепарацию.

VII. Способы лечения

[0509] В настоящем изобретении также представлены способы предотвращения и/или лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту описанной в данном документе ВВ. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью настоящих способов, включает рак, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, заболевание глаз, болезнь Помпе, болезнь Гоше, лизосомальную болезнь накопления, муковидоз, кистозный фиброз, мышечную дистрофию Дюшенна — Беккера, транстиретиновый амилоидоз, гемофилию А, гемофилию В, аденозиндезаминазную недостаточность, врожденный амавроз Лебера, X-сцепленную адренолейкодистрофию, метахроматическую лейкодистрофию, недостаточность орнитинтранскарбамилазы (ОТС), болезнь накопления гликогена 1А, синдром Криглера — Найяра, первичную гипероксалурию 1 типа, острую интермиттирующую порфирию, фенилкетонурию, семейную гиперхолестеринемию, мукополисахаридоз типа VI, дефицит α 1-антитрипсина, синдром Ретта, синдром Драве, синдром Ангельмана, миотоническую дистрофию 1-го типа, синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Хантингтона, атаксию Фридрейха, болезнь ШМТ (также известная как болезнь Шарко — Мари — Тута, наследственная моторно-сенсорная нейропатия (HMSN) или мышечная атрофия перонеального типа), болезнь CMT1X, катехоламинергическую полиморфную желудочковую тахикардию, спиноцереbellарную атаксию 3 типа (SCA3), тазово-плечевую мышечную дистрофию или гиперхолестеринемию. В некоторых вариантах осуществления лечение носит профилактический характер.

[0510] В некоторых вариантах осуществление заболевание или расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак является неоперабельным, локально-распространенным или метастатическим. В некоторых вариантах осуществления рак является рецидивирующим. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным к предшествующей терапии, например, предшествующему стандарту лечения.

[0511] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение связано с дефицитом фактора свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой кровотечение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой гемофилию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой гемофилию А. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой гемофилию В. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой болезнь фон Виллебранда.

[0512] В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, прионной болезни, болезни двигательных нейронов, болезни Хантингтона, спиноцеребеллярной атаксии, спинальной мышечной атрофии и любой их комбинации.

[0513] В определенных аспектах заболевание или нарушение включает мышечную дистрофию. В некоторых аспектах мышечная дистрофия выбрана из мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), миотонической мышечной дистрофии, плече-лопаточно-лицевой миопатии (FSHD), врожденной мышечной дистрофии, тазово-плечевой мышечной дистрофии (включая, но не ограничиваясь ими, LGMD2B, LGMD2D, LGNMD2L, LGMD2C, LGMD2E и LGMD2A) и любые их комбинации. В некоторых аспектах AAV содержит

[0514] В некоторых аспектах заболевание или нарушение выбрано из недостаточности декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (ЦНС), вызванного АДА ТКИД, дефицита альфа-1-антитрипсина, β -талассемии (тяжелой серповидно-клеточной формы), рака (плоскоклеточного рака головы и шеи), болезни Ниманна-Пика типа С, церебральной адренолейкодистрофии, хориидермии, застойной сердечной недостаточности, муковисцидоза, мышечной дистрофии Дюшенна (МДД), болезни Фабри, глаукомы, глиомы (рака), гемофилии А, гемофилии В, НоFH (гиперхолестеринемии), болезни Хантингтона, дефицита липопротеинлипазы, наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON), метахроматической лейкодистрофии, MPS I (синдрома Гурлера), MPS II (синдром Хантера), MPS III (синдрома Санфилиппо), болезни Паркинсона, болезни Помпе, рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза, дефицита RPE65 (потери зрения), спинальной мышечной атрофии (СМА I), влажной ВМД (заболевания сетчатки), синдром Вискотта-Олдрича (WAS), мукополисахаридоза IIIA типа (MPS IIIA), X-сцепленной миотубулярной миопатии, X-сцепленного пигментного ретинита и любой их комбинации.

[0515] В некоторых аспектах заболевание или нарушение выбрано из нефропатии, несахарного диабета, диабета I типа, диабета II, почечного гломерулонефрита, бактериальных или вирусных гломерулонефритов, IgA-нефропатии, пурпury Шенляйна-Геноха, мембранопролиферативного гломерулонефрита, мембранозной нефропатии, синдрома Шегрена, нефротического синдрома, синдрома минимальных изменений, очагового гломерулосклероза и связанных с ним заболеваний, острой почечной недостаточности, острого тубулоинтерстициального нефрита, пиелонефрита, воспалительных заболеваний мочеполового тракта, преэклампсии, отторжения почечного трансплантата, лепры, рефлюкс-нефропатии, нефролитиаза, генетического заболевания почек, медуллярно-кистозной болезни почек, губчатой почки, поликистоза почек, аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек, туберозного склероза, болезни фон Гиппеля-Линдау, наследственной болезни тонкой гломерулярной базальной мембраны, коллаген III гломерулопатии, фибронектиновой гломерулопатии, синдрома Альпорта, болезни Фабри, синдрома ногтей-надколенника, врожденные аномалии развития мочеполового тракта, моноклональные гаммапатии, множественной миеломы, амилоидоза и родственных заболеваний, лихорадочного заболевания, семейной средиземноморской лихорадки, ВИЧ-инфекции – СПИДа, воспалительного заболевания, системных васкулитов, узелкового полиартериита, гранулематоза Вегенера, полиартериит, некротизирующего и серповидного гломерулонефрита, полимиозита-дерматомиозита, панкреатита, ревматоидного артрита системной красной волчанки, подагры, заболеваний крови, серповидноклеточной анемии, тромботической тромбоцитопенической пурпury, синдрома Фанкони, трансплантации, острого повреждения почек, синдрома раздраженного кишечника, гемолитико-уремического синдрома, острого некроза коркового вещества почек, почечной тромбоэмболии, травмы и оперативного вмешательства, обширного повреждения, ожогов, операции на органах брюшной полости и сосудах, индукции анестезии, побочных эффектов употребления наркотиков или наркотической зависимости, нарушения кровообращения, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, заболевания периферических сосудов, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, неатеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний, кожных заболеваний, псориаза, системного склероза, респираторных заболеваний, ХОБЛ, обструктивного апноэ во сне, гипоксии на большой высоте или эндокринных заболеваний, акромегалии, сахарного диабета и несахарного диабета или любой их комбинации.

[0516] В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние включает злокачественное новообразование, например, злокачественное новообразование,

выбранное из рака легкого, яичников, шейки матки, эндометрия, молочной железы, мозга, толстой кишки, предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, рака нервной системы, рака почки, рака сетчатки, рака кожи, рака печени, рака поджелудочной железы, рака половых органов и мочевого пузыря, меланомы, лейкемии, рака головного мозга (например, глиомы, астроцитомы, эпендимомы, олигодендроглиомы и опухолей со смесями двух или более типов клеток, называемыми смешанными глиомами, акустической невромой (неврилеммой, шванномой, невриномой), аденомы, астрацитомы, астроцитомы низкой степени злокачественности, гигантоклеточной астроцитомы, астроцитомы средней и высокой степени злокачественности, рецидивирующих опухолей, глиомы ствола головного мозга, хордомы, папилломы хориоидного сплетения, лимфомы ЦНС (первичной злокачественной лимфомы), кист, дермоидных кист, эпидермоидных кист, краниофарингиомы, эпендимомы, анапластической эпендимомы, ганглиоцитомы (ганглионевромы), ганглиоглиомы, мультиформной глиобластомы (GBM), злокачественной астрацитомы, глиомы, гемангиобластомы, неоперабельных опухолей головного мозга, лимфомы, медуллобластомы (MDL), менингиомы, метастатических опухолей головного мозга, смешанной глиомы, нейрофиброматоза, олигодендроглиомы, глиомы зрительного нерва, опухолей шишковидной железы, аденомы гипофиза, PNET (примитивной нейроэктодермальной опухоли), опухолей спинного мозга, субэпендимомы и туберозного склероза (болезни Бурневилля) и любой их комбинации.

[0517] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение связано с дефицитом фактора роста. В некоторых вариантах осуществления фактор роста выбран из группы состоящей аденомедуллина (AM), ангиопоэтина (Ang), фактора аутокринной миграции, костного морфогенетического белка (BMP) (например, BMP2, BMP4, BMP5, BMP7), члена семейства цилиарных нейротрофических факторов (например, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), лейкоз-ингибирующего фактора (LIF), интерлейкина-6 (IL-6)), колониестимулирующего фактора (например, колониестимулирующего фактора макрофагов (m-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)), эпидермального фактора роста (EGF), эфрина (например, эфрина A1, эфрина A2, эфрина A3, эфрина A4, эфрина A5, эфрина B1, эфрина B2, эфрина B3), эритропоэтина (EPO), фактора роста фибробластов (FGF) (например, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23), соматотропин плода крупного рогатого скота (FBS), члена семейства GDNF (например, нейротрофического фактора линии глиальных клеток

(GDNF), нейротурин, персефина, артемина), фактора дифференцировки роста-9 (GDF9), фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста гепатомы (HDGF), инсулина, инсулиноподобных факторов роста (например, инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) или IGF-2, интерлейкина (IL) (например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7), фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора, стимулирующего миграцию (MSF), белка, стимулирующего макрофаги (MSP или белка, подобного фактору роста гепатоцитов (HGFLP)), миостатина (GDF-8), нейрегулина (например, нейрегулина 1 (NRG1), NRG2, NRG3, NRG4), нейротрофина (например, нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), фактора роста нервов (NGF), нейротрофина-3 (NT-3), NT-4, плацентарного фактора роста (PGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF), реналазы (RNLS), фактора роста Т-клеток (TCGF), тромбопоэтина (TPO), трансформирующего фактора роста (например, трансформирующего фактора роста альфа (TGF- α), TGF- β , фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

[0518] В некоторых вариантах осуществление заболевания или расстройство представляет собой диабет. В некоторых вариантах осуществление заболевания или расстройство представляет собой заболевание глаз или нарушение зрения. В некоторых вариантах осуществления заболевания или нарушение представляет собой хоридеремию (CHM).

[0519] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в вену субъекта.

[0520] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[0521] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят субъекту с помощью интратекального введения. В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (СМЖ).

[0522] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят интратуморально в одну или более опухолей субъекта.

[0523] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят субъекту интраназально. В некоторых вариантах осуществления ВВ можно инсуфлировать в нос в форме для местного введения или системного введения. В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят в виде назального спрея.

[0524] В некоторых вариантах осуществления ВВ вводят субъекту внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в брюшину субъекта. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ лимфатических сосудах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ одном или более лимфатических узлах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в одном или более шейных лимфатических узлах, паховых лимфатических узлах, средостенных лимфатических узлах или грудных лимфатических узлах. В некоторых вариантах осуществления внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в поджелудочной железе.

[0525] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосомы, вводят субъекту с помощью периокулярного введения. В некоторых вариантах осуществления вводят инъекции в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственного средства включает пути субконъюнктивального, переднего субтеноновского, заднего субтеноновского и ретробульбарного введения.

[0526] В некоторых вариантах осуществления ВВ, например, экзосомы, вводят интраокулярно. Соответственно, в настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания глаз или нарушения зрения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение эффективного количества композиции, содержащей внеклеточную везикулу (ВВ), например, экзосому, по настоящему изобретению, которая содержит полезную нагрузку (например, АVV), субъекту, при этом композиция вводится интраокулярно.

[0527] В некоторых вариантах осуществления интраокулярное введение выбрано из группы, состоящей из интравитреального введения, внутрикамерного введения, субконъюнктивального введения, субретинального введения, субсклерального введения, интрахориоидального введения и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления интраокулярное введение включает инъекцию ВВ по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение представляет собой интравитреальную инъекцию.

[0528] В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение включает имплантацию устройства для доставки, содержащего ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки представляет собой устройство для интраокулярной доставки. В некоторых вариантах осуществления устройство для внутриглазной доставки является биоразлагаемым. В

некоторых вариантах осуществления устройство для интраокулярной доставки представляет собой интравитреальный имплант или склеральный имплант. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки представляет собой устройство для доставки с замедленным высвобождением.

[0529] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, по настоящему изобретению, предварительно обрабатывают внутривенным иммуноглобулином (IVIg) перед внутриглазным введением.

[0530] В некоторых вариантах осуществления заболевание глаз или нарушение зрения выбрано из группы, состоящей из макулярной дегенерации, катаракты, диабетической ретинопатии, глаукомы, амблиопии, косоглазии, ретинопатии или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления заболевание глаз или нарушение зрения представляет собой, например, возрастную макулярную дегенерацию (ВМД), хориоидальную неоваскуляризацию (ХНВ), отслоение сетчатки, диабетическую ретинопатию, атрофию пигментного эпителия сетчатки, гипертрофию пигментного эпителия сетчатки, окклюзию вены сетчатки (ОВС), инфекцию, интраокулярную опухоль, травму глаза, сухой глаз, конъюнктивит, неоваскулярную глаукому, ретинопатию недоношенных (РН), окклюзию хориоидальной вены сетчатки, макулярный отек, неоваскуляризацию переднего сегмента, неоваскуляризацию роговицы, субретинальный отек, кистозный отек желтого пятна, перфорацию сетчатки, васкулярные стрии, пигментный ретинит, болезнь Штутгарта, воспалительные заболевания глаз, рефрактерные аномалии глаз, кератоконус, лазер-индуцированную ВМД, оптическую нейропатию или возрастную катаракту.

[0531] В некоторых вариантах осуществления заболевание глаз или нарушение зрения представляет собой рак глаза. В некоторых вариантах осуществления рак глаза представляет собой вторичный рак глаза (например, вызванный раком молочной железы или метастазами рака легкого). В некоторых вариантах осуществления рак глаза представляет собой ретинобластому, внутриглазную меланому (например, увеальную меланому радужной оболочки, сосудистой оболочки или цилиарного тела или конъюнктивальную меланому), неходжкинскую первичную внутриглазную лимфому, медуллоэпителиому, хориоидальную гемангиому, хориоидальный метастаз, хориоидальный невус, хориоидальную остеому, конъюнктивальную саркому Капоши, эпibuльбарный дермоид, пингвекулу, птериgium, плоскоклеточную карциному или интраэпителиальную неоплазию конъюнктивы.

[0532] В некоторых вариантах осуществления ВМД представляет собой любую стадию заболевания сетчатки, включая, помимо прочего, ВМД категории 2 (ранняя стадия), категории 3 (промежуточная стадия) и категории 4 (поздняя стадия).

[0533] В одном варианте осуществления ВМД, как правило, подразделяют на два типа: сухая форма и влажная форма. Термин «сухая форма» относится к одному типу ВМД, при котором изменение сетчатки сопровождается образованием небольшого желтого налета (друзы) под макулой. В некоторых вариантах осуществления сухая форма ВМД часто сопровождается атрофией хориоидальных капилляров, фиброзом, утолщением мембраны Бруха и макулярной атрофией из-за атрофии пигментного эпителия сетчатки.

[0534] Термин «влажная форма» относится к ВМД с аномальными кровеносными сосудами, которые развиваются под сетчаткой вокруг макулы. Аномальные кровеносные сосуды, когда они разорваны и кровоточат, могут повредить макулу и сместить макулу с ее основания. Симптомы влажной формы ВМД включают деструкцию мембраны Бруха, стеклянную мембрану, хориоидальную неоваскуляризацию (ХНВ), сосудистую инвазию в субретинальную сосудистую оболочку, за которой следуют серозные или геморрагические круги. Это включает, но не ограничивается, сосудистую инвазию пигментного эпителия макулы сетчатки или субэпителиальную сосудистую инвазию, которая вызывает пластинчатое отслоение и в конечном итоге превращается в дискообразный рубец. По клиническим данным, атрофическая форма также может измениться на влажную форму.

[0535] В некоторых вариантах осуществления влажная ВМД также называется хориоидальной неоваскуляризацией (ХНВ). ХНВ (или влажная форма) может быть далее подразделен на «классическую» ХНВ и «скрытую» ХНВ. Классическая ХНВ обычно характеризуется яркой, сильно флуоресцентной, четко определенной областью, охватывающей фазу ангиографического перехода с утечкой в кадрах средней и поздней фазы. Скрытая ХНВ включает отслоение фиброваскулярного пигментного эпителия. Неоваскуляризация, которая развивается в результате ХНВ, имеет тенденцию к потере крови и жидкостей организма, образуя стигмы и вызывая симптомы метаморфоза. Этот новый кровеносный сосуд сопровождается ростом фиброзной ткани. Этот комплекс неоваскулярной и фиброзной ткани может разрушать фоторецепторы. Это поражение может продолжать расти по макуле и вызывать прогрессирующую, тяжелую и необратимую слепоту. Когда в одном глазу развивается ХНВ, аналогичные поражения ХНВ возникают на другом глазу с вероятностью около 50% в течение 5 лет.

[0536] В некоторых вариантах осуществления поражение ХНВ по настоящему изобретению включает скрытую ХНВ. В одном варианте осуществления поражение ХНВ

включает по существу или дополнительно состоит из классической ХНВ. В еще одном варианте осуществления поражение ХНВ включает как классическую, так и скрытую ХНВ.

[0537] Термин «макулярный отек» относится к кистозному макулярному отеку (КМО) или диабетическому макулярному отеку (ДМО) при глазных заболеваниях. КМО представляет собой глазное заболевание, которое поражает центральную сетчатку или макулу глаза. Когда это состояние присутствует, в макуле появляются множественные кистоподобные (кистозные) области жидкости, вызывающие набухание или отек сетчатки. КМО может сопровождать различные заболевания, такие как окклюзия вены сетчатки, увеит и/или диабет. КМО обычно возникает после операции по удалению катаракты. КМО возникает, когда в кровеносных сосудах сетчатки у пациентов с диабетом происходит диapedез в макулу. Этот диapedез приводит к тому, что макула утолщается и набухает, постепенно искажая остроту зрения. Хотя опухоль не может привести к слепоте, эффект может вызвать серьезную потерю центрального зрения.

[0538] Термин «глаукома» относится к главному заболеванию, при котором зрительный нерв повреждается определенным образом. Это может необратимо нарушить зрение в пораженном глазу и привести к слепоте, если его не лечить. Как правило, это связано с повышенным давлением жидкости в глазу (водянистая влага). Термин «офтальмогипертензия» используется для пациентов с постоянно повышенным внутриглазным давлением (ВГД) без какого-либо связанного с этим повреждения зрительного нерва. И наоборот, термин «глаукома с нормальным или низким давлением» используется для тех, у кого есть повреждение зрительного нерва и связанная с этим потеря поля зрения, но нормальное или низкое ВГД. Повреждение нерва включает потерю ганглиозных клеток сетчатки определенным образом. Есть много разных подтипов глаукомы, но все они могут рассматриваться как тип оптической нейропатии. Повышенное внутриглазное давление (например, выше 21 мм рт. ст. или 2,8 кПа) является наиболее важным и единственным изменяемым фактором риска глаукомы. Однако у некоторых может наблюдаться высокое глазное давление в течение многих лет и никогда не развиться повреждение, в то время как у других может развиться повреждение нервов при относительно низком давлении. Без лечения глаукома может привести к необратимому повреждению зрительного нерва и, как следствие, потере поля зрения, которая со временем может привести к слепоте.

[0539] Термин «диабетическая ретинопатия» включает ретинопатию (т.е. заболевание сетчатки), вызванную осложнениями диабета, которые в конечном итоге могут привести к слепоте. Диабетическая ретинопатия не может вызывать никаких симптомов, легких проблем со зрением или даже слепоты. Диабетическая ретинопатия является результатом

изменений микрососудов сетчатки. Вызванная гипергликемией гибель интрамуральных перicyтов и утолщение базальной мембраны приводят к функциональной недостаточности сосудистых стенок. Эти повреждения изменяют формирование гематоретинального барьера, а также делают кровеносные сосуды сетчатки более проницаемыми.

[0540] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, по настоящему изобретению, составленную для внутриглазного введения. Настоящее изобретение также обеспечивает набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосому, по настоящему изобретению, составленную для внутриглазного введения, и, необязательно, инструкции по применению в соответствии со способами, описанными в данном документе, например, инструкции по введению фармацевтической композиции для лечения конкретного глазного заболевания или нарушения.

[0541] Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны 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.* Патенты США №. 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) and in Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0542] Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0543] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Загрузка просвета с использованием каркасного белка

[0544] Был получен модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с внутриклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN) или с С-концом каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17) (фиг. 1). Каркасный белок (например, PTGFRN) или каркасный белок, содержащий минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17) был слит либо с N-концом, либо с С-концом, или с внутренним сайтом капсидного белка. AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, облегчая локализацию AAV в экзосоме.

Пример 2

Загрузка просвета с использованием партнера по связыванию химически индуцированного димера

[0545] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, FRB) (фиг. 2). Партнер по связыванию сливается либо с N-концом, либо с С-концом, или с внутренним сайтом капсидного белка (фиг. 2) или вставлен во внутреннюю петлю (например, VP1) в положении 455 (фиг. 3А-3В). Вставка выполняют таким образом, что FRB заменяет аминокислотный остаток T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 44) из VP1. Соответствующий партнер по связыванию (например, FKBP) затем связан с С-концом либо PTGFRN, либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии рапамицина для индукции димеризации FRB и FKBP), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0546] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, FKBP, кальциневрин А, CyP-Fas, GyrB, GAI, GID1, Snap-tag, HaloTag, eDHFR, BCL-xL или Fab (AZ1)). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в

положении 455). Вставку выполняют так, чтобы химически индуцированный партнер по связыванию ((например, FKBP, кальциневрин А, CyP-Fas, GyrB, GAI, GID1, Snap-tag, HaloTag, eDHFR, BCL-xL или Fab (AZ1))) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45) из VP1. Соответствующий партнер по связыванию ((например, FKBP, кальциневрин А, CyP-Fas, GyrB, GAI, GID1, Snap-tag, HaloTag, eDHFR, BCL-xL или Fab(AZ1))) затем связывается с С-концом PTGFRN (или его функционального фрагмента) или каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии FK1012 для индукции димеризации FKBP и FKBP; в присутствии FK506 для индукции димеризации FKBP и кальциневрина А; в присутствии FKCsA для индукции димеризации FKBP и CyP-Fas; в присутствии кумермицина для индукции димеризации GyrB и GyrB); в присутствии гиббереллина для индукции димеризации GAI и GID1); в присутствии NaXS для индукции димеризации Snap-tag и HaloTag); в присутствии TMP-НTag для индукции димеризации eDHFR и HaloTag); в присутствии ABT-737 для индукции димеризации BCL-xL и Fab (AZ1))), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0547] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, первый FKBP). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, первый FKBP) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45) из VP1. Соответствующий партнер по связыванию (например, второй FKBP) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии FK1012 для индукции димеризации первого FKBP и второго FKBP), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0548] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, FKBP или кальциневрина А). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, FKBP или кальциневрин

А) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45) из VP1. Соответствующий партнер по связыванию (например, FKBP или кальциневрин А) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии FK506 для индукции димеризации FKBP и кальциневрина А), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0549] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, FKBP или CyP-Fas). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, FKBP или CyP-Fas) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45) из VP1. Соответствующий партнер связывания (например, FKBP или CyP-Fas) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии FKCsA для индукции димеризации FKBP и CyP-Fas), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0550] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, GyrB). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, GyrB) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45 VP1). Соответствующий партнер по связыванию (например, GyrB) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии кумермицина для индукции димеризации GyrB и GyrB), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0551] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, GAI или GID1). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, GAI или GID1) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45 VP1). Соответствующий партнер по связыванию (например, GAI или GID1) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии гиббериллина для индукции димеризации GAI и GID1), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0552] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, Snap-tag или HaloTag). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, Snap-tag или HaloTag) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45 VP1). Соответствующий партнер по связыванию (например, Snap-tag или HaloTag) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии NaXS для индукции димеризации Snap-tag и HaloTag), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0553] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, eDHFR или HaloTag). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, eDHFR или HaloTag) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45 VP1). Соответствующий партнер по связыванию (например, eDHFR или HaloTag) затем связывается с С-концом либо PTGFRN (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего

минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии TMP-НTag для индукции димеризации eDHFR и HaloTag), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

[0554] Продуцируют модифицированный AAV, в котором капсидный белок AAV (например, VP1, VP2 или VP3) слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера (например, BCL-xL или Fab (AZ1)). Партнера по связыванию сливают либо с N-концом капсидного белка, либо вставляют во внутреннюю петлю (например, VP1 в положении 455). Вставка выполняется таким образом, что химически индуцированный партнер по связыванию (например, BCL-xL или Fab (AZ1)) заменяет аминокислотные остатки T₄₅₅ (относительно SEQ ID NO: 45) из VP1. Соответствующий партнер по связыванию (например, BCL-xL или Fab (AZ1)) затем связывается с C-концом либо PTGFRN -xL (или его функционального фрагмента), либо каркасного белка, содержащего минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). AAV продуцируют в клетках, совместно продуцирующих экзосомы, в присутствии химического вещества, необходимого для индукции димеризации (например, в присутствии ABT-737 для индукции димеризации BCL-xL и Fab (AZ1)), облегчая локализацию AAV в экзосоме.

Пример 3

Загрузка просвета с использованием рецепторов AAV

[0555] Получают модифицированную экзосому, при этом экзосома содержит каркасный белок (например, PTGFRN) или каркасный белок, содержащий минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), связанный с рецептором AAV (AAVR). AAVR может включать PKD1-2 и одноцепочечные антитела (фиг. 4). Для загрузки в просвет AAVR связан с внутриклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN) или с внутриклеточным доменом каркасного белка, содержащим минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). Экзосома продуцируют в клетках, совместно продуцирующих AAV, так что рецептор AAV способствует локализации AAV в экзосоме.

Пример 4

Загрузка на внешнюю поверхность с использованием антигенсвязывающего полипептида

[0556] Продуцируют модифицированную экзосому, содержащую каркасный белок (например, PTGFRN), связанный внеклеточным доменом с антигенсвязывающим доменом

(например, наноантителом; фиг. 5). Антигенсвязывающий домен (например, наноантитело) специфически связывает эпитоп на капсиде AAV. Экзосомы и AAV продуцируют и их очищают отдельно из разных продуцирующих клеток. Очищенные экзосомы, экспрессирующие наноантитело-каркасный белок, затем инкубируют с очищенными AAV для облегчения локализации AAV в экзосоме. Альтернативно, экзосома продуцируют в клетках, совместно продуцирующих AAV, так что наноантитело облегчает локализацию AAV в экзосоме.

Пример 5

Загрузка на внешнюю поверхность с использованием Fc

[0557] Продуцируют модифицированный AAV, содержащий капсидный белок (например, VP1, VP2 или VP3), связанный с областью Fc IgG. Получают модифицированную экзосому, содержащую каркасный белок (например, PTGFRN), связанный либо с FcγR1, либо с наноантителом, которое специфически связывает Fc (фиг. 6). FcγR1 или наноантитело связано с внеклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN). Экзосомы и AAV продуцируют и их очищают отдельно из разных продуцирующих клеток. Очищенные экзосомы, экспрессирующие слитые каркасные белки, затем инкубируют с очищенными AAV для облегчения локализации AAV в экзосоме. Альтернативно, экзосома продуцируют в клетках, совместно продуцирующих AAV, так что каркасный белок облегчает локализацию AAV в экзосоме.

Пример 6

Загрузка на внешнюю поверхность с использованием рецептора AAV

[0558] Была получена модифицированная экзосома, при этом экзосома содержит каркасный белок (например, PTGFRN), связанный с рецептором AAV (AAVR) (фиг. 7A). AAVR связан с внеклеточным доменом каркасного белка (например, PTGFRN). Экзосомы и AAV продуцируют и их очищают отдельно из разных продуцирующих клеток. Очищенные экзосомы, экспрессирующие слитые каркасный белки, (фиг. 7B) затем инкубируют с очищенными AAV для облегчения локализации AAV в экзосоме. Данные биослойной интерферометрии (Octet) демонстрируют, что экзосомы AAVR связываются с иммобилизованным AAV2, в то время как контрольные экзосомы не связываются (фиг. 8A-8B). Альтернативно, экзосома продуцируют в клетках, совместно продуцирующих AAV, так что каркасный белок облегчает локализацию AAV в экзосоме.

Пример 7

Слитые конструкции AAV сохраняют ядерную локализацию

[0559] Различные описанные в данном документе способы основаны на слиянии пептидной последовательности с капсидным белком AAV. Для оценки активности AAV были созданы модифицированные AAV, где N-конец капсидного белка VP2 AAV был связан с каркасным белком, содержащим минимальную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17) («Etp»), или с химически индуцируемому партнеру по связыванию FRB или FKBP. Etp-GFP представляет собой контроль с зеленым флуоресцентным белком (GFP), замещенным капсидным белком VP2. Чтобы подтвердить, что модифицированный AAV сохраняет способность локализоваться в ядре продуцирующих клеток, был проведен вестерн-блоттинг очищенной цитозольной фракции и очищенной ядерной фракции, выделенной из лизатов клеток HEK293. Как показано на фиг. 9А, равные количества клеточного лизата из цитозоля (слева) и ядра (справа) загружали в денатурирующий полиакриламидный гель. Вестерн-блоттинг для Etp-GFP, Etp-VP2 и FRB-VP2 с использованием антител, специфичных для метки α FLAG (экспрессированных на всех конструкциях; фиг. 9В) и α -гистону H4 (ядерный маркер; фиг. 9С) как в цитозоле, так и в лизатах ядра продемонстрировали, что эти конструкции экзотопа-VP2 экспрессируются и локализуются в ядре продуцирующих клеток. В частности, Etp-VP2 можно увидеть в лизате ядер с использованием зонда в виде антитела к α FLAG (фиг. 9С). Поскольку сборка капсида AAV и загрузка генома происходит в ядре, демонстрация того, что Etp-VP2 обогащается в ядре, обеспечивает возможность для создания функциональных капсидов AAV, которые несут пептидную метку, которая облегчает загрузку экзосом. Более того, AAV, несущий модификацию etp-VP2, должен иметь возможность проникать в ядро клеток-реципиентов, чтобы опосредовать перенос гена, поскольку эта модификация не ингибирует проникновение в ядро.

Пример 8

Экспрессия экзосомы-AAV в культуре

[0560] Клетки HEK293Т высевали и трансфицировали методом тройной трансфекции для экспрессии AAV. Этот способ, как правило, включает вектор для переноса гена (содержащий трансген, фланкированный элементами ITR), который должен быть упакован в частицы AAV, хелперный функциональный вектор AAV и вспомогательный функциональный вектор, который содержит последовательности для капсидных белков и белков, связанных с репликацией. На фиг. 10А-10D показаны результаты различных серотипов капсида AAV, трансфицированных в клетки HEK293Т, и клетки HEK293,

адаптированные для суспензионной культуры (HEK293SF). Конструкции экспрессии AAV были получены для тестирования экспрессии AAV. На фиг. 10A-10D показано, что капсиды AAV1, AAV2, AAV3, AAV5 и AAV6 обнаруживают при помощи вестерн-блоттинга. Сообщалось, что использованный зонд в виде антитела не распознает или не распознает AAV4, что может объяснить отсутствие сигнала на дорожках AAV4.

[0561] AAV9 культивировали в прикрепленных клетках HEK293T с использованием метода тройной трансфекции. Сбор фильтровали для удаления клеточного дебриса, а затем концентрировали и подвергали диафильтрации в забуференном 150 мМ растворе NaCl с фильтрацией в тангенциальном потоке. 50 мл клеточного супернатанта с концентрацией TFF (~ 10X) осаждали путем ультрацентрифугирования (133900 x g) в течение трех часов, и полученный осадок ресуспендировали в 1 мл PBS. Препараты наносили на градиент плотности Optiprep (среда на основе йодиксанола), используя ультрацентрифугирование 150000 x в течение 16 часов. После разделения фракции 1-10, как показано на фиг. 14A собирали, разбавляли 10X PBS и осаждали ультрацентрифугированием при 133900 g в течение 3 часов с последующим ресуспендированием в объеме 100 мкл PBS. Фракции анализировали с помощью вестерн-блоттинга для обнаружения капсидного белка AAV, подсчета частиц (анализа траекторий движения наночастиц (NTA)) для обнаружения экзосом и количественной ПЦР для обнаружения копий генома трансгена ДНК AAV. Некоторые фракции не содержали детектируемых частиц по анализу (согласно NTA). На фиг. 11A-11B подробно описаны результаты NTA (частиц/мл) и количественной ПЦР (копий гена/мл (КГ/мл)). Большая часть ДНК трансгена AAV была обнаружена в свободном AAV, не связанном с экзосомами в более плотных фракциях 8-10. При помощи вестерн-блоттинга капсида AAV можно увидеть на фиг. 12A-12C, показано, что полипептиды VP1, VP2 и VP3 наиболее заметно видны во фракциях 8, 9 и 10, где они не связаны с экзосомами. Фракции 1, 2, 3 и 5 также имеют определяемые VP1, VP2 и VP3 и, как было обнаружено, связаны с более высокой концентрацией экзосом в этих фракциях.

Пример 9

Очистка экзосомы-AAV

[0562] AAV9 культивировали в прикрепленных клетках HEK293T с использованием метода тройной трансфекции. Собранный материал фильтровали для удаления клеточного дебриса, а затем концентрировали и подвергали диафильтрации в растворе 150 мМ NaCl, pH 7,4 (~ 10 мСм/см), используя фильтрацию в тангенциальном потоке. Затем препарат очищали с помощью анионообменной хроматографии со связыванием и элюированием. Использовали элюирование с линейным градиентом (LGE) с увеличением концентрации

NaCl от 150 mM NaCl до 1 M NaCl в 20 объемах колонки. Затем колонку очищали 5 объемами колонки 2 M NaCl, pH 7,4 перед очисткой и дезинфекцией 1 M NaOH. Хроматограмма очистки представлена на фиг. 13. Фракции собирали по линейному градиенту и анализировали с помощью NTA для определения количества экзосом и размера частиц, как показано на фиг. 14A. Фракции 2, 3 и 4 демонстрируют самые высокие концентрации элюирования частиц, измеренные с помощью NTA. На фиг. 14B-14D показаны примеры изображений экзосом, загруженных AAV5 (фиг. 14B-14C) и AAV9 (фиг. 14D). Затем каждую фракцию очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Фракции 2, 3 и 4 элюировались в виде единственного пика около свободного объема с небольшими хвостами, что характерно для таких частиц, как экзосомы, и не содержит растворимых белков или AAV9, которые, как было показано, элюируются при объеме = 16,5 мл. Фракции 2, 3 и 4 также содержали самую высокую концентрацию частиц по данным NTA (фиг. 15).

Пример 10

Определение активности AAV9

[0563] AAV9-GFP и экзосома-AAV9-GFP выделяли из культуры адгезивных клеток HEK293, трансфицированных стандартной тройной плазмидной системы AAV, с использованием ультрацентрифугирования в градиенте плотности или анионообменной хроматографии, как описано в Примере 6. Каждый образец количественно оценивали в трех повторностях с помощью кПЦР для определения вирусных геномов на мл (КГ/мл). Клетки HeLa выращивали стандартными процедурами культивирования клеток и высевали в лунки 96-луночного планшета IncuCyte Zoom по 5000 клеток/лунка. Затем клетки трансфицировали фиксированным КГ/лунка (фиксированная MOI: 6000) со свободным или инкапсулированным AAV9-GFP в присутствии IgG к AAV. Концентрация IgG систематически варьировалась путем разведения в PBS для проведения исследования титрования дозы с половинным логарифмическим интервалом для концентраций IgG. После добавления образца в лунки экспрессию GFP, измеренную по интенсивности флуоресценции, определяли каждые три часа в течение четырех дней. Каждое условие было выполнено в трех повторностях. Репрезентативный профиль F7, образец, выделенный при анионообменной хроматографии, показан на фиг. 16.

[0564] Более быструю трансдукцию наблюдали с образцом экзосома-AAV («экзо») по сравнению с образцом только с AAV («AAV»). Достигнутая максимальная эффективность была также выше в образце экзосома-AAV («экзо»), приближаясь к 40000 единиц флуоресценции по сравнению с образцом только AAV («AAV»), который давал

приблизительно 15000 единиц флуоресценции. Эти данные по эффективности демонстрируют, что экзосома-AAV может соответствовать или превосходить эффективность и способность доставки гена свободного AAV9, даже когда он доставляется посредством инкапсуляции экзосом.

Пример 11

Устойчивость экзосом-AAV к нейтрализации антителами

[0565] Антитела к лекарственным средствам (ADA) являются обычной проблемой с доставкой биологических препаратов. Биологическим препаратам, для которых необходимы повторные введения (или даже однократное введение), может препятствовать иммунный ответ хозяина против биологического препарата. Чтобы определить, влияет ли ассоциация с экзосомами на устойчивость к ингибирующим антителам, свободный AAV9 и связанный с экзосомами AAV9, экспрессирующий GFP, инкубировали с клетками HeLa с диапазоном нАт к AAV9. Ассоциированный с экзосомами AAV9 значительно превосходил свободный AAV9 в двух временных точках и при всех концентрациях нАт (фиг. 17A). Устойчивость конструкций экзосома-AAV (несущих трансген GFP) к моноклональным антителам к AAV по сравнению со свободным AAV9 дополнительно исследовали, как описано в примере 10, и ее можно увидеть на фиг. 17B. Контрольный образец только AAV был протестирован против серийных разведений моноклонального антитела (мкАт) к AAV, и был измерен сигнал GFP. Сигнал GFP указывает на успешное инфицирование AAV и доставку трансгена GFP в клетки-хозяева. Результаты демонстрируют, что свободный AAV9 проявляет значительную инфекционность при серийном разведении мкАт к AAV в 1000 раз или меньше. При сопоставлении по MOI, как определено с помощью оценки копий гена методом кПЦР, образцы экзосомы-AAV сравнивали со сопоставленными образцами свободного AAV9-MOI. Такие образцы, как Chrom. 3, Chrom. 5, и Chrom. 7, продемонстрировали значительную инфекционность даже в присутствии моноклонального антитела к AAV в 100-кратном разведении. Через 100 часов все из Chrom. 3, Chrom. 4, и Chrom. 5 показали, что сигналы GFP значительно превышают 20000, что указывает на устойчивую способность к заражению. Этот сигнал значительно больше, чем сигнал для 100-кратного разведения, наблюдаемый в сопоставленном по MOI образце свободного AAV9, что указывает на то, что свободный AAV9 был нейтрализован мкАт к AAV, а конструкции экзосома-AAV – нет. На ФИГ. 18A-18D, данные для одного из образцов, полученных в результате анионообменной хроматографии, F7, были извлечены, чтобы обеспечить прямое сравнение с образцом, содержащим только AAV, в зависимости от титра нейтрализующих антител. Экзосома-AAV демонстрирует более быструю кинетику трансдукции, повышенную эффективность и усиленное уклонение от иммунитета по

сравнению с AAV в $t = 24, 48, 72$ и 96 часов после добавления образца в культуру клеток HeLa.

Пример 12

Биораспределение AAV9 и экзосом после интравитреального введения у крыс

[0566] Характеристики материалов и лекарственной формы: AAV9 и экзосомы находятся в готовом к применению составе. Предложен два флакона с 40 мкл AAV9 и 40 мкл экзосом. Также предложен внутривенный иммуноглобулин (IVIg) (флакон 25 мг; порошковая форма) для добавления в один флакон с AAV9 и один флакон с экзосомами, используя следующий способ: (i) восстановить 25 мг порошка IVIg в 0,5 мл PBS (целевая концентрация 50 мг/мл) и (ii) с исходным раствором 50 мг/мл IVIg выполнить следующее: добавить 0,8 мкл IVIg в один флакон AAV, перемешать путем пипетирования и инкубировать при 4°C в течение по меньшей мере 1 часа перед инъекцией; и добавить 0,8 мкл IVIg в один флакон с экзосомами, перемешать путем пипетирования и инкубировать при 4°C в течение по меньшей мере 1 часа перед инъекцией.

[0567] *Животные модели:* Крысы CD (возраст ~ 6 -8 недель) будут использоваться для исследования ($n = 15$ купленных, $n = 10$ в период исследования).

[0568] *Дизайн визуализирующего исследования:*

[0569] (1) Введение дозы:

a. Инъекция и маршрут:

- i. Группа 1, $n=2$: Интравитреальное введение (~ 5 мкл) PBS
- ii. Группа 2, $n=2$: Интравитреальное введение (~ 5 мкл) AAV9
- iii. Группа 3, $n=2$: Интравитреальная инъекция (~ 5 мкл) AAV9, предварительно инкубированного с IVIg.
- iv. Группа 4, $n=2$: Интравитреальная инъекция (~ 5 мкл) экзосомы-AAV9
- v. Группа 5, $n=2$: Интравитреальная инъекция (~ 5 мкл) экзосомы-AAV9, предварительно инкубированной с IVIg.

b. В оба глаза вводят контрольный / исследуемый препарат (см. дозовую группу для конкретных соединений)

[0570] (2) Сбор тканей:

- 1. Конечный момент времени для сбора ткани будет через 2 недели после инъекции каждого контрольного / исследуемого препарата. Будут собраны следующие ткани: Глаза (левый и правый)
- 2. Оба глаза будут взяты у всех животных, мгновенно заморожены и храниться при -20°C до отправки спонсору.

ТАБЛИЦА 7: Краткое описание дизайна исследования.

Группа	Кол-во животных и их тип	Контрольный/исследуемый препарат	Объем и путь введения инъекции	Сбор, Временная точка	Собранные ткани
1	2 крысы CD	ФСБ	5 мкл, IVT	2 недели после инъекции	Глаза (правые и левые)
2	2 крысы CD	AAV9	5 мкл, IVT	2 недели после инъекции	Глаза (правые и левые)
3	2 крысы CD	AAV9 + IVIg	5 мкл, IVT	2 недели после инъекции	Глаза (правые и левые)
4	2 крысы CD	Экзосома-AAV9	5 мкл, IVT	2 недели после инъекции	Глаза (правые и левые)
5	2 крысы CD	Экзосома-AAV9 + IVIg	5 мкл, IVT	2 недели после инъекции	Глаза (правые и левые)

IVT - интравитреальный

Пример 13

Защита AAV9 от нейтрализующих антител путем инкапсуляции экзосом

[0571] Нейтрализующие антитела ограничивают целевые популяции пациентов, потому что от 20% до 50% уже имеют нейтрализующие антитела к AAV. Повторное дозирование AAV в настоящее время невозможно, поскольку после воздействия AAV образуются перекрестно-реактивные антитела с высоким титром. Соответственно, AAV были защищены от нейтрализующих антител инкапсуляцией экзосом (стохастическая нагрузка, например, случайная локализация). Как показано на фиг. 19, когда AAV9 был защищен экзосомами, на сигнал люциферазы не повлияло увеличение концентраций нейтрализующих антител. Напротив, сигнал люциферазы значительно ослабевал в ответ на увеличение концентрации нейтрализующих антител. Даже при самых низких протестированных концентрациях антител защитный эффект экзосом был значительным, о

чем свидетельствует разница в сигнале люциферазы, который был 150 раз больше для образца, инкапсулированном экзосомами (примерно 300000 ОЕЛ против около 2000).

Пример 14

Введение мышам экзосомы-AAV увеличивает экспрессию кодируемого AAV репортера

[0572] Для проверки экспрессии репортерного гена, кодируемого AAV, ассоциированным с экзосомой, крысам CD (в возрасте 6-8 недель) интравитреально вводили 5 мкл свободного AAV9 или экзосому-AAV9 (~ 1e10 мкг; проиллюстрировано на фиг. 21A), кодирующий секретируемые nanoLuc (n = 4 животных, 2 глаза на животное). Через две недели после введения глаза извлекали, замораживали и затем гомогенизировали. Измеряли уровни люциферазы и общего белка. В группе экзосома-AAV наблюдается тенденция к более высокой экспрессии трансгена по сравнению с группой свободного AAV9 (фиг. 21B-21C).

[0573] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в данной заявке, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения путем ссылки для всех целей.

[0574] Несмотря на то, что были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, приведенное выше описание не является ограничивающим. Понятно, что различные изменения могут быть сделаны без отклонения от сущности и объема изобретения. Многие изменения станут очевидными для специалистов в данной области техники после рассмотрения этого описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Внеклеточная везикула (ВВ), содержащая аденоассоциированный вирус (AAV – англ.: adeno-associated virus) и каркасный белок, причем AAV находится в просвете ВВ, и при этом AAV во ВВ имеет измененные свойства по сравнению с AAV в отдельности.
2. ВВ по п. 1, в которой измененное свойство включает лучший терапевтический эффект, чем AAV в отдельности.
3. ВВ по п. 1 или 2, в которой лучший терапевтический эффект включает одно или более из более высокой инфективности, более высокой активности, более высокой эффективности, более быстрой кинетики трансдукции и толерантности к ускользанию от иммунного надзора.
4. ВВ по любому из пп. 1–3, в которой измененные свойства AAV позволяют вводить AAV субъекту двумя или более дозами, при этом инфективность и/или активность AAV сохраняется в последующих дозах.
5. ВВ, содержащая AAV, причем ВВ содержит каркасный белок и по меньшей мере 5 AAV, при этом по меньшей мере 5 AAV находятся в просвете ВВ.
6. ВВ по п. 5, содержащая по меньшей мере 6 AAV, по меньшей мере 7 AAV, по меньшей мере 8 AAV, по меньшей мере 9 AAV, по меньшей мере 10 AAV, по меньшей мере 11 AAV, по меньшей мере 12 AAV, по меньшей мере 13 AAV, по меньшей мере 14 AAV, по меньшей мере 15 AAV, по меньшей мере 16 AAV, по меньшей мере 17 AAV, по меньшей мере 18 AAV, по меньшей мере 19 AAV, по меньшей мере 20 AAV, по меньшей мере 201 AAV, по меньшей мере 22 AAV, по меньшей мере 23 AAV, по меньшей мере 24 AAV, по меньшей мере 25 AAV, по меньшей мере 26 AAV, по меньшей мере 27 AAV, по меньшей мере 28 AAV, по меньшей мере 29 AAV, по меньшей мере 30 AAV, по меньшей мере 35 AAV, по меньшей мере 40 AAV, по меньшей мере 45 AAV, по меньшей мере 50 AAV, по меньшей мере 60 AAV, по меньшей мере 70 AAV, по меньшей мере 80 AAV, по меньшей мере 90 AAV или по меньшей мере 100 AAV в просвете ВВ.
7. ВВ по п. 5, содержащая от по меньшей мере около 5 AAV до по меньшей мере 100 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 75 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 50 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 45 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 40 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 35 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 30 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 25 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 20 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 15 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере

около 10 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 100 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 75 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 50 AAV, от по меньшей мере 5 AAV до по меньшей мере около 45 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 40 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 35 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 30 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 25 AAV, от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 20 AAV, или от по меньшей мере 10 AAV до по меньшей мере около 15 AAV в просвете BB.

8. BB по любому из пп. 5–7, содержащая от по меньшей мере около 5 AAV до по меньшей мере около 20 AAV.

9. BB по любому из пп. 1–8, в которой BB содержит билипидную мембрану, имеющую поверхность просвета и внешнюю поверхность, при этом по меньшей мере один из AAV не связан с поверхностью просвета BB.

10. BB по любому из пп. 1–8, в которой BB содержит билипидную мембрану, имеющую поверхность просвета и внешнюю поверхность, при этом по меньшей мере один из AAV связан с поверхностью просвета BB.

11. BB по 10, в которой по меньшей мере один AAV связан с поверхностью просвета BB ковалентной связью или нековалентной связью.

12. BB по п. 10 или 11, в которой по меньшей мере один AAV связан с поверхностью просвета BB ковалентной связью и нековалентной связью.

13. BB по любому из пп. 1–12, в которой AAV связан с каркасным белком.

14. BB по любому из пп. 1–13, в которой каркасный белок содержит N-концевой домен (ND – англ.: N terminus domain) и эффекторный домен (ED – англ.: effector domain), при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета BB.

15. BB по п. 14, в которой ND связан с поверхностью просвета BB посредством миристоилирования.

16. BB по п. 14 или 15, в которой ED связан с поверхностью просвета BB посредством ионного взаимодействия.

17. BB по любому из пп. 14–16, в которой ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более основных аминокислот в последовательности, при этом основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg, His и любой их комбинации.

18. BB по п. 17, в которой основная аминокислота представляет собой (Lys) n , где n представляет собой целое число от 1 до 10.

19. BB по любому из пп. 14–18, в которой ED включает Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

20. BB по любому из пп. 14–19, в которой 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 включает основную аминокислоту.

21. BB по п. 20, в которой:

- i. X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- ii. X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- iii. X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- iv. X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His; или
- v. любой комбинации (i)–(iv).

22. BB по любому из пп. 14–21, в которой ND 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.

23. BB по любому из пп. 18–22, в которой X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

24. BB по любому из пп. 14–23, в которой ND и ED соединены посредством линкера.

25. BB по п. 24, в которой линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.

26. BB по любому из пп. 14–25, в которой ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17),

(ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20), (v) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21) или (vi) любой их комбинации.

27. BB по п. 26, в которой ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29), (ix) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 30), (x) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 31) и (xi) любой их комбинации.

28. BB по любому из пп. 14–27, в которой ND содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17).

29. BB по любому из пп. 1–28, в которой каркасный белок имеет длину 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.

30. BB по любому из пп. 1–29, в которой каркасный белок содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSKKKKKGYS GG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSKKKKKSGSGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

31. BB по любому из пп. 14–30, в которой каркасный белок не содержит Met на N-конце.

32. ВВ по любому из пп. 14–31, в которой каркасный белок содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка.
33. ВВ по п. 32, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly.
34. ВВ по п. 32 или 33, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим.
35. ВВ по п. 33 или 34, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина.
36. ВВ по любому из пп. 1–35, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую на 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 на около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.
37. ВВ по любому из пп. 14–36, в которой ВВ дополнительно содержит второй каркасный белок, который включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигин (белок BSG); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класс белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазу N (ANPEP), неприлизин (мембранную металлоэндопептидазу; MME), член 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилин-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин, LAMP2, LAMP2B, их фрагменты и любую их комбинацию.
38. ВВ по любому из пп. 1–37, в которой AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с каркасным белком и/или вторым каркасным белком.
39. ВВ по п. 38, в которой по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3.
40. ВВ по п. 38 или 39, в которой капсидный белок AAV содержит VP2.
41. ВВ по любому из пп. 38–40, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с каркасным белком и/или вторым каркасным белком.
42. ВВ по любому из пп. 38–41, в которой каркасный белок слит с N-концом VP2.

43. ВВ по п. 41 или 42, в которой количество VP2, слитых с каркасным белком, меньше количества из по меньшей мере одного VP2, не слитого с каркасным белком.
44. ВВ по п. 41 или 42, в которой количество VP2, слитых с каркасным белком, в около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз, около 10 раз, около 11 раз, около 12 раз, около 13 раз, около 14 раз, около 15 раз, около 16 раз, около 17 раз, около 18 раз, около 19 раз, около 20 раз, около 21 раз, около 22 раза, около 23 раза, около 24 раза, около 25 раз, около 30 раз, около 35 раз, около 40 раз, около 46 раз, около 50 раз или в около 100 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP2, не слитого с каркасным белком.
45. ВВ по любому из пп. 1–13, в которой каркасный белок представляет собой трансмембранный белок I типа или трансмембранный белок II типа.
46. ВВ по п. 45, в которой трансмембранный белок I типа включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигин (белок BSG); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класс белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазу N (ANPEP), неприлизин (мембранную металлоэндопептидазу; MME), член 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилин-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин, LAMP2, LAMP2B, их фрагменты и любую их комбинацию.
47. ВВ по п. 45 или 46, в которой С-конец трансмембранного белка I типа или N-конец трансмембранного белка II типа связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера.
48. ВВ по любому из пп. 14–37, в которой каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера.
49. ВВ по п. 47 или 48, в которой партнер по связыванию химически индуцированного димера включает один из партнеров по связыванию, выбранный из группы; состоящей из (i) FKBP и FKBP (FK1012); (ii) FKBP и кальциневрина-A (CNA) (FK506); (iii) FKBP и CyP-Fas (FKCsA); (iv) FKBP и FRB (рапамицин); (v) GyrB и GyrB (кумермицин); (vi) GAI и GID1 (гиббереллин); (vii) Snap-tag и HaloTag (HaXS); (viii) eDHFR и HaloTag (TMP-HTag); и (ix) BCL-xL и Fab (AZ1) (ABT-737).

50. ВВ по любому из пп. 47–49, в которой химически индуцированный димер включает слитый комплекс FRB-FKBP.
51. ВВ по п. 50, в которой FRB представляет собой FRB mTOR.
52. ВВ по любому из пп. 47–51, в которой AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с одним из партнеров по связыванию химически индуцированного димера, тем самым образуя димерный комплекс, когда партнеры по связыванию входят в контакт с химическим соединением.
53. ВВ по п. 52, в которой по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3.
54. ВВ по п. 52 или 53, в которой капсидный белок AAV содержит VP2.
55. ВВ по любому из пп. 52–54, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера.
56. ВВ по п. 55, в которой количество VP2, слитых с партнером по связыванию химически индуцированного димера, меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP, который не слит с партнером по связыванию химически индуцированного димера.
57. ВВ по п. 56, в которой количество VP2, связанных с партнером по связыванию химически индуцированного димера, в около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз, около 10 раз, около 11 раз, около 12 раз, около 13 раз, около 14 раз, около 15 раз, около 16 раз, около 17 раз, около 18 раз, около 19 раз, около 20 раз, около 21 раз, около 22 раза, около 23 раза, около 24 раза, около 25 раз, около 30 раз, около 35 раз, около 40 раз, около 46 раз, около 50 раз или в около 100 раз меньше, чем количество из по меньшей мере одного VP2, не слитого с партнером по связыванию.
58. ВВ по п. 52 или 53, в которой партнер по связыванию химически индуцированного димера вставлен во внутреннюю петлю капсидного белка AAV.
59. ВВ по п. 58, в которой внутренняя петля содержит последовательность GTTTQSR (SEQ ID NO: 43).
60. ВВ по п. 58, в которой внутренняя петля содержит аминокислотные остатки 453–459 из SEQ ID NO: 44.
61. ВВ по п. 59 или 60, в которой по меньшей мере одна аминокислота внутренней петли заменена партнером по связыванию химически индуцированного димера.
62. ВВ по любому из пп. 30–46, в которой каркасный белок связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера посредством линкера.
63. ВВ по любому из пп. 38–44 или 52–62, в которой капсидный белок AAV связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера посредством линкера.

64. ВВ по п. 62 или 63, в которой линкер содержит ковалентную связь или одну или более аминокислот.
65. ВВ по любому из пп. 62–64, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.
66. ВВ по любому из пп. 1–37 и 45–47, в которой каркасный белок связан с аффинным агентом, который специфически связывается с AAV.
67. ВВ по п. 66, в которой аффинный агент представляет собой рецептор AAV, наноантитело, верблюжье антитело, IgNAR, однодоменное антитело, антитело или его антигенсвязывающую часть, любой его функциональный фрагмент или любую их комбинацию.
68. ВВ по п. 67, в которой его антигенсвязывающая часть включает одноцепочечный Fab.
69. ВВ по любому из пп. 66–68, в которой аффинный агент связывается с одним или более капсидными белками AAV.
70. ВВ по п. 69, в которой один или более капсидных белков AAV представляют собой белки, активирующие сборку AAV.
71. ВВ по п. 70, в которой аффинный агент не связывается с мономером капсидного белка AAV.
72. ВВ по любому из пп. 1–71, в которой AAV дополнительно содержит генетическую кассету, содержащую гетерологичную последовательность, кодирующую представляющую интерес ген.
73. ВВ по п. 72, в которой генетическая кассета кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из секретируемого белка, рецептора, структурного белка, сигнального белка, сенсорного белка, регуляторного белка, транспортного белка, запасного белка, защитного белка, двигательного белка, фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, цитокина, хемокина, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, рецептора липопротеинов низкой плотности, альфа-глюкозидазы, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе или любой их комбинации.
74. ВВ по п. 72 или 73, в которой генетическая кассета кодирует белок фактора VIII или белок фактора IX.
75. ВВ по п. 74, в которой белок фактора VIII представляет собой фактор VIII дикого типа, фактор VIII с удаленным В-доменом, слитый белок фактора VIII или любую их комбинацию.

76. BB по п. 72 или 73, в которой представляющий интерес ген кодирует компонент A Rab-геранилгеранилтрансферазы 1 (REP1 – англ.: Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1).
77. BB по п. 76, в которой REP1 содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 45.
78. BB по любому из пп. 1–77, в которой AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, змеиного AAV, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, синтетического AAV и любой их комбинации.
79. AAV во BB по любому из пп. 1–78.
80. AAV, содержащий VP2, связанный с каркасным белком, содержащим 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 включает основную аминокислоту.
81. AAV по п. 80, в котором каркасный белок представляет собой каркасный белок или второй каркасный белок по любому из пп. 14–37.
82. AAV, содержащий VP2, связанный с партнером по связыванию химически индуцированного димера.
83. AAV по п. 82, в котором партнер по связыванию химически индуцированного димера включает любого из партнеров по связыванию, указанных в любом из пп. 49–51.
84. AAV, содержащий один или более капсидных белков, специфически связанных с аффинным агентом.
85. AAV по п. 84, в котором аффинный агент представлен в любом из пп. 67–71.
86. Внеклеточная везикула (BB), содержащая (i) аденоассоциированный вирус (AAV) и (ii) каркасный белок, причем AAV связан с каркасным белком на внешней поверхности BB.
87. BB по п. 86, в которой каркасный белок содержит внеклеточный домен, и при этом AAV связан с внеклеточным доменом каркасного белка.

88. ВВ по п. 86 или 87, в которой каркасный белок дополнительно содержит трансмембранную область, при этом трансмембранная область прикреплена к мембране ВВ.
89. ВВ по любому из пп. 86–88, в которой ВВ дополнительно содержит иммуномодулятор.
90. ВВ по любому из пп. 86–89, в которой каркасный белок включает гетерологичный полипептид, при этом гетерологичный полипептид слит с внеклеточным доменом каркасного белка, и при этом гетерологичный полипептид связывается с ААV.
91. ВВ по любому из пп. 86–90, в которой каркасный белок представляет собой трансмембранный белок I типа или трансмембранный белок II типа.
92. ВВ по п. 90 или 91, в которой гетерологичный полипептид слит с N-концом или C-концом внеклеточного домена каркасного белка.
93. ВВ по любому из пп. 90–92, в которой гетерологичный полипептид содержит рецептор, лиганд, антигенсвязывающий фрагмент, субстрат, его фрагмент или их комбинацию; и при этом гетерологичный полипептид специфически взаимодействует с одним или более белками на поверхности ААV.
94. ВВ по п. 93, в которой гетерологичный полипептид содержит антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из антигенсвязывающего фрагмента антитела, верблюжьего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, одноцепочечного FАВ, наноантитела, акульего IgNAR и их комбинации.
95. ВВ по п. 93 или 94, в которой антигенсвязывающий фрагмент включает наноантитело.
96. ВВ по любому из пп. 93–95, в которой антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает один или более белков на поверхности ААV.
97. ВВ по любому из пп. 93–96, в которой один или более белков на поверхности ААV включают капсидный белок, выбранный из группы, состоящей из VP1, VP2, VP3 и любой их комбинации.
98. ВВ по любому из пп. 93–97, в которой один или более белков на поверхности ААV представляют собой отличную от ААV последовательность, слитую с капсидным белком ААV.
99. ВВ по п. 98, в которой капсидный белок выбран из VP1, VP2, VP3 и любой их комбинации.
100. ВВ по п. 99, в которой отличная от ААV последовательность слита с VP2.

101. ВВ по п. 99 или 100, в которой отличная от AAV последовательность слита с N-концом VP2.
102. ВВ по п. 99 или 101, в которой отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP2.
103. ВВ по п. 99, в которой отличная от AAV последовательность слита с VP3.
104. ВВ по п. 99 или 103, в которой отличная от AAV последовательность слита с N-концом VP3.
105. ВВ по п. 99 или 103, в которой отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP3.
106. ВВ по п. 99, в которой отличная от AAV последовательность слита с VP1.
107. ВВ по п. 106, в которой отличная от AAV последовательность слита с расположенной на внутренней поверхности петель VP1.
108. ВВ по любому из пп. 86–93, в которой
- (i) каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим Fc-рецептор; и
 - (ii) AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с областью Fc константной области иммуноглобулина (Fc).
109. ВВ по п. 108, в которой Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор, выбранный из Fc-гамма-рецептора I (FcγR1), FcγRIIA, FcγRIIB, FcγIIIA и FcγIIIB; и при этом Fc представляет собой Fc IgG.
110. ВВ по п. 108 или 109, в которой Fc-рецептор представляет собой FcγR1, а Fc представляет собой Fc IgG.
111. ВВ по п. 108, в которой Fc-рецептор представляет собой Fc-альфа-рецептор I (FcαR1), и при этом Fc представляет собой Fc IgA.
112. ВВ по п. 108, в которой Fc-рецептор представляет собой Fc-эпсилон-рецептор, выбранный из Fc-эпсилон-рецептора I (FcεRI) и FcεRII, и при этом Fc представляет собой Fc из IgE.
113. ВВ по любому из пп. 86–93, в которой
- (i) каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим наноантитело; и
 - (ii) AAV содержит по меньшей мере один капсидный белок, слитый с областью Fc константной области иммуноглобулина (Fc).
114. ВВ по п. 113, в которой наноантитело специфически связывается с Fc, слитым с капсидным белком.

115. ВВ по любому из пп. 108–114, в которой по меньшей мере один капсидный белок выбран из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3.
116. ВВ по любому из пп. 108–115, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP2, слитый с Fc.
117. ВВ по п. 116, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP2, который не слит с Fc.
118. ВВ по любому из пп. 108–117, в которой Fc слит с N-концом по меньшей мере одного VP2.
119. ВВ по любому из пп. 108–117, в которой Fc слит с расположенной на внутренней поверхности петель по меньшей мере одного VP2.
120. ВВ по любому из пп. 108–119, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP3, слитый с Fc.
121. ВВ по п. 120, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP3, который не слит с Fc.
122. ВВ по любому из пп. 108–121, в которой Fc слит с N-концом по меньшей мере одного VP3.
123. ВВ по любому из пп. 108–121, в которой Fc слит с расположенной на внутренней поверхности петель по меньшей мере одного VP3.
124. ВВ по любому из пп. 108–123, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP1, слитый с Fc.
125. ВВ по любому из пп. 108–123, в которой AAV содержит по меньшей мере один VP1, который не слит с Fc.
126. ВВ по п. 124, в которой Fc слит с расположенной на поверхности петель VP1.
127. ВВ по любому из пп. 102, 105, 107, 119, 123 и 126, в которой расположенная на поверхности петля содержит последовательность GTTTQSR (SEQ ID NO: 43).
128. ВВ по любому из пп. 102, 105, 107, 119, 123 и 126, в которой расположенная на поверхности петля содержит аминокислотные остатки с 453 по 459 VP1.
129. ВВ по любому из пп. 102, 105, 107, 119, 123 и 126–128, в которой по меньшей мере одна аминокислота расположенной на поверхности петли заменена на Fc.
130. ВВ по любому из пп. 102, 105, 107, 119, 123 и 126–129, в которой расположенная на поверхности петля заменена на Fc.
131. ВВ по любому из пп. 86–96, в которой каркасный белок слит с антигенсвязывающим фрагментом, при этом антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает антиген на поверхности AAV.

132. ВВ по любому из пп. 86–93, в которой каркасный белок слит с гетерологичным полипептидом, содержащим рецептор AAV.
133. ВВ по любому из пп. 86–132, в которой AAV дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген.
134. ВВ по п. 133, в которой представляющий интерес ген кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из секретируемого белка, рецептора, структурного белка, сигнального белка, сенсорного белка, регуляторного белка, транспортного белка, запасного белка, защитного белка, двигательного белка, фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, цитокина, хемокина, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, рецептора липопротеинов низкой плотности, альфа-глюкозидазы, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе или любой их комбинации.
135. ВВ по п. 133 или 134, в которой представляющий интерес ген кодирует белок фактора VIII или белок фактора IX.
136. ВВ по п. 135, в которой белок фактора VIII представляет собой фактор VIII дикого типа, фактор VIII с удаленным В-доменом, слитый белок фактора VIII или любую их комбинацию.
137. 52. ВВ по п. 133 или 134, в которой представляющий интерес ген кодирует компонент A Rab-геранилгеранилтрансферазы 1 (REP1)
138. 53. ВВ по п. 137, в которой REP1 содержит аминокислотную последовательность, которая на 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 на около 100% идентична SEQ ID NO: 45.
139. ВВ по любому из пп. 86–138, в которой AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, змеиного AAV, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, синтетического AAV и любой их комбинации.
140. ВВ по любому из пп. 86–139, в которой каркасный белок выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); члена 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); члена 8 суперсемейства

иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4), CD13, аминопептидазы N (ANPEP), неприлизина (мембранной металлоэндопептидазы; MME), члена 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилина-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B, их фрагментов и любой их комбинации.

141. ВВ по любому из пп. 86–140, в которой каркасный белок представляет собой PTGFRN.

142. ВВ по п. 87, в которой каркасный белок содержит N-концевой домен, эффекторный домен и трансмембранный домен, причем ND является миристоилированным, и при этом N-концевой домен (ND) и/или эффекторный домен (ED) связаны с поверхностью просвета ВВ.

143. ВВ по п. 142, в которой ED связан с поверхностью просвета ВВ посредством ионного взаимодействия.

144. ВВ по п. 142 или 143, в которой ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более основных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в последовательности, при этом основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg, His и любой их комбинации.

145. ВВ по п. 144, в которой основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 10.

146. ВВ по любому из пп. 142–145, в которой ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

147. ВВ по любому из пп. 142–146, в которой 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 представляет собой аминокислоту; и где X6 включает основную аминокислоту.

148. ВВ по п. 147, в которой:

- (i) X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His;
- (ii) X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iii) X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;

- (iv) X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met; или
 - (v) любой комбинации из (i)-(iv).
149. ВВ по любому из пп. 142–148, 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.
150. ВВ по любому из пп. 147–149, в которой X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.
151. ВВ по любому из пп. 142–150, в которой ND и ED соединены посредством линкера.
152. ВВ по п. 151, в которой линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.
153. ВВ по любому из пп. 142–152, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20), (v) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21) или (vi) любой их комбинации.
154. ВВ по п. 153, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29), (ix) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 30), (x) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 31) и (xi) любой их комбинации.
155. ВВ по любому из пп. 142–154, в которой С-конец каркасного белка и/или второго каркасного белка связан с капсидным белком AAV.
156. ВВ по любому из пп. 1–78 и 86–155, которая является экзосомой.

157. Аденоассоциированный вирус (AAV), содержащий капсид, причем капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, выбранный из группы, состоящей из VP1, VP2 и VP3; при этом по меньшей мере один капсидный белок связан с каркасным белком.

158. AAV по п. 157, в котором каркасный белок выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена 2 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF2); члена 3 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF3); члена 8 суперсемейства иммуноглобулинов (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), CD13, аминопептидазы N (ANPEP), неприлизина (мембранной металлоэндопептидазы; MME), члена 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1), нейропилина-1 (NRP1), CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорных белков, лактадгерина, LAMP2, LAMP2B, их фрагментов и любой их комбинации.

159. AAV по п. 157, в котором каркасный белок содержит N-концевой домен, эффекторный домен и трансмембранный домен, причем ND является миристоилированным, и при этом N-концевой домен (ND) и/или эффекторный домен (ED) связаны с поверхностью просвета ВВ.

160. AAV по п. 159, в котором ED связан с поверхностью просвета ВВ посредством ионного взаимодействия.

161. AAV по п. 159 или 160, в котором ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более основных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в последовательности, при этом основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Asp, His и любой их комбинации.

162. AAV по п. 161, в котором основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 10.

163. AAV по любому из пп. 159–162, в котором ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

164. AAV по любому из пп. 159–163, в котором 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 представляет собой аминокислоту; и где X6 включает основную аминокислоту.

165. AAV по п. 164, в котором:

- (i) X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Asp и His;
- (ii) X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iii) X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met; или
- (v) любой комбинации из (i)–(iv).

166. AAV по любому из пп. 160–165, в котором 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.

167. AAV по любому из пп. 164–166, в котором X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

168. AAV по любому из пп. 159–167, в котором ND и ED соединены посредством линкера.

169. AAV по п. 168, в котором линкер содержит пептидную связь или одну или более аминокислот.

170. AAV по любому из пп. 157–169, в котором каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAkk (SEQ ID NO: 20), (v) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21) или (vi) любой их комбинации.

171. AAV по п. 170, в котором каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ

ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29), (ix) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 30), (x) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 31) и (xi) любой их комбинации.

172. AAV по любому из пп. 157–171, который связан с внешней поверхностью внеклеточной везикулы (BB).

173. AAV по любому из пп. 157–172, который связан с внешней поверхностью BB, при этом каркасный белок или второй каркасный белок связан с BB.

174. BB по п. 66, в которой каркасный белок связан с аффинным агентом, который специфически связывается с AAV посредством расщепляемого линкера.

175. Фармацевтическая композиция, содержащая BB по любому из пп. 1–78, 86–156 и 174 или AAV по любому из пп. 79–85 и 157–173 и фармацевтически приемлемый носитель.

176. Клетка, которая вырабатывает выделенную BB по любому из пп. 1–78, 86–156 и 174 или AAV по любому из пп. 79–85 и 157–173.

177. Клетка, содержащая первую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок AAV, связанный с каркасным белком, указанным в любом из пп. 1–78, 86–156 и 174.

178. Клетка по п. 88, дополнительно содержащая вторую нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, указанный в любом из пп. 72–77 и 133–156.

179. Клетка, содержащая первый нуклеотид, кодирующий белок AAV, связанный с партнером по связыванию химически индуцированного димера, указанным в любом из пп. 47–67.

180. Клетка по п. 179, дополнительно содержащая вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующий партнер по связыванию химически индуцированного димера по п. 90, который связан с каркасным белком, указанным в любом из пп. 1–47.

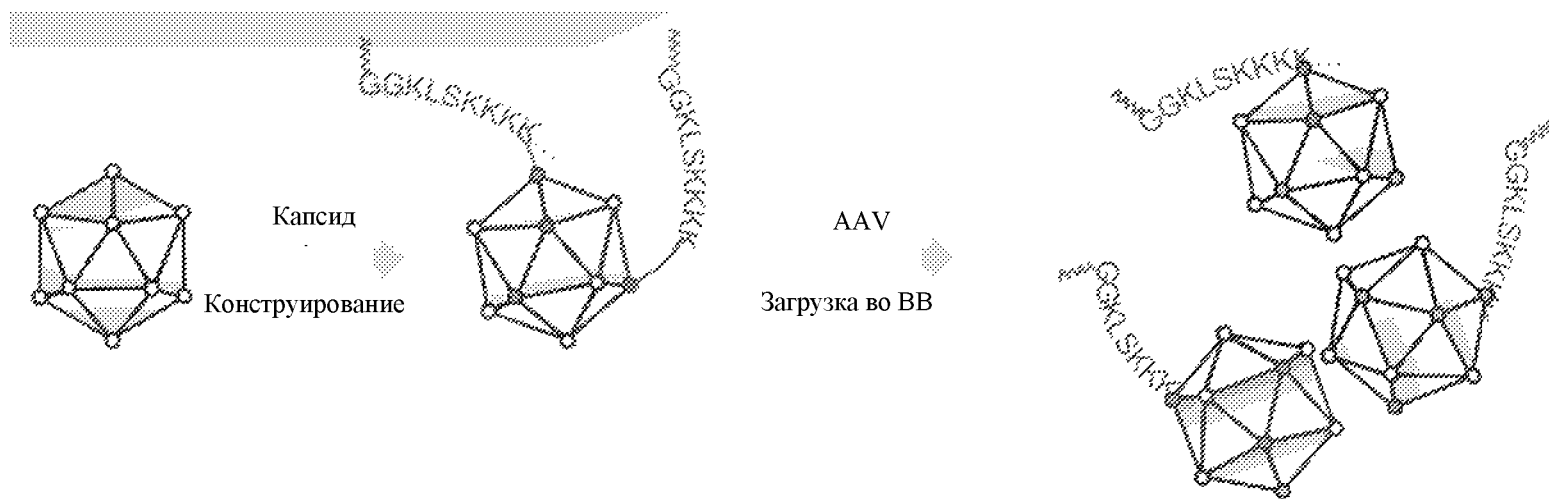
181. Клетка по п. 180, дополнительно содержащая третью нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, указанный в любом из пп. 72–77.

182. Клетка, содержащая первый нуклеотид, кодирующий аффинный агент по любому из пп. 66–71, связанный с каркасным белком по любому из пп. 1–47.

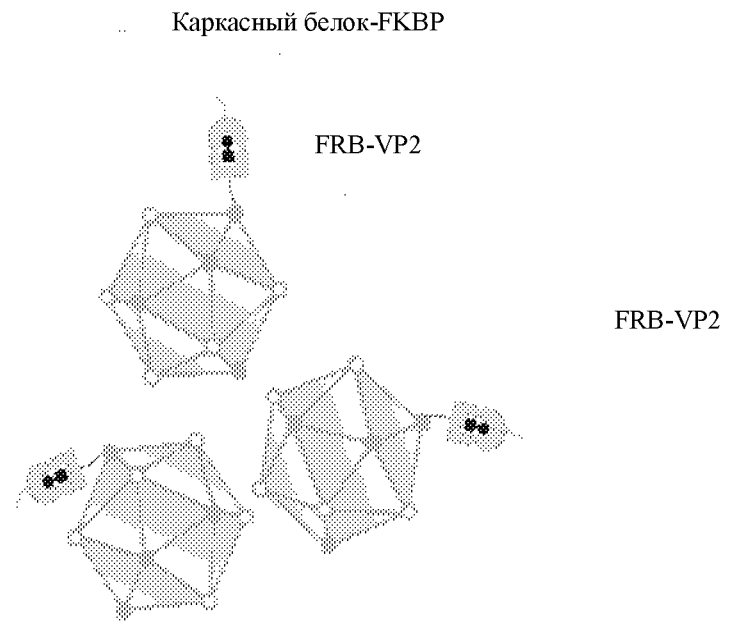
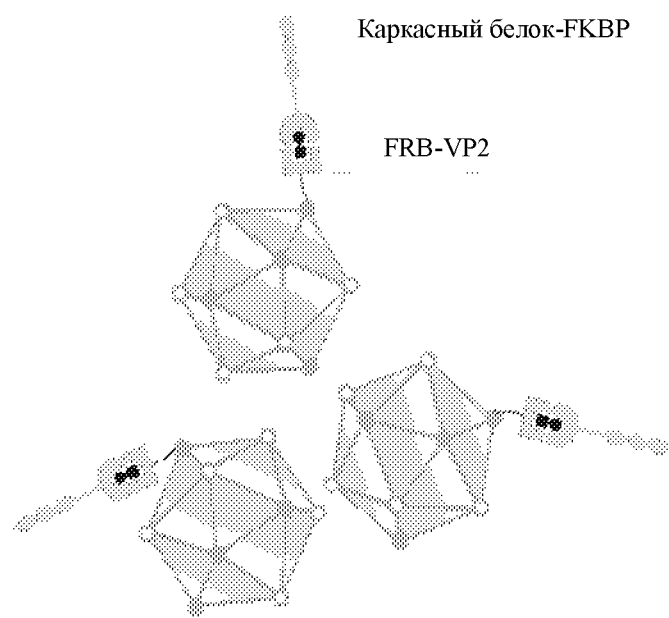
183. Клетка по п. 182, дополнительно содержащая вторую нуклеотидную последовательность, содержащую представляющий интерес ген, указанный в любом из пп. 72–77.

184. Набор, содержащий (i) выделенную ВВ по любому из пп. 1–79, 86–156 и 174 или AAV по любому из пп. 79–85 и 157–173, и (ii) инструкции по применению.
185. Способ получения ВВ, включающий культивирование клетки по любому из пп. 179–183 в подходящих условиях и получение ВВ.
186. Способ предотвращения или лечения заболевания у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту ВВ по любому из пп. 1–78, 86–156 и 174 или AAV по любому из пп. 79–85 или 157–173 или фармацевтической композиции по п. 176.
187. Способ по п. 186, в котором заболевание выбрано из рака, гемофилии, диабета, дефицита фактора роста, заболевания глаз, болезни Помпе, лизосомальной болезни накопления, муковисцидоза, кистозного фиброза, мышечной дистрофии Дюшенна — Беккера, транстиретинового амилоидоза, гемофилии А, гемофилии В, аденозиндезаминазной недостаточности, врожденного амавроза Лебера, X-сцепленной адренолейкодистрофии, метахроматической лейкодистрофии, недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), болезни накопления гликогена 1А, синдрома Криглера — Найяра, первичной гипероксалурии 1 типа, острой интермиттирующей порфирии, фенилкетонурии, семейной гиперхолестеринемии, мукополисахаридоза VI типа, дефицита α 1-антитрипсина и гиперхолестеринемии.
188. Способ доставки AAV субъекту, включающий введение субъекту ВВ по любому из пп. 1–78, 86–156 и 174.
189. Способ по любому из пп. 186–188, в котором введение осуществляется парентерально, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутриопухолево, интраназально, подкожно или внутрибрюшинно.
190. Способ по любому из пп. 186–188, в котором введение ВВ представляет собой интраокулярное введение.
191. Способ по п. 190, в котором интраокулярное введение представляет собой интравитреальное введение, интракамерное введение, субконъюнктивальное введение, субретинальное введение, субсклеральное введение, интрахориоидальное введение и любую их комбинацию.
192. Способ по п. 190 или 191, в котором интраокулярное введение включает инъекцию ВВ.
193. Способ по любому из пп. 190–192, в котором интраокулярное введение представляет собой интравитреальную инъекцию.
194. Способ по любому из пп. 190–193, в котором внутриглазное введение включает имплантацию устройства для доставки, содержащего композицию.

195. Способ по п. 194, в котором устройство для доставки представляет собой устройство для интраокулярной доставки.
196. Способ по п. 195, в котором устройство для интраокулярной доставки представляет собой интравитреальный имплант или склеральный имплант.
197. Способ по любому из пп. 194–196, в котором устройство для доставки представляет собой устройство для доставки с замедленным высвобождением.
198. Способ по любому из пп. 194–197, в котором устройство для доставки является биоразлагаемым.
199. Способ по любому из пп. 190–198, в котором интраокулярное введение ВВ предназначено для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из выбранной из группы, состоящей из макулярной дегенерации, катаракты, диабетической ретинопатии, глаукомы, амблиопии, косоглазия, ретинопатии, или любой их комбинации.
200. Способ по любому из пп. 186–199, включающий введение дополнительного терапевтического агента.
201. Внеклеточная везикула (ВВ), содержащая аденоассоциированный вирус (AAV) и каркасный белок, причем AAV связан с экзосомой и при этом AAV имеет измененные свойства по сравнению с AAV в отдельности.
202. ВВ по п. 201, в которой AAV связан с поверхностью просвета ВВ.
203. ВВ по п. 201, в которой AAV связан с внешней поверхностью ВВ.
204. ВВ по любому из пп. 201–203, в которой ВВ представляет собой ВВ по любому из пп. 1–78, 86–156 и 174.

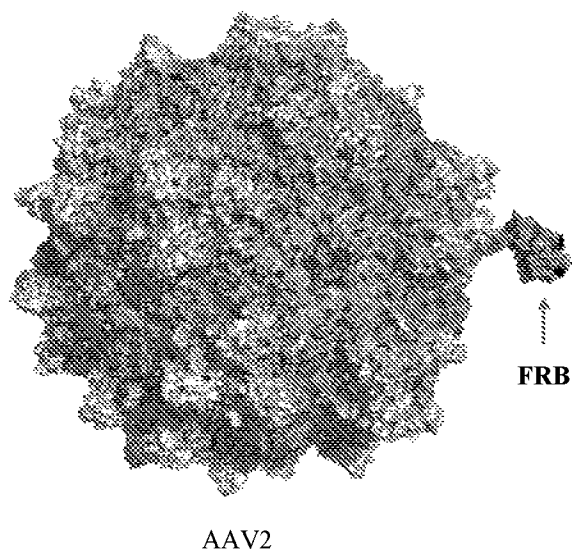


Фиг. 1

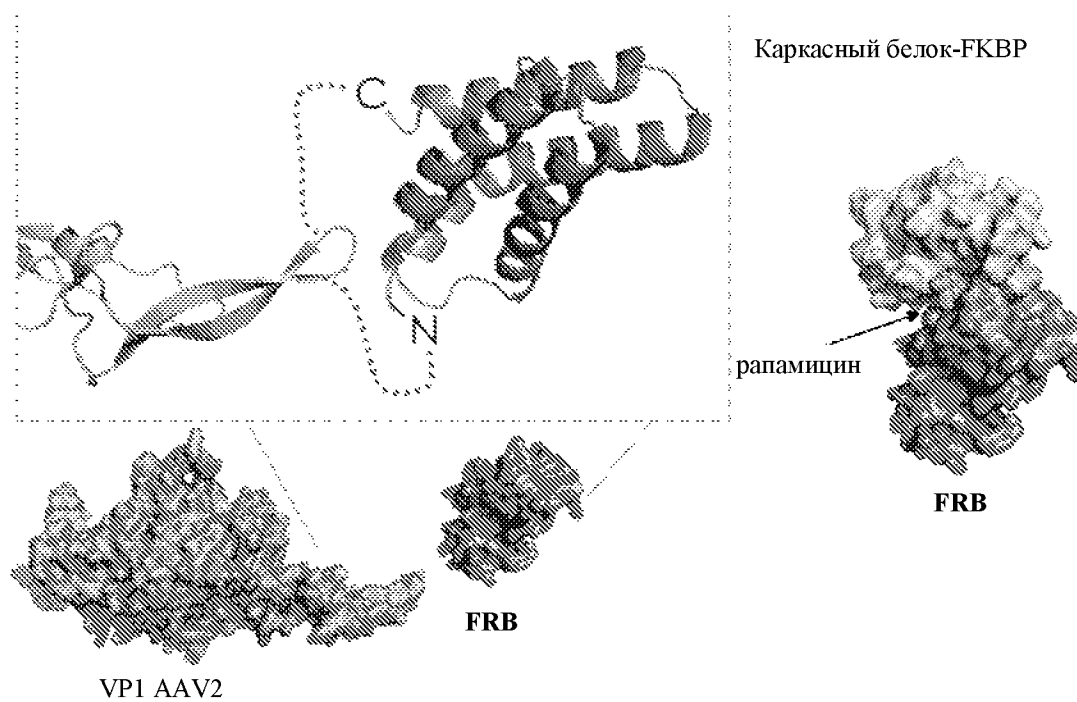


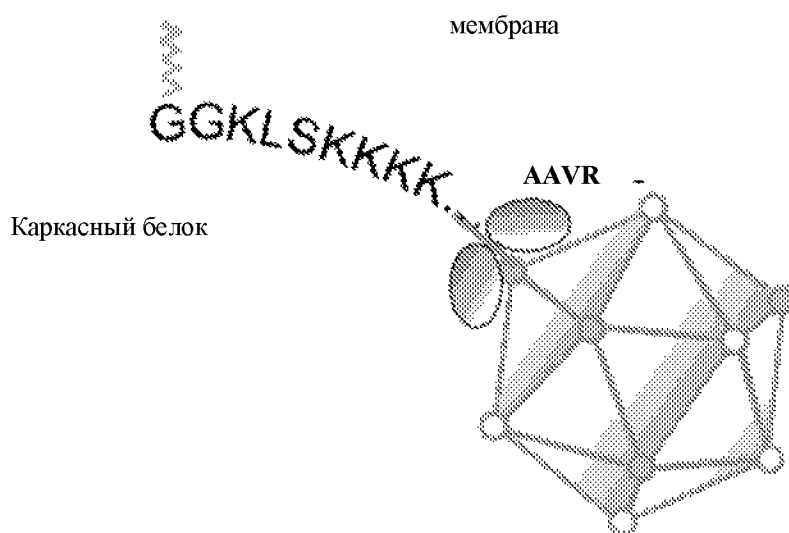
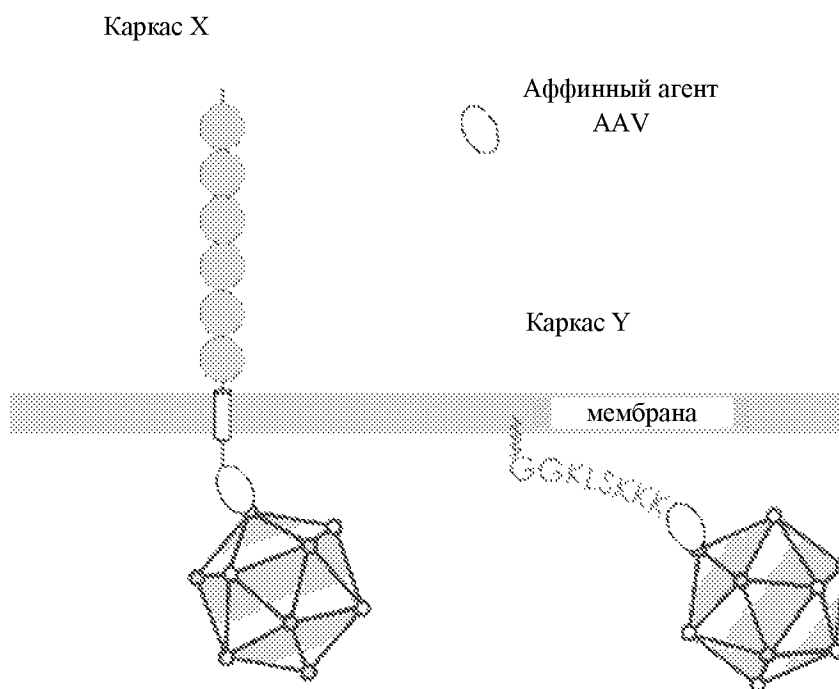
Фиг. 2

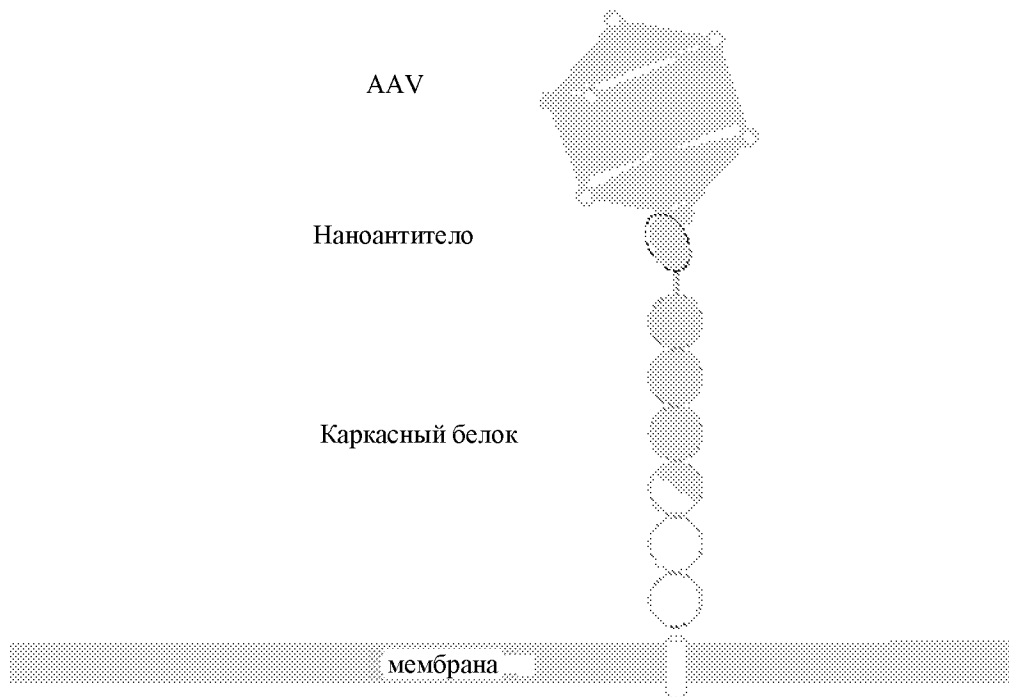
Фиг. 3А



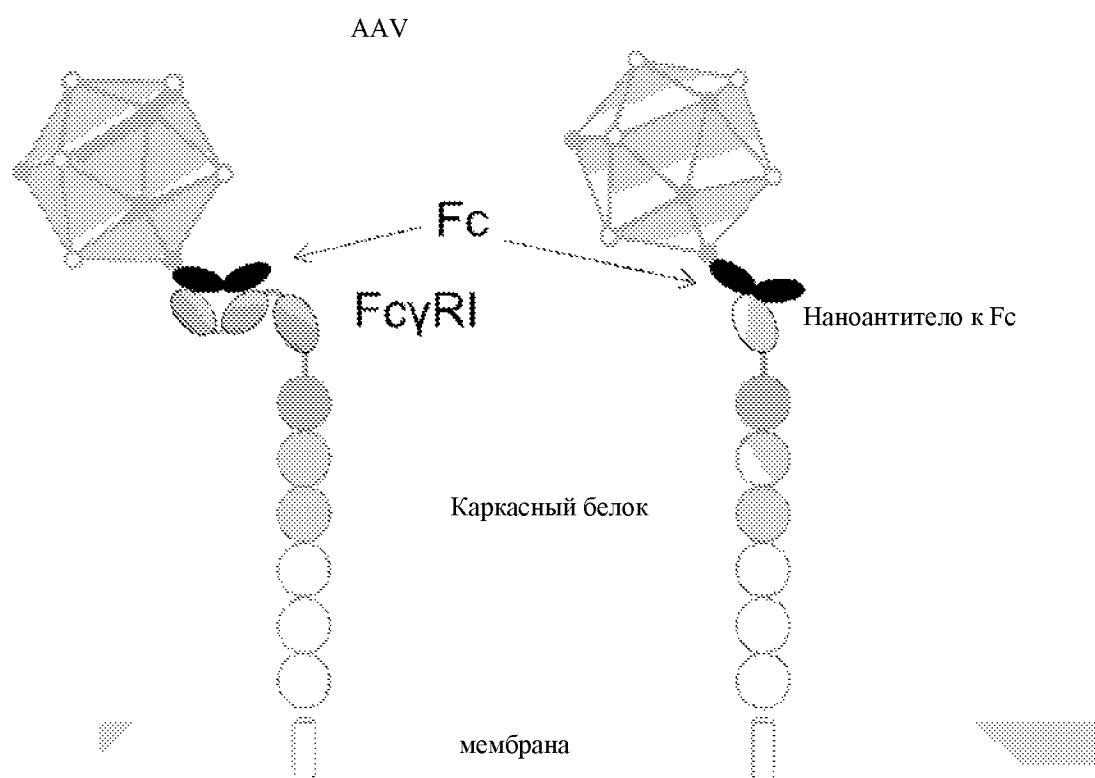
Фиг. 3В



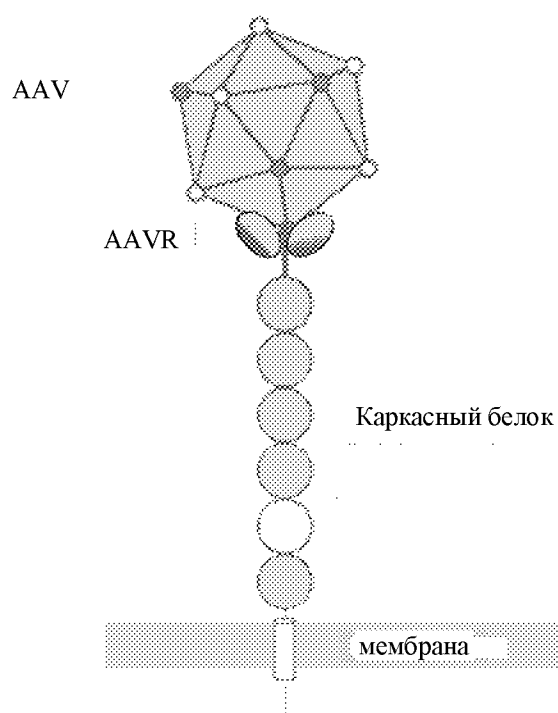
Фиг. 4А**Фиг. 4В****Фиг. 4С**



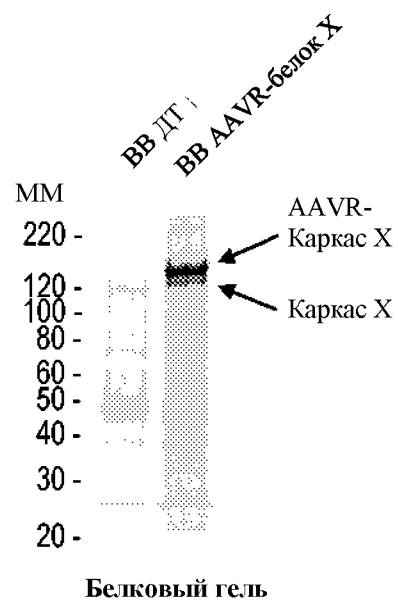
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



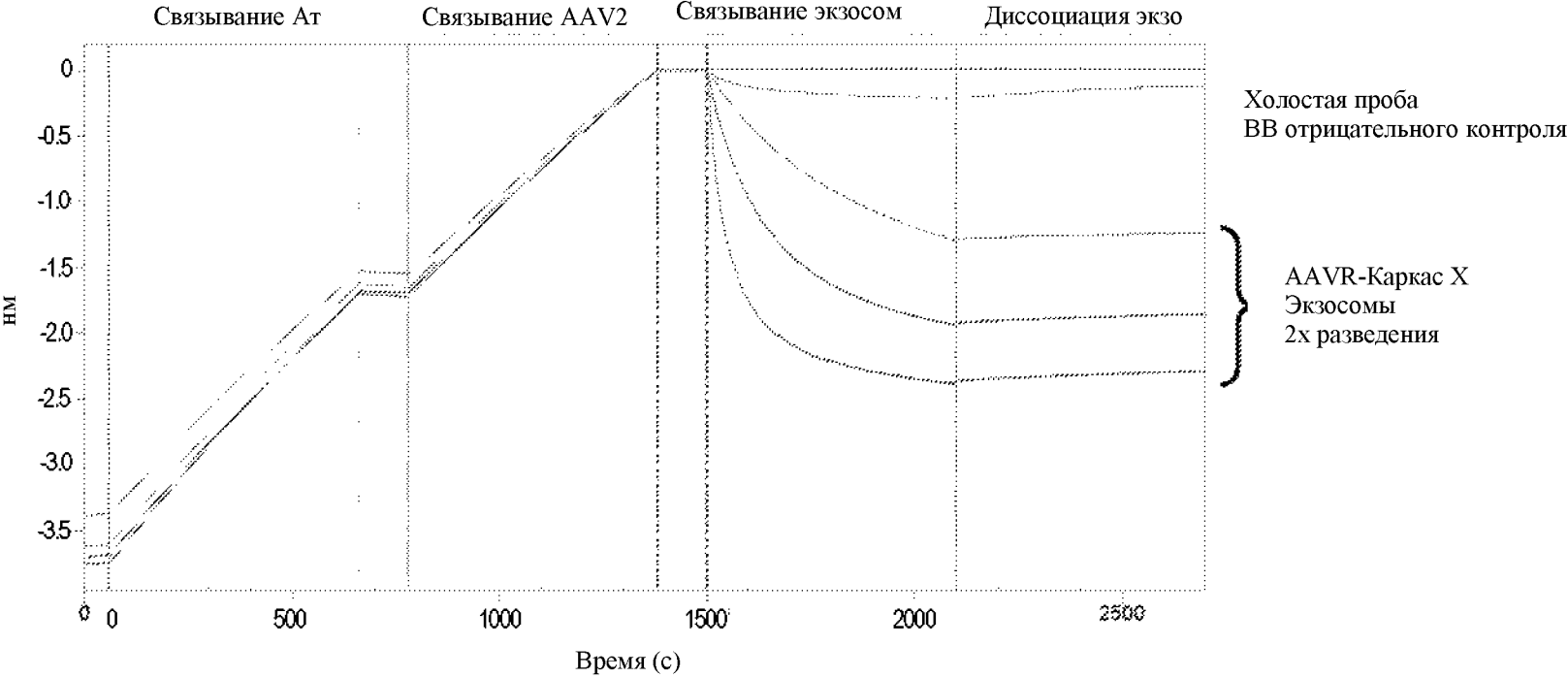
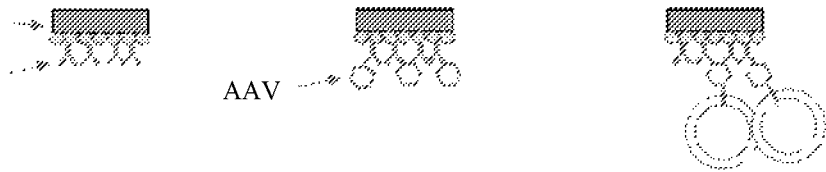
Фиг. 7В

Фиг. 8А

Зонд на основе белка G

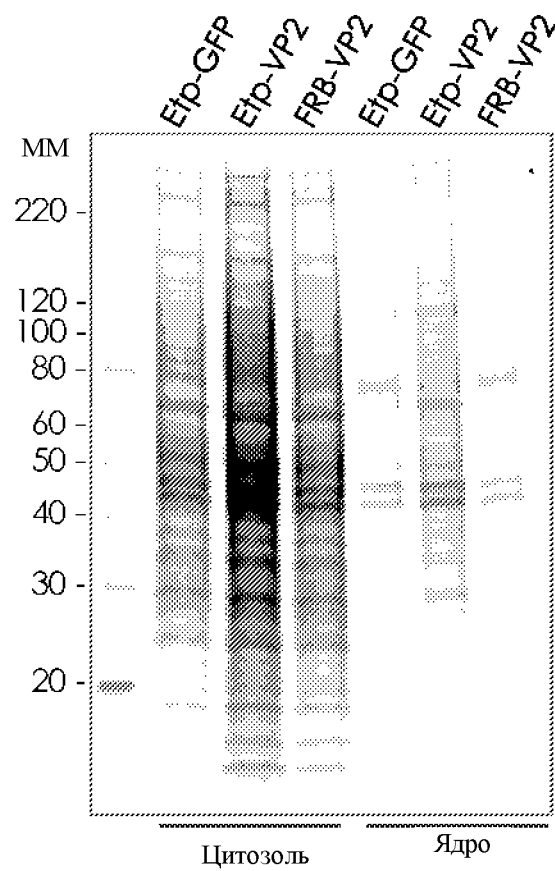
Антитело к AAV

Фиг. 8В



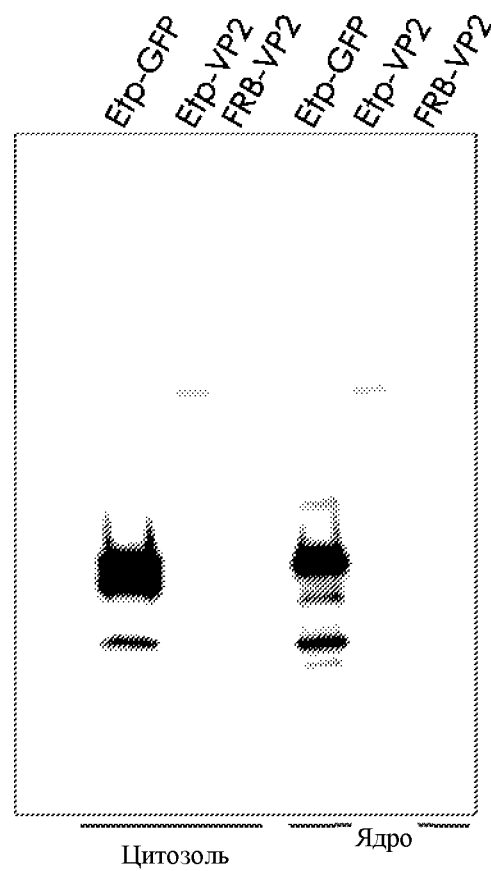
Фиг. 9А

Белковый гель



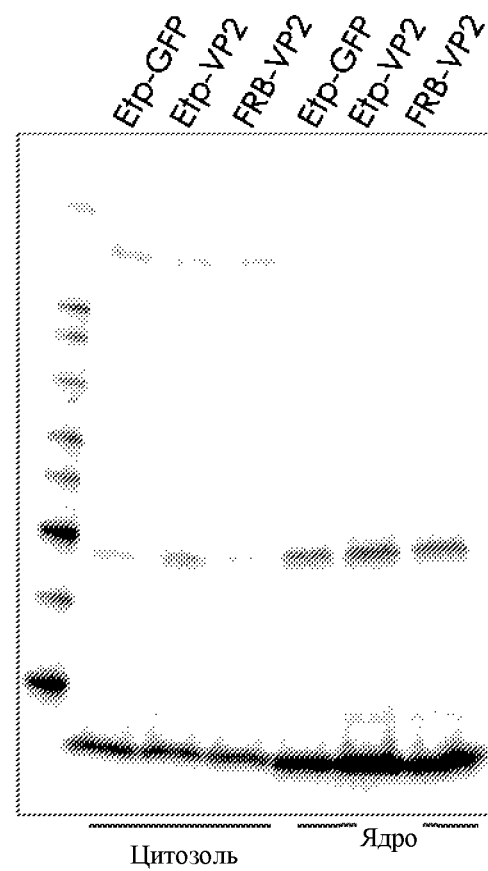
Фиг. 9В

α Flag
(эпитоп на всех конструкциях)

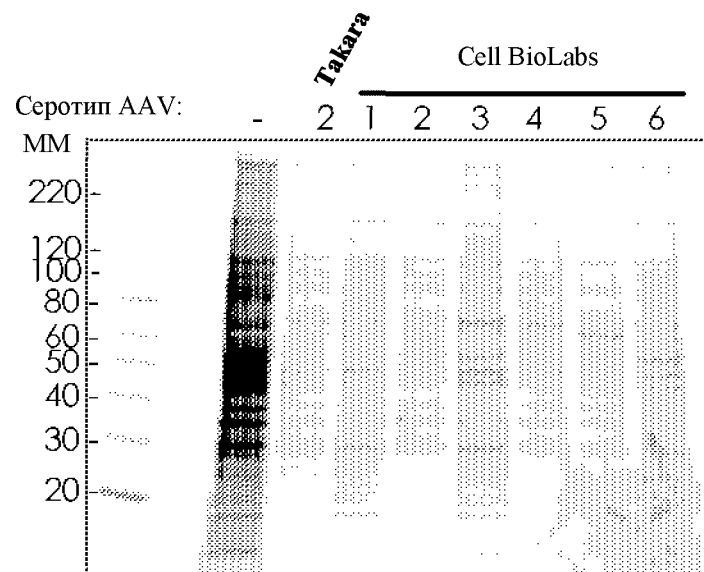


Фиг. 9С

α HistoneH4
(ядерный маркер)



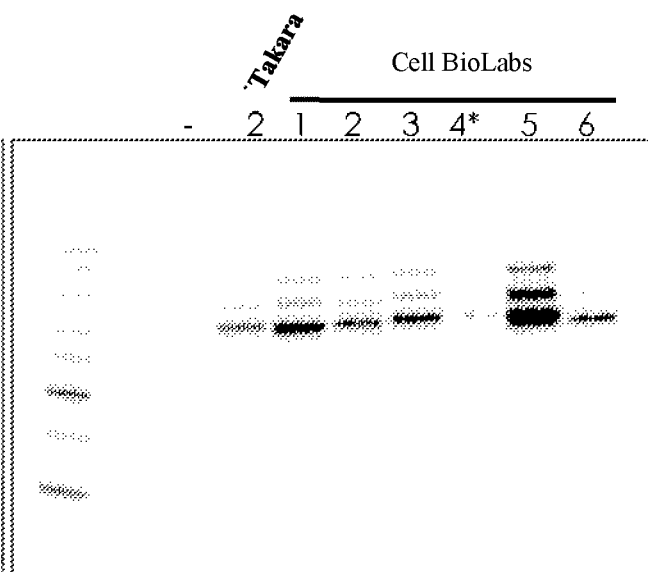
Фиг. 10A



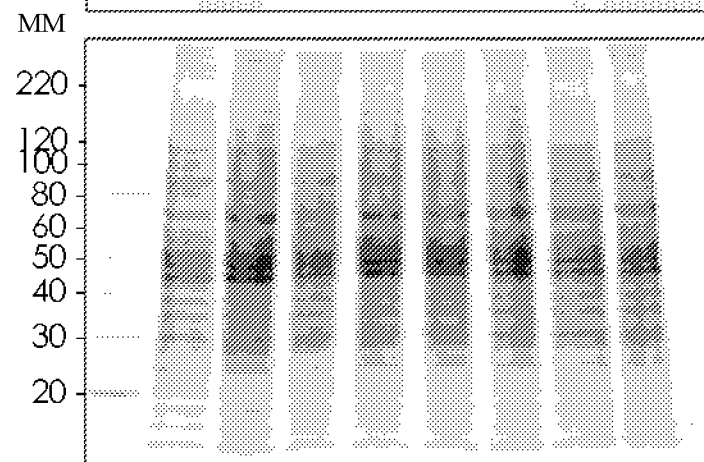
Гель без красителя

Фиг. 10B

Фиг. 10C



HEK 293T

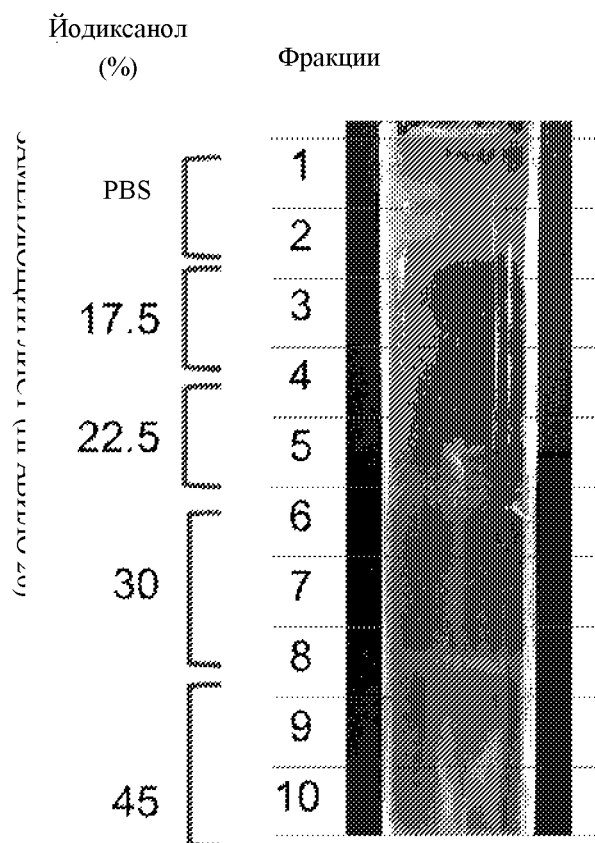


Вестерн-блот анти-VP

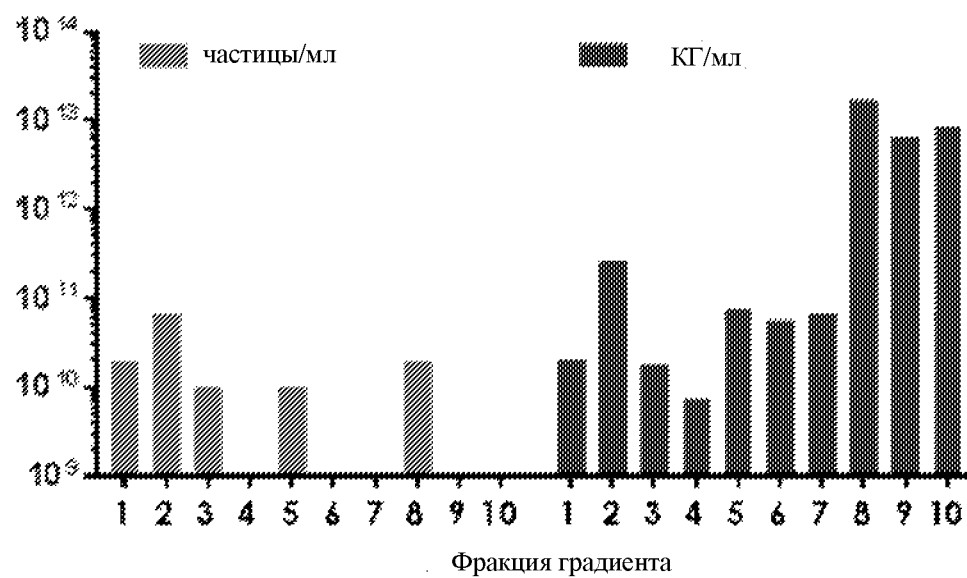
Фиг. 10D

HEK 293SF

Фиг. 11А

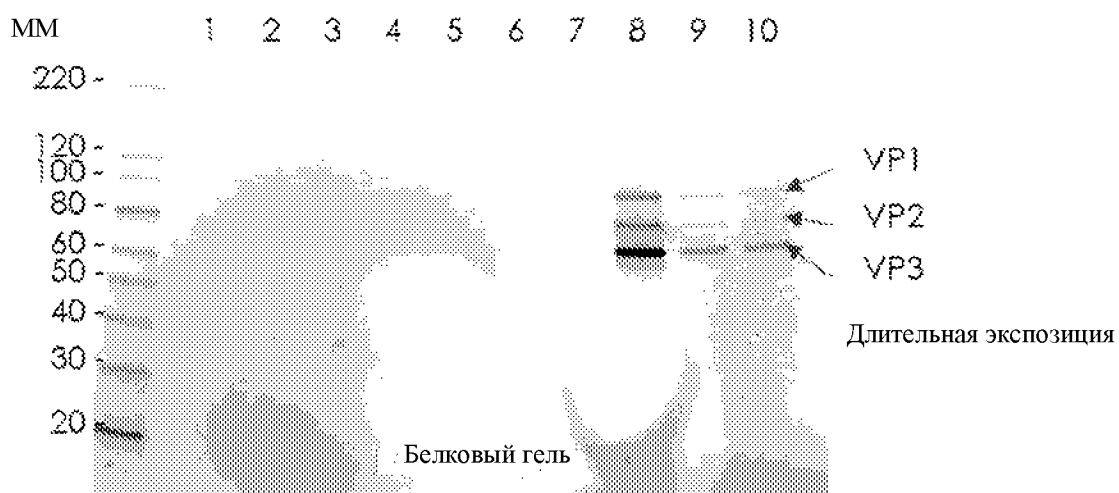


Фиг. 11В

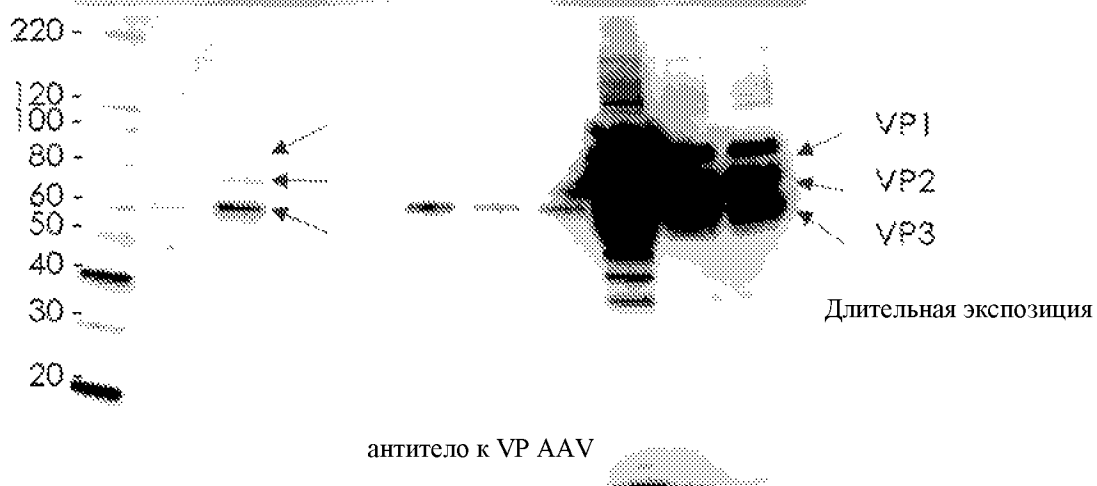


Фракции градиента Ортігер

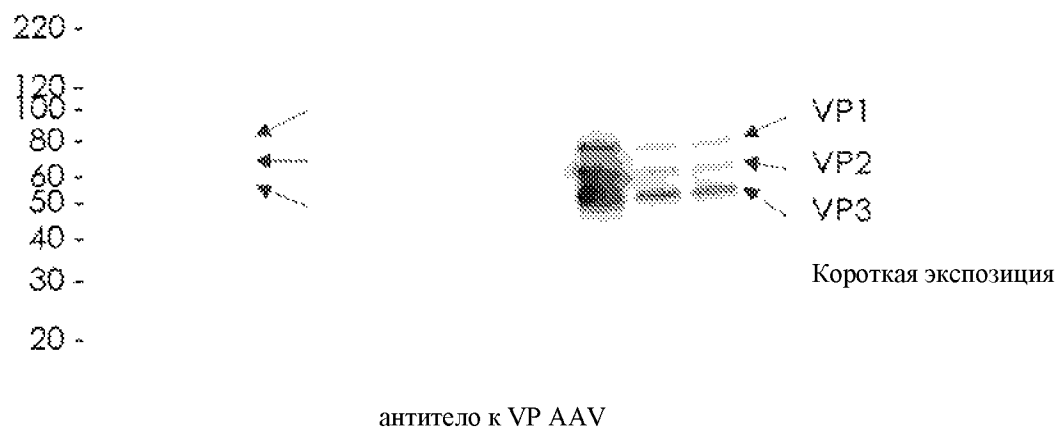
Фиг. 12А



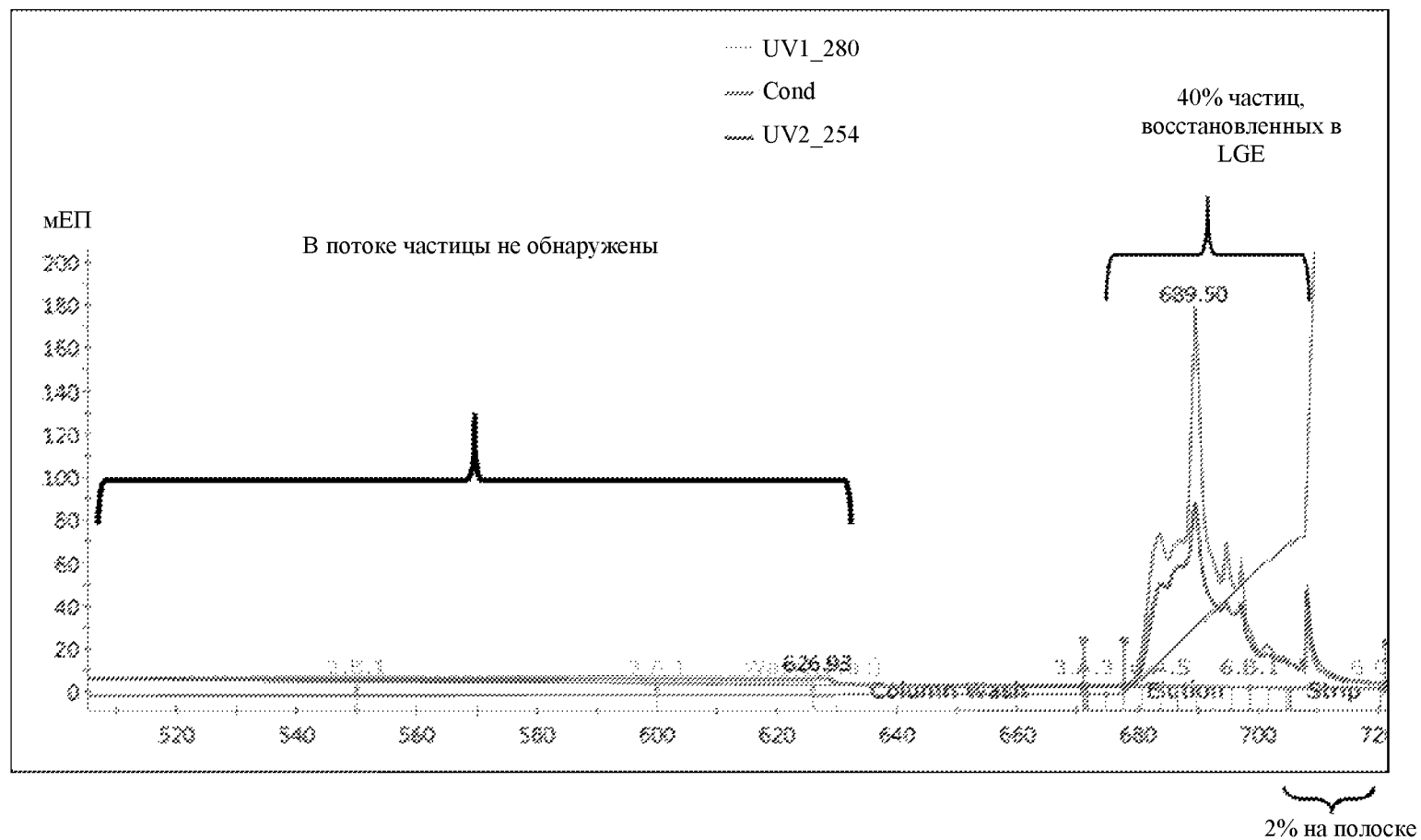
Фиг. 12В



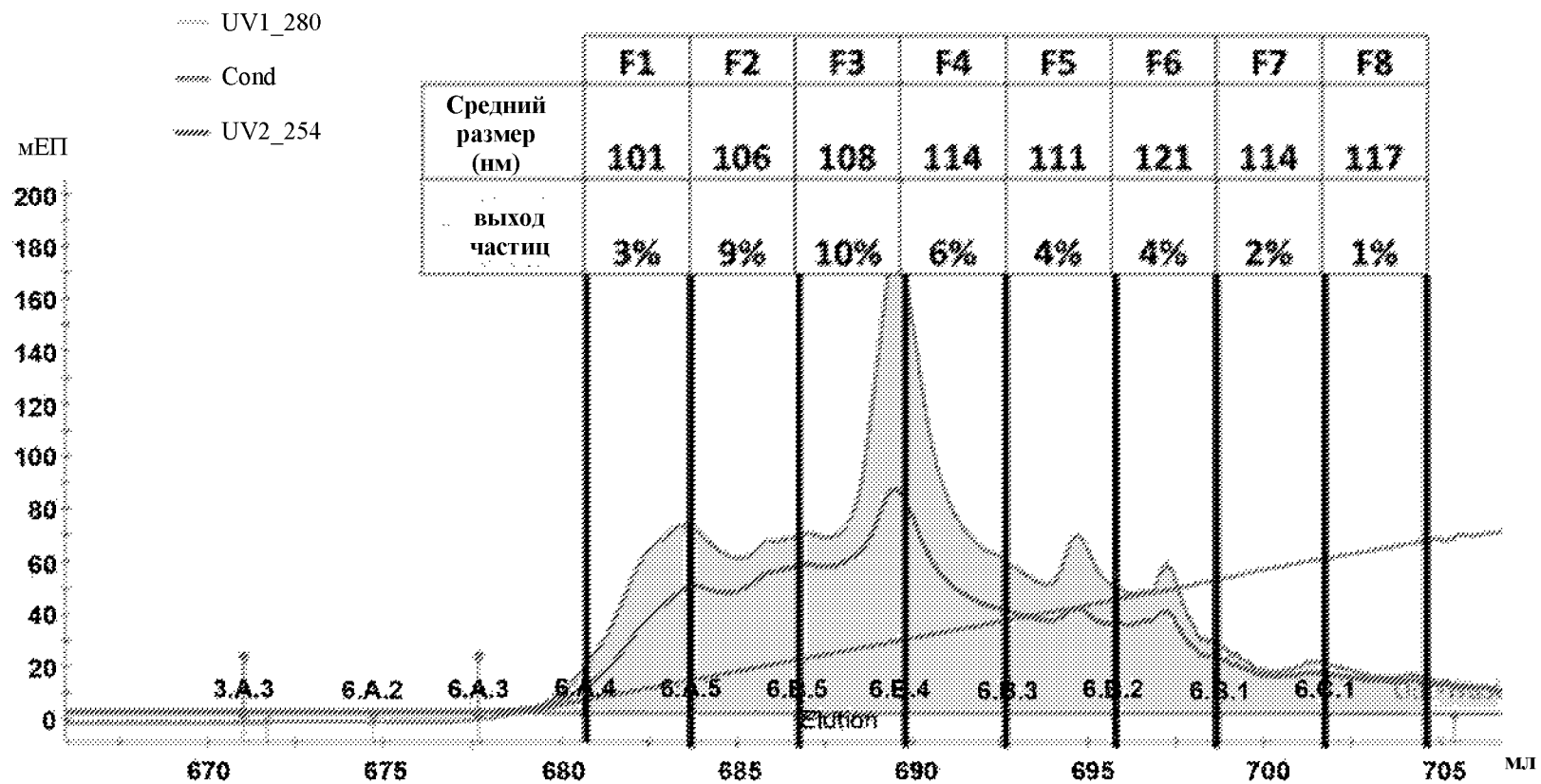
Фиг. 12С



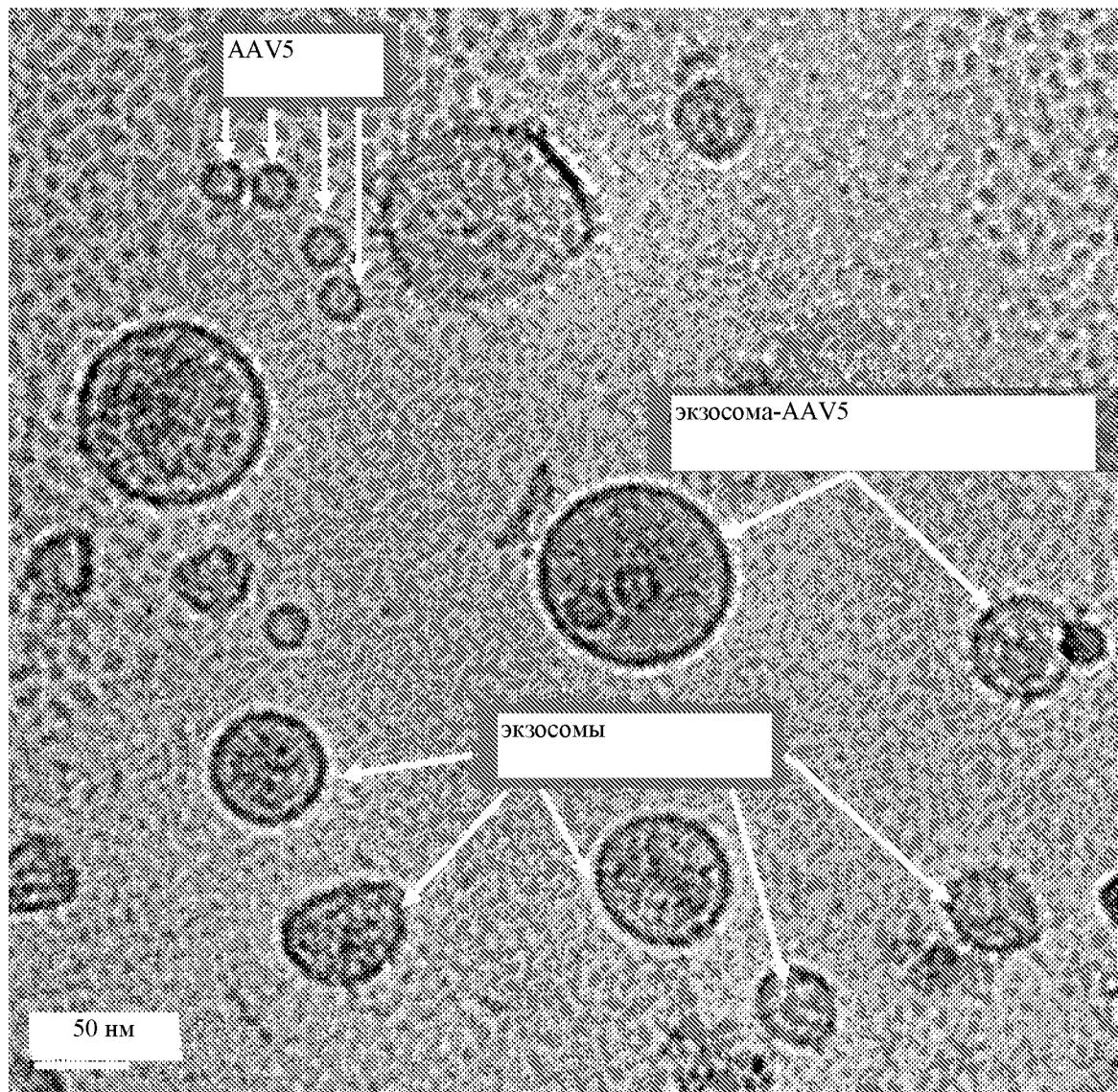
Фиг. 13



Фиг. 14А

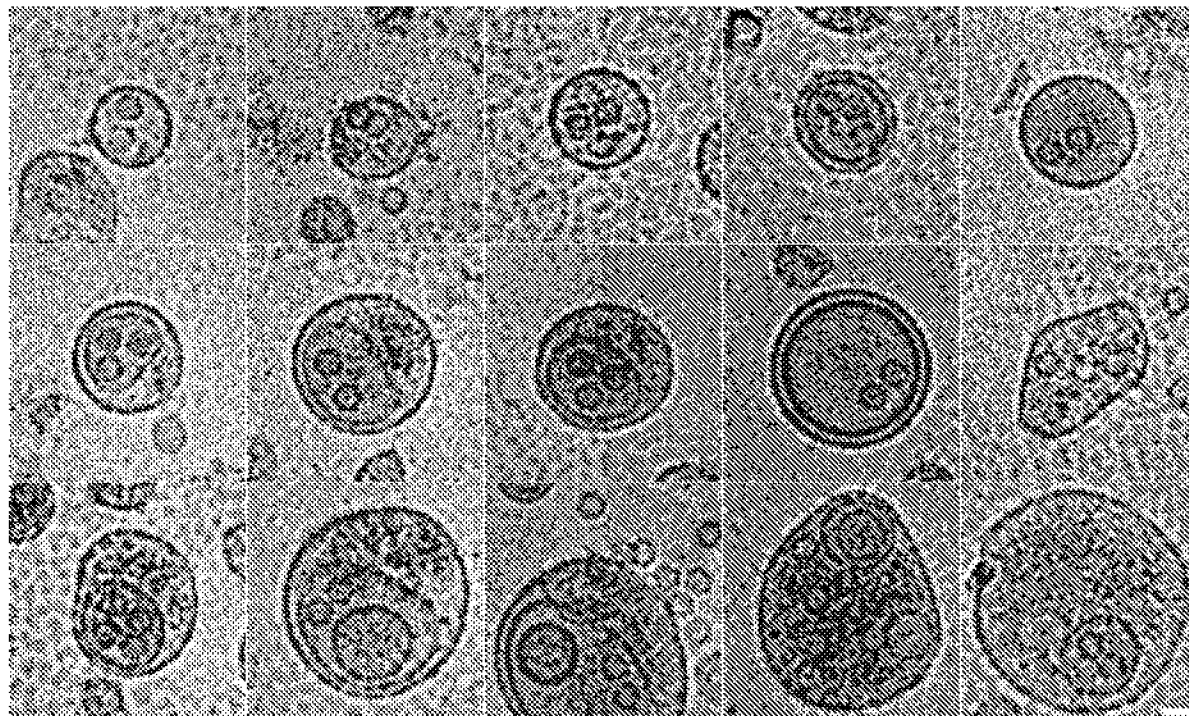


Фиг. 14В



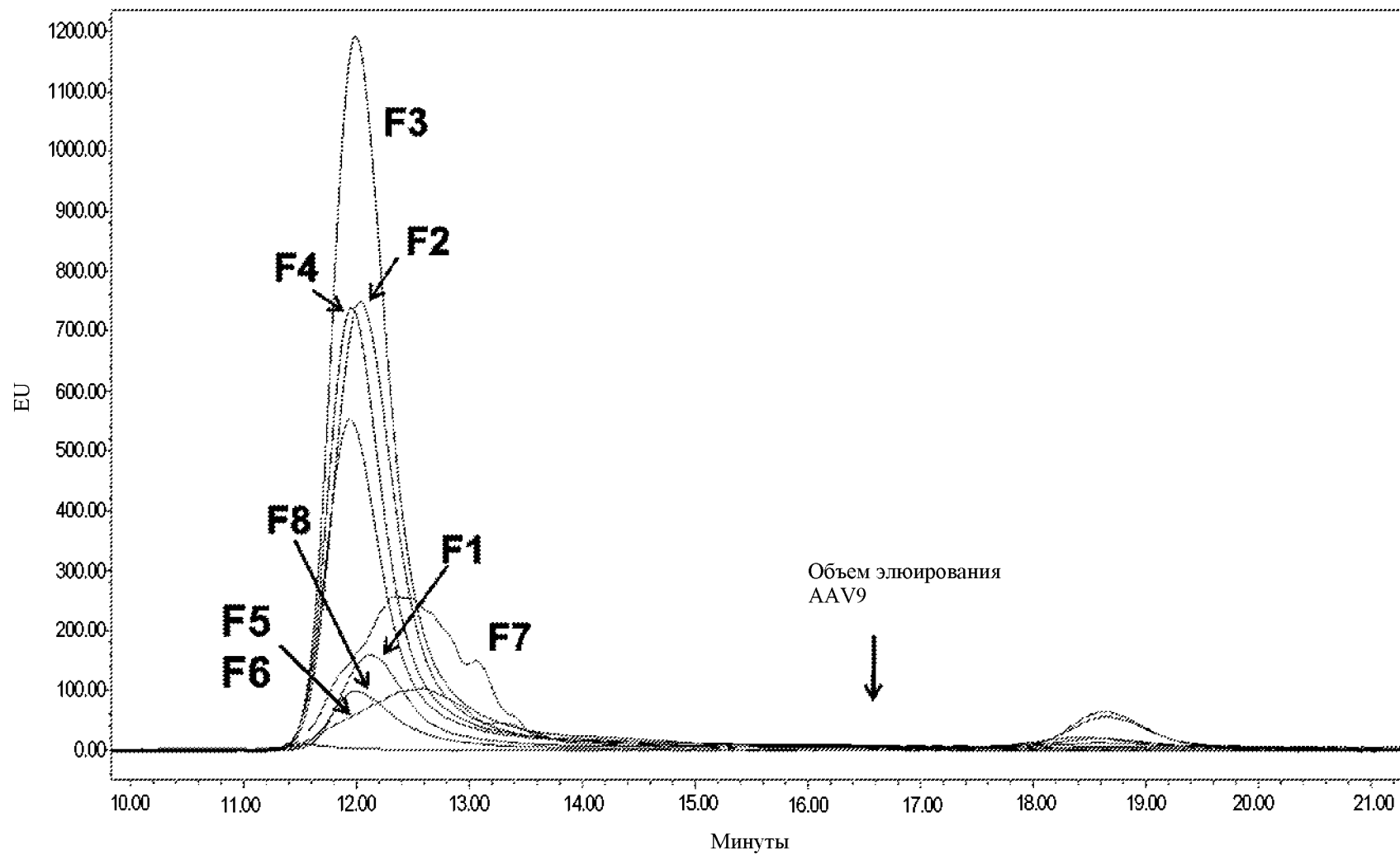
Фиг. 14С

Экзосомы -AAV5

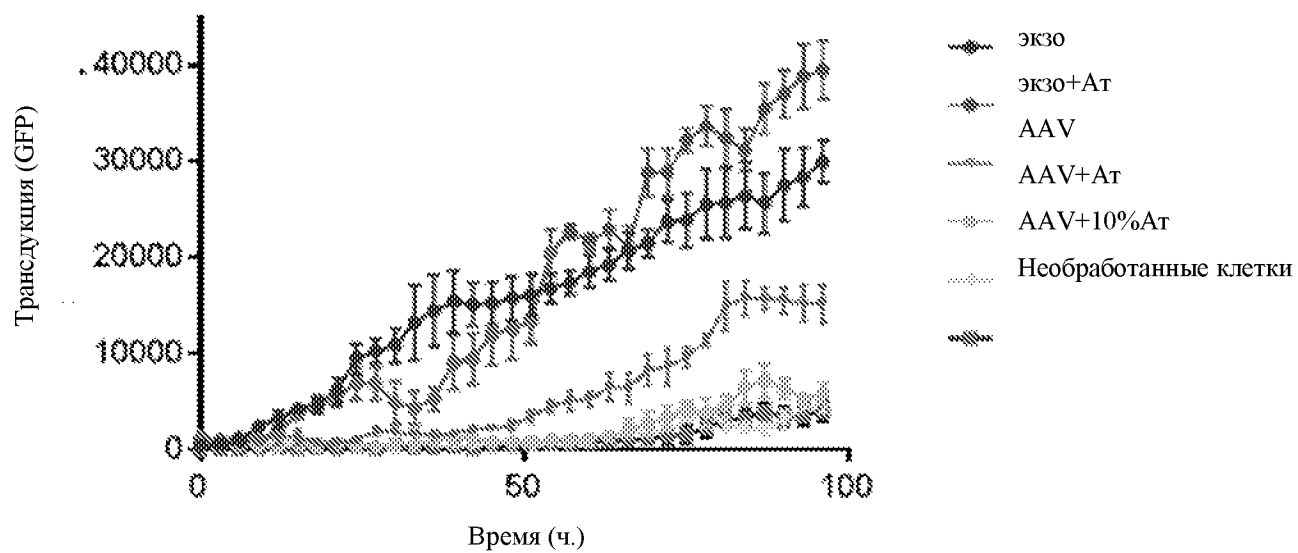


25 нм

Фиг. 15

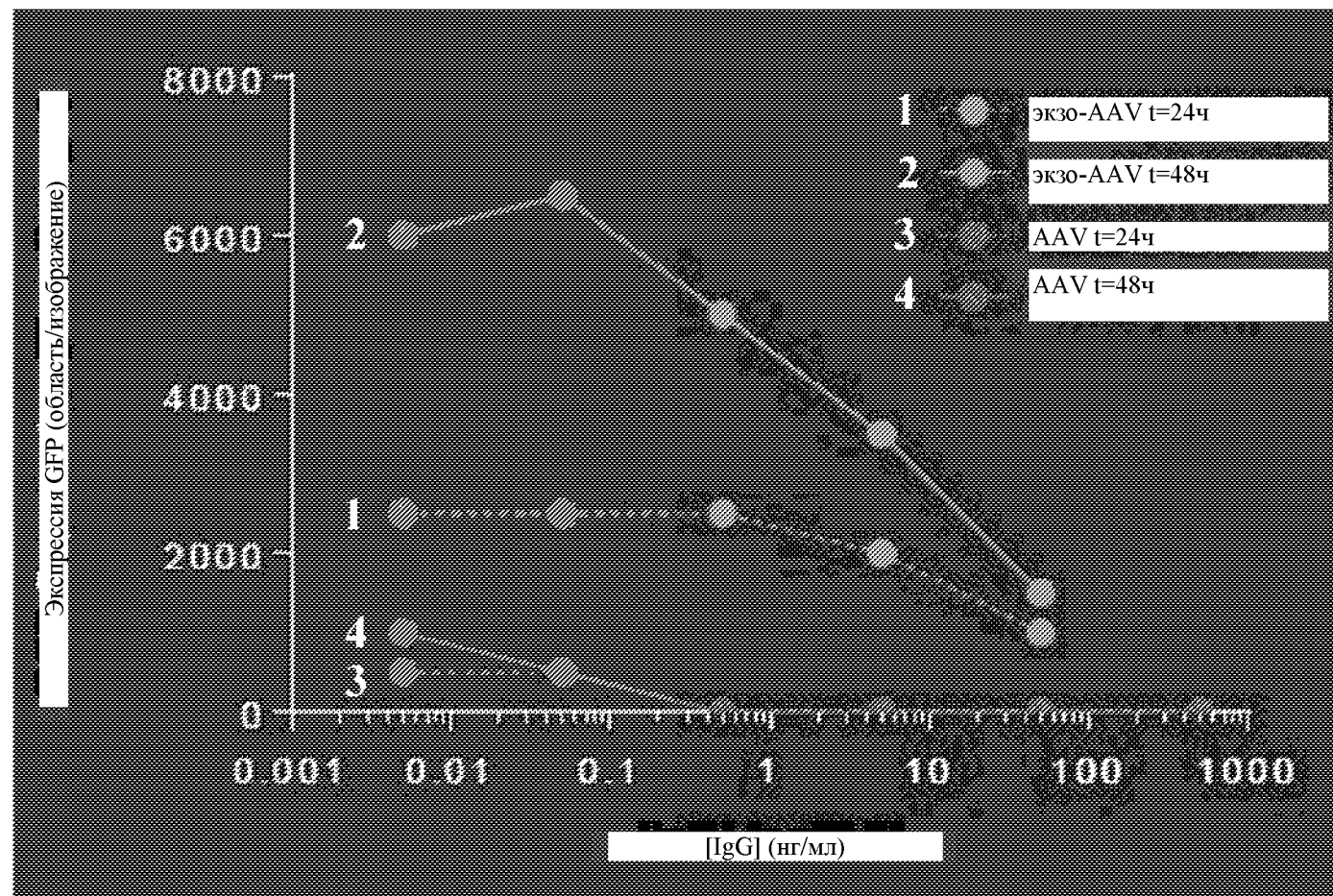


экзо и свободные AAV

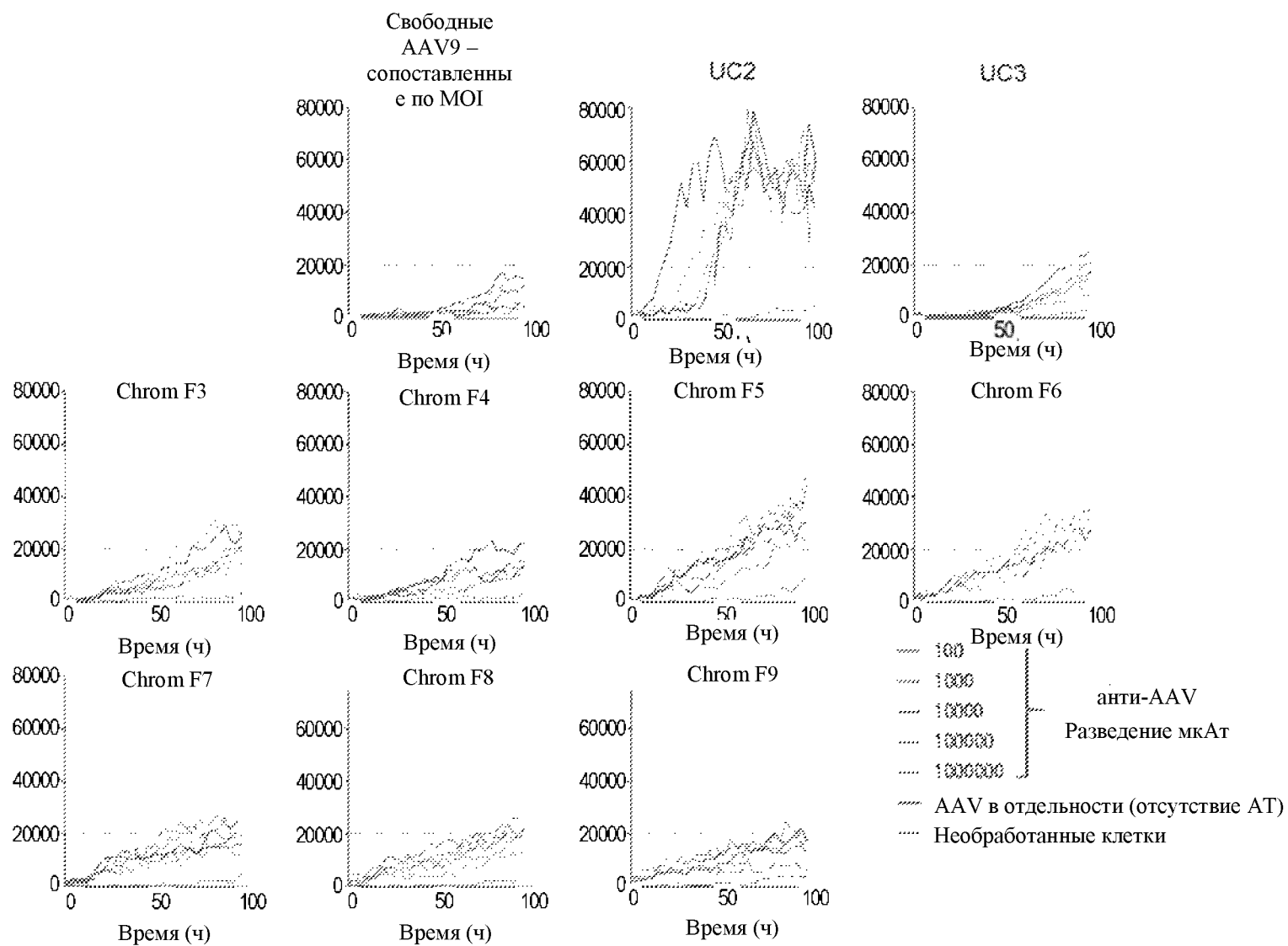


Фиг. 16

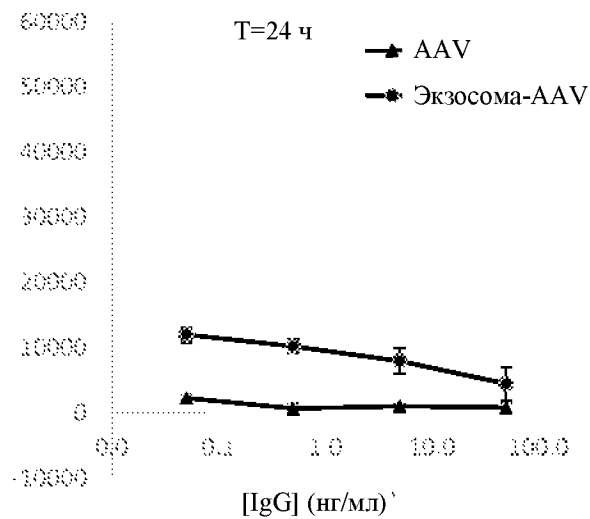
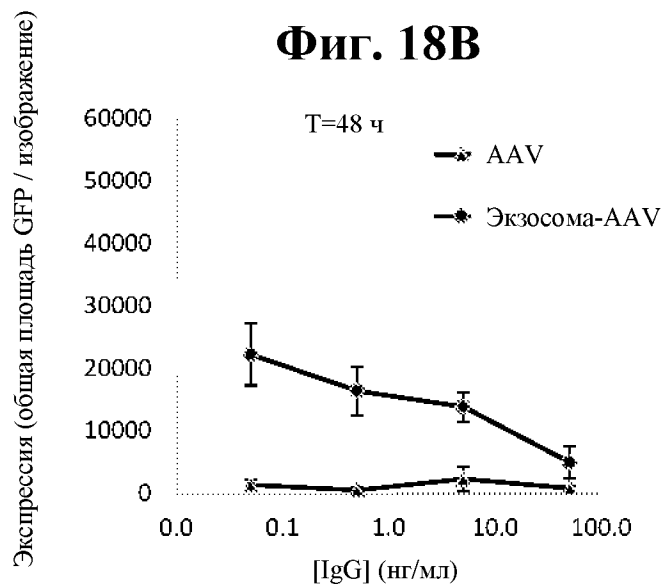
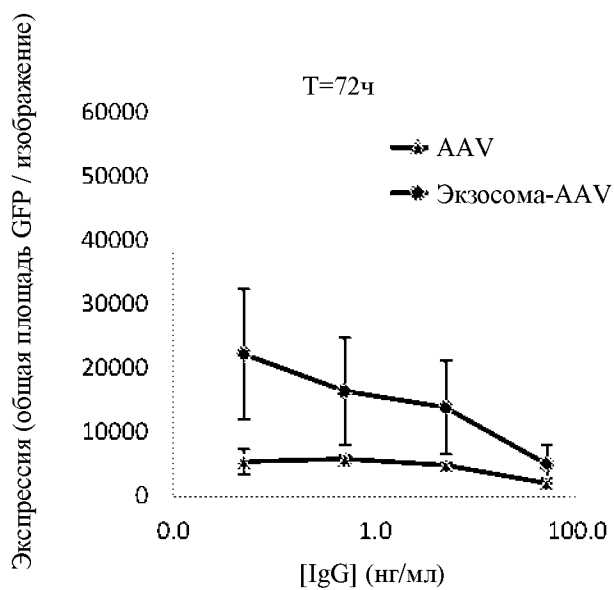
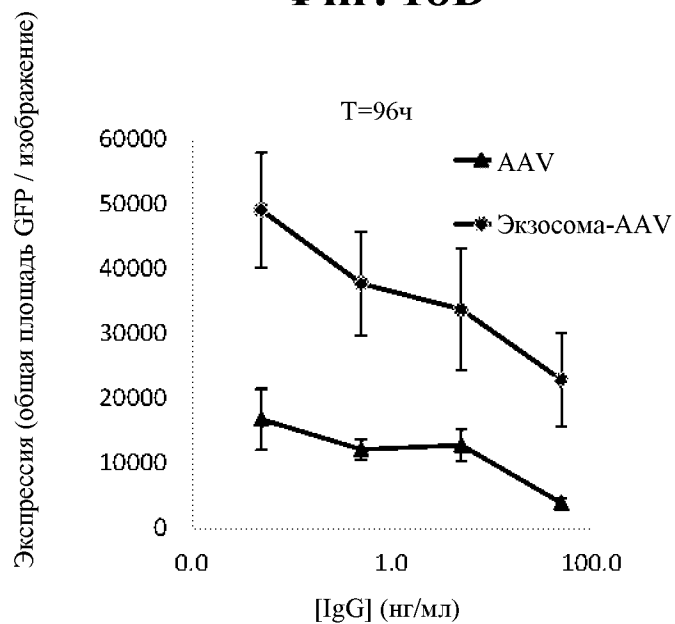
Фиг. 17А

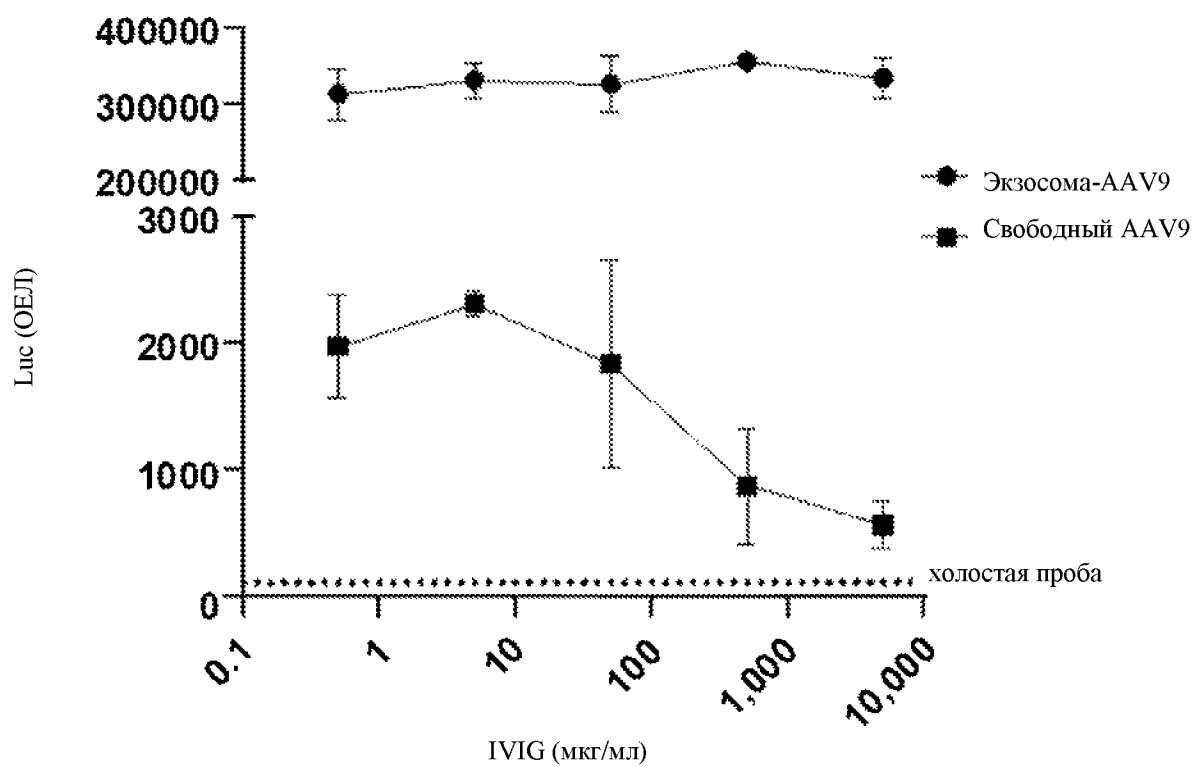


Фиг. 17В



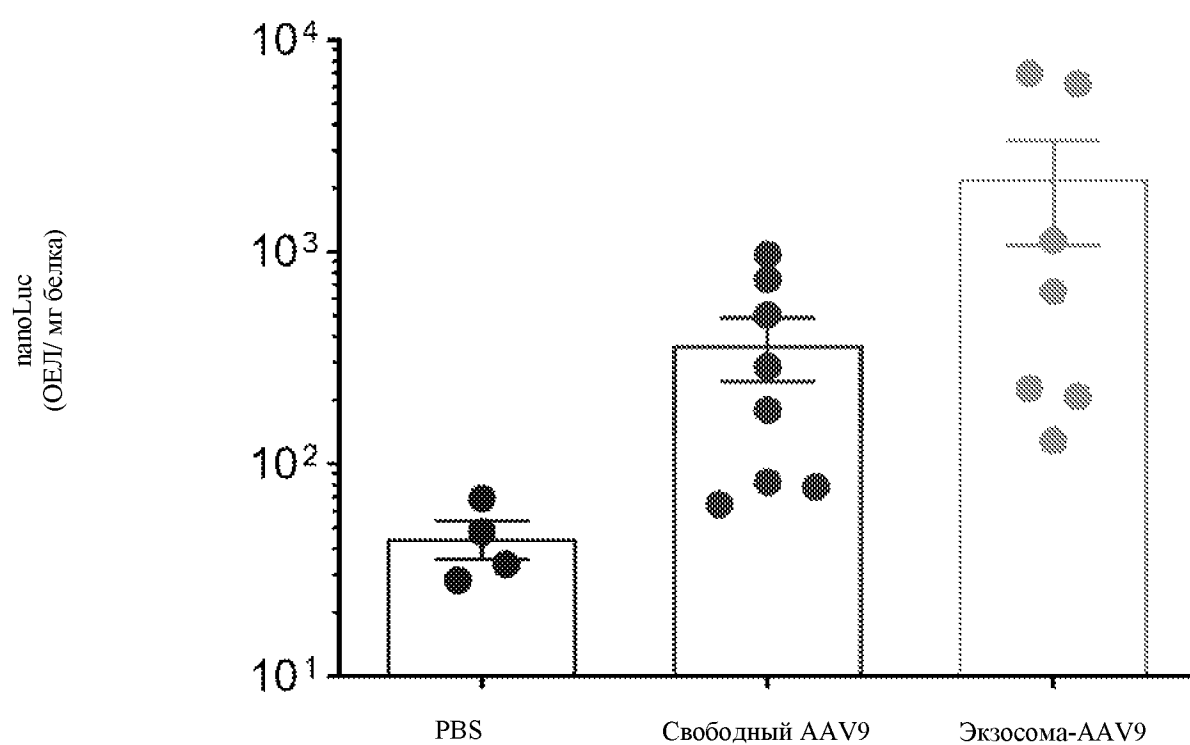
Экспрессия (общая площадь GFP / изображение)

Фиг. 18А**Фиг. 18В****Фиг. 18С****Фиг. 18D**

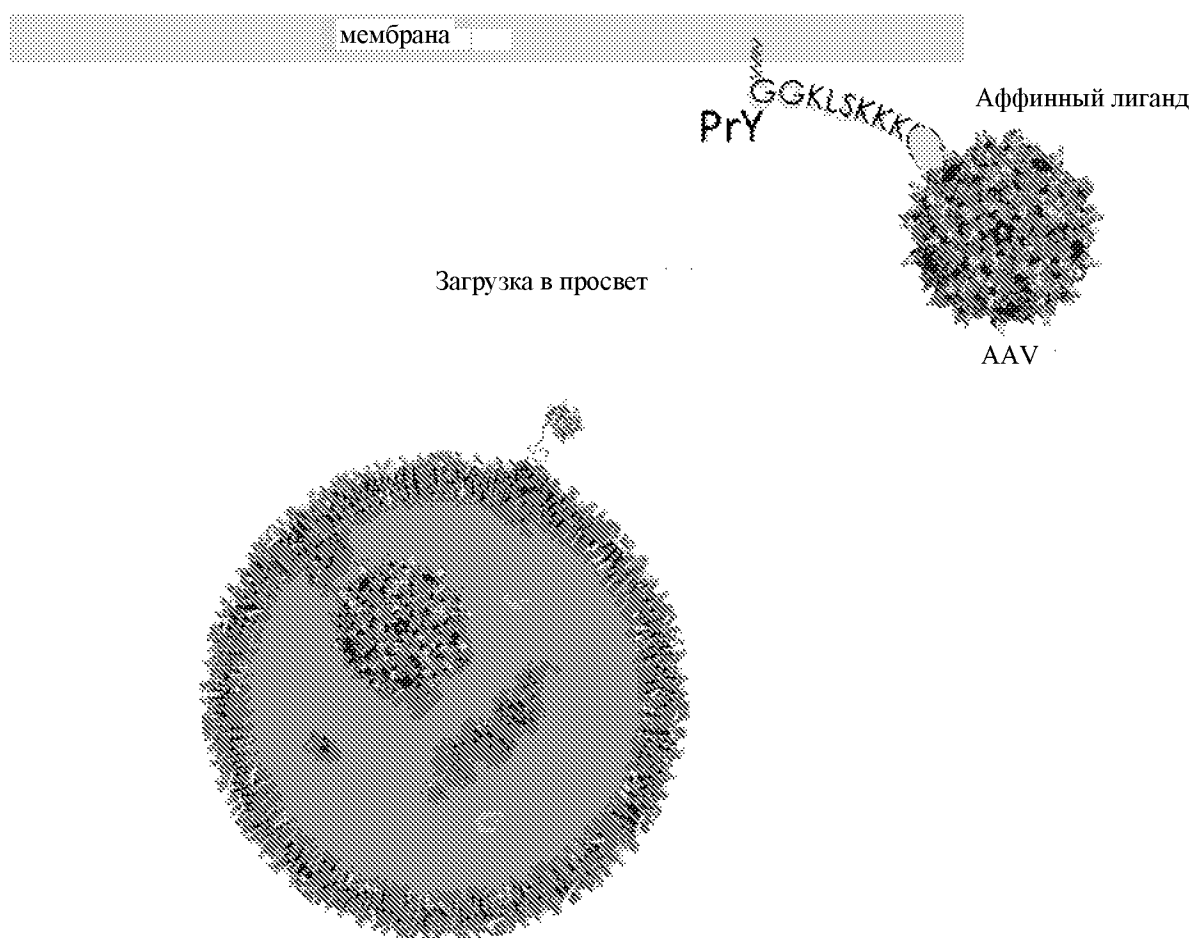


Фиг. 19

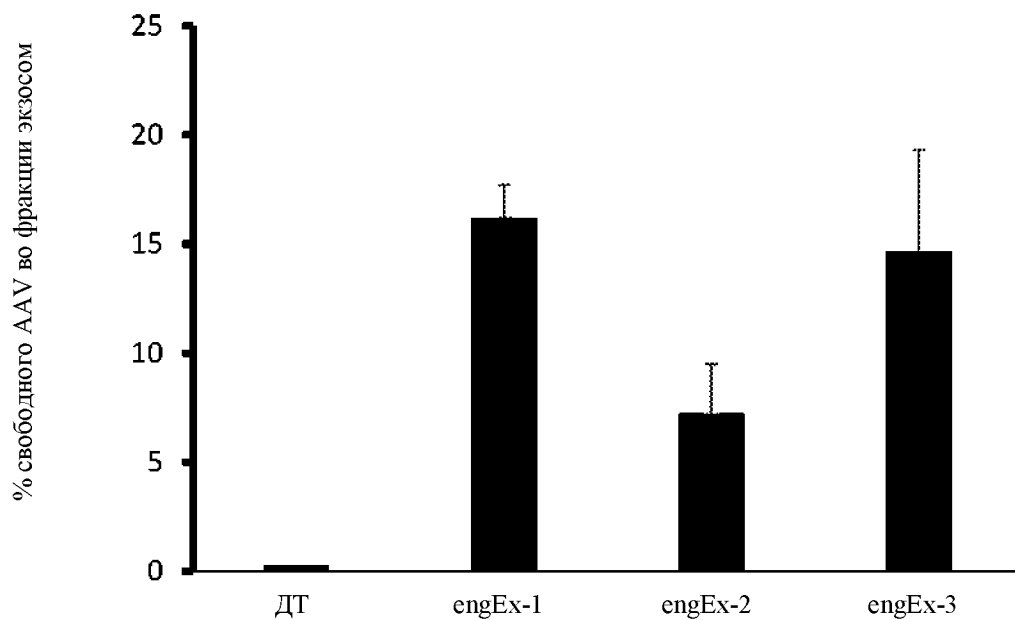
Фиг. 20



Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 21С

