

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045701**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.18
- (21) Номер заявки
202192147
- (22) Дата подачи заявки
2020.02.04
- (51) Int. Cl. *C12N 15/88* (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)

(54) **КАРКАСЫ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭКЗОСОМ**

- (31) **62/801,065; 62/801,636; 62/851,581**
- (32) **2019.02.04; 2019.02.05; 2019.05.22**
- (33) **US**
- (43) **2021.12.20**
- (86) **PCT/US2020/016629**
- (87) **WO 2020/163370 2020.08.13**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛОНЗА СЕЙЛС АГ (CH)
- (72) Изобретатель:
**Дули Кевин П., Уилльямс Дуглас Е.,
Торнтон Джеймс (US)**
- (74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Пармонова К.В.,
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Костюшенкова
М.Ю. (RU)**
- (56) **WO-A1-2018015535
WO-A1-2017203260
WO-A1-2019099942
WO-A1-2019040920**

-
- (57) Изобретение относится к гетерологичным белкам экзосомных везикул (ГБВВ), сконструированным экзосомам, содержащим ГБВВ, и способам получения и применения этих композиций, включая терапевтические применения.
-

B1

045701

045701

B1

1. Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка РСТ испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/801065, поданной 4 февраля 2019 г., 62/801636, поданной 5 февраля 2019 г., и 62/851581, поданной 22 мая 2019 г., раскрытие каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

2. Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде через EFS-WEB

Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя файла: 4000_031PC03_SeqListing_ST25.txt; размер: 205964; и дата создания: 4 февраля 2020 г.), поданном вместе с заявкой, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

3. Область техники изобретения

Данное изобретение относится к сконструированным внеклеточным везикулам (ВВ) (например, экзосомам), которые содержат один или более экзогенных белков, которые в природе не экспрессируются в клетках, из которых продуцируются ВВ (т.е. белки гетерологичных экзосомных везикул), и способы получения и использования таких ВВ.

4. Уровень техники

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

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

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

Подходящие способы создания, выделения и очистки отдельных субпопуляций ВВ (например, экзосом) необходимы для лучшего обеспечения терапевтического использования и других применений технологий на основе ВВ (например, экзосом).

5. Сущность изобретения

Один аспект данного изобретения относится к новым композициям ВВ (например, экзосом), способам получения этих композиций и терапевтическим методам использования композиций. В частности, композиции и способы относятся к внеклеточным везикулам, содержащим гетерологичный белок внеклеточных везикул (ГБВВ) или его фрагмент, при этом внеклеточная везикула продуцируется из клетки-продуцента, которая в природе не экспрессирует ГБВВ, и при этом ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой. Кроме того, данное изобретение относится к использованию ГБВВ, которыми обогащена поверхность донорных ВВ (например, экзосом). Примеры описанных в данном документе ГБВВ включают CD13, MME, ENPP1 и NRP1, в частности рекомбинантно экспрессируемые на поверхности ВВ (например, экзосом), продуцируемых немезенхимальными клетками (например, клетками СНО в случае CD13, MME, ENPP1 и/или NRP1; и/или клетками НЕК в случае CD13, MME и NRP1). Эти белки ГБВВ можно использовать для конструирования ВВ (например, экзосом), как описано в патенте США № 10195290 (который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Таким образом, в одном варианте осуществления в описании предложена внеклеточная везикула, содержащая по меньшей мере один гетерологичный белок внеклеточной везикулы (ГБВВ) или его фрагмент, при этом внеклеточная везикула продуцируется из клетки-продуцента, которая в природе не экспрессирует ГБВВ, и при этом ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой. В определенном варианте осуществления внеклеточная везикула содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 гетерологичных белков внеклеточных везикул (ГБВВ) или их фрагментов, при этом внеклеточная везикула продуцируется из клетки-продуцента, которая в природе не экспрессирует ГБВВ, и при этом ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой. В целом, если не указано иное, ссылки на "по крайней мере один ГБВВ" и "2, 3, 4, 5... ГБВВ" указывают на присутствие (если больше одного) отдельных типов или

разновидностей ГБВВ (например, ГБВВ с разными аминокислотными последовательностями), а не на количество молекул ГБВВ (любого типа) на ВВ (например, экзосоме), которых будет намного больше.

В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного ГБВВ на ВВ (например, экзосомах), продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 20, около 80, около 125 или около 200 спектральных совпадений пептидов (ССП), измеренных с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 20 спектральных совпадений пептидов (ССП), измеренных с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 80 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 125 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 170 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 200 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, составляет около 177 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, составляет около 742 спектральных совпадений пептидов (ССП) измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного ГБВВ на ВВ (например, экзосомах), продуцируемых донорской клеткой, составляет от около 20 до около 80 ССП или от около 80 до около 200 ССП, измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень по меньшей мере одного ГБВВ на экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, составляет от около 20 до около 80 спектральных совпадений пептидов (ССП), измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень по меньшей мере одного ГБВВ на экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, составляет от около 80 до около 200 спектральных совпадений пептидов (ССП), измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень по меньшей мере одного ГБВВ на экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, составляет от около 150 до около 750 спектральных совпадений пептидов (ССП), измеренных с помощью ЖХ-МС/МС. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ продуцируется естественным образом донорской клеткой, которая продуцирует экзосомы, и при этом уровень по меньшей мере одного ГБВВ в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой, равен или превышает около 5% от общего содержания белка в экзосомах, продуцируемых донорской клеткой.

Дополнительные варианты осуществления включают внеклеточные везикулы, такие как те, что описаны в приведенном выше кратком изложении, при этом по меньшей мере один ГБВВ или его фрагмент представляет собой слитый белок. Используемый в данном документе термин "слитый белок" относится к двум или более белкам, которые присоединены друг к другу. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах слитый белок содержит ГБВВ и экзогенную биологически активную молекулу (например, антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). В некоторых аспектах два или более белка (например, ГБВВ и экзогенная биологически активная молекула) могут быть слиты друг с другом. В некоторых аспектах два или более белка (например, ГБВВ и экзогенная биологически активная молекула) могут быть соединены линкером. В родственных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ или его фрагмент модифицирован путем добавления функциональной группы. В родственных вариантах осуществления функциональная группа обладает аффинностью к связывающему агенту. В родственных вариантах осуществления функциональная группа представляет собой аффинный маркер. В определенных вариантах осуществления аффинный маркер представляет собой пептид. В других родственных вариантах осуществления функциональная группа представляет собой терапевтическое соединение. В других родственных вариантах осуществления терапевтическое соединение выбрано из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида и любой их комбинации. В других родственных вариантах осуществления терапевтическое соединение выбрано

из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов, малых молекул и любой их комбинации. В других родственных вариантах осуществления терапевтическое соединение представляет собой антитело или его фрагмент. В дополнительных родственных вариантах осуществления терапевтическое соединение представляет собой фермент, лиганд, рецептор или их фрагмент. В других родственных вариантах осуществления функциональная группа представляет собой нацеливающую группу, которая в некоторых вариантах осуществления может быть специфичной (например, к органу, ткани или клетке). В родственных вариантах осуществления, при этом по меньшей мере один ГБВВ представляет собой слитый белок, слитый белок содержит линкер. В родственных вариантах осуществления ВВ (например, экзосомы), описанные выше, дополнительно содержат линкер между по меньшей мере одним ГБВВ или его фрагментом и присоединенной к нему функциональной группой. В родственных вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер или жесткий линкер. В других родственных вариантах осуществления линкер представляет собой углеродный линкер с прямой цепью, углеродный линкер с разветвленной цепью, гетероциклический углеродный линкер или пептидный линкер. В других родственных вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. Данное описание также включает внеклеточные везикулы, описанные в приведенном выше кратком изложении, где клетка-продуцент выбрана из группы, состоящей из клеток НЕК, CHO, MB-231, Raji, PER.C6, CAP, MCK и любой их комбинации. В родственных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ выбран из группы, состоящей из БВВ фибробластов легких, БВВ клеток эндотелия аорты, БВВ клеток острого миелоидного лейкоза, БВВ моноцитов, БВВ В-клеточной лимфомы, БВВ макрофагов, БВВ клеток эндотелия головного мозга, БВВ мезенхимальных клеток и любой их комбинации. В родственных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ представляет собой БВВ человека, БВВ мыши, ВЕР крысы, БВВ собаки или БВВ обезьяны. В других родственных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ выбран из группы, состоящей из CD13, MME, ENPP1 и NRP1 или их фрагмента. В других родственных вариантах осуществления по меньшей мере один ГБВВ выбран из группы, состоящей из CD13, MME, ENPP1 и NRP1 или их фрагмента, и клетка-продуцент представляет собой клетку CHO. В другом родственном варианте осуществления по меньшей мере один ГБВВ выбран из группы, состоящей из CD13, MME и NRP1 или их фрагмента, и клетка-продуцент представляет собой клетку CHO или клетку НЕК.

В другом родственном варианте осуществления по меньшей мере один ГБВВ во внеклеточной везикуле, описанной выше, выбран из группы, состоящей из PTGFRN, BSG, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчика АТФ или его фрагмента и любой их комбинации. В некоторых аспектах клетка-продуцент представляет собой клетку, которая не производит эти белки естественным образом. В родственном варианте осуществления внеклеточная везикула, описанная в приведенном выше кратком изложении, дополнительно содержит БВВ, выбранный из группы, состоящей из PTGFRN, BSG, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчика АТФ или его фрагмента и любой их комбинации. В родственных вариантах осуществления в описании предложена внеклеточная везикула (например, экзосома), описанная в данном документе, где клетка-продуцент представляет собой клетку нечеловеческого происхождения и где по меньшей мере один ГБВВ представляет собой ГБВВ человека. В качестве альтернативы, клетка-продуцент может быть клеткой человека, и по меньшей мере один ГБВВ не является человеческим ГБВВ.

Дополнительные родственные варианты осуществления включают фармацевтические композиции, содержащие любую из внеклеточных везикул, описанных выше. Другой аспект данного описания включает набор, содержащий внеклеточную везикулу или фармацевтический состав, описанный в кратком изложении выше, где внеклеточная везикула или фармацевтический состав содержится в контейнере или упаковке, и где набор дополнительно содержит инструкции, описывающие рекомендованное применение внеклеточной везикулы или фармацевтического состава. Данное изобретение также включает способы лечения пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту эффективного количества любой из внеклеточных везикул или фармацевтических составов, описанных выше.

В данном описании дополнительно предложен способ экспрессии не встречающегося в природе белка в ВВ, полученной из клетки, включающий трансфекцию нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный белок внеклеточных везикул (ГБВВ) или его фрагмент в клетке, и выделение ВВ, содержащей ГБВВ или его фрагмент, из клетки, при этом ГБВВ не встречается в природе в ВВ, полученной из клетки. В определенных аспектах ВВ включает в себя любые ВВ, раскрытые в данном описании. В некоторых аспектах способ экспрессии не встречающегося в природе белка в ВВ может дополнительно включать характеристику ГБВВ ВВ. Описанные в данном документе ГБВВ могут использоваться в различных вариантах осуществления данного изобретения. Один аспект данного изобретения относится к созданию слитого белка путем конъюгирования ГБВВ с функциональным соединением (например, экзогенными биологически активными молекулами, раскрытыми в данном документе) и получения сконструированной ВВ (например, экзосомы), содержащей модифицированный белок на поверхности. Например, нативный полноразмерный или биологически активный фрагмент терапевтического белка может быть перенесен на поверхность ВВ (например, экзосом) путем конъюгирования с белками, обогащенными ГБВВ, или их фрагментами. Считается, что способы с использованием описанных в данном документе ГБВВ в некоторых случаях улучшены в определенных аспектах по сравнению с дру-

гими родственными системами (например, Lamp2B, PDGFR, лактадгерин CD9, CD63 и/или CD81 или их фрагменты).

Другой аспект данного изобретения относится к очистке ВВ (например, экзосомы) путем аффинной очистки из гетерогенного раствора, такого как среда для культивирования клеток или плазма, с использованием ГБВВ. Некоторые варианты осуществления относятся к выделению субпопуляции ВВ (например, экзосом) из пула ВВ (например, экзосом) с использованием поверхностных маркеров, специфических для субпопуляции ВВ (например, экзосом).

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

Другой аспект данного изобретения относится к получению или применению поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы) предназначенной для более эффективной аффинной очистки или для презентации целевого фрагмента или терапевтически релевантного белка (например, экзогенных биологически активных молекул, раскрытых в данном документе) на поверхности. Например, поверхности ВВ (например, экзосомы) могут быть модифицированы для удержания на поверхности полно-размерных ГБВВ и/или фрагментов или модифицированных белков ГБВВ с более высокой плотностью.

Данное описание, кроме того, относится к клетке-продуценту или способу генерации клетки-продуцента для выработки такой поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы). Экзогенный полинуклеотид (например, кодирующий ГБВВ) может быть временно или стабильно введен в клетку-продуцент, чтобы заставить клетку-продуцент вырабатывать поверхностно-сконструированную ВВ (например, экзосому). В частности, аспект данного изобретения относится к способу выделения ВВ (например, экзосомы), включающему следующие этапы

- (1) предоставление образца, содержащего ВВ (например, экзосомы);
- (2) контактирование образца со связывающим агентом, имеющим сродство к белку-мишени, где белок-мишень включает ГБВВ (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент или вариант); и
- (3) выделение ВВ (например, экзосомы) на основе связывания между целевым белком и связывающим агентом.

В некоторых вариантах осуществления образец получают из клетки, выращенной *in vitro*, клетка необязательно представляет собой клетку НЕК293, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или мезенхимальную стволовую клетку (МСК). В некоторых вариантах осуществления образец получают из жидкости организма субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии целевого белка. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экспрессионную плазмиду, кодирующую целевой белок. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для включения экзогенной последовательности, экспрессирующей метку, имеющую аффинность к связывающему агенту, причем экзогенная последовательность встраивается в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце эндогенной последовательности, кодирующей ГБВВ (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1). В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность не кодирует IGSF8. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный внутри эндогенной последовательности, кодирующей ГБВВ (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1).

В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий маркер и CD13, MME, ENPP1 или NRP1 или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосома) содержит целевой белок. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не является IGSF8 или его фрагментом или модификацией. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для снижения экспрессии ADAM10.

В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосома) содержит целевой белок. В некоторых вариантах осуществления целевой белок выбран из CD13, MME, ENPP1 и NRP1. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит фрагмент или вариант CD13, MME, ENPP1 или NRP1. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий CD13, MME, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент, или вариант, и аффинный маркер, где аффинный маркер обладает аффинностью к связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или модификации.

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

В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку. В некоторых ва-

риантах осуществления стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает следующие этапы:

(1) приведение в контакт подмножества образца с другим связывающим агентом, обладающим аффинностью к другому целевому белку; и

(2) выделение ВВ (например, экзосомы) на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом.

В некоторых вариантах осуществления другой целевой белок включает транспортер CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент, или вариант. В некоторых аспектах целевой белок содержит CD13 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит ММЕ (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант). В некоторых вариантах осуществления другой целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33.

Другой аспект данного изобретение относится к ВВ (например, экзосоме), полученной способами, представленными в данном документе.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ВВ (например, экзосому) по данному изобретению и вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более низкую концентрацию макромолекул, чем образец, содержащий источник ВВ (например, экзосом), где макромолекулы представляют собой нуклеиновые кислоты, примесные белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит макромолекул.

Другой аспект данного изобретения относится к ВВ (например, экзосоме), содержащей целевой белок, где по меньшей мере часть целевого белка экспрессируется из экзогенной последовательности, и целевой белок содержит ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1, или NRP1, или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит CD13 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит ММЕ (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит IGSF8 или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосома) выделяется на основе связывания между целевым белком и связывающим агентом.

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

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

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномный сайт, расположенный на 3' или 5' конце эндогенной последовательности, кодирующей CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность вставляется в геномную последовательность, кодирующую CD13, ММЕ, ENPP1, или NRP1. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность не кодирует IGSF8.

В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент, или вариант, и аффинный маркер, где аффинный маркер обладает аффинностью к связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содержащий CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1 или его фрагмент или вариант, и терапевтическое соединение. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

Терапевтическое соединение может быть выбрано из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение содержит линкер. Терапевтическое соединение может быть выбрано из группы, состоящей из нуклеотидов, аминокислот, липидов, углеводов и малых молекул.

Функциональные группы и родственные соединения, например, терапевтические соединения, которые могут быть присоединены к ГБВВ или его фрагментам, включают антитела или их фрагменты или варианты. Функциональная группа, которая представляет собой пептид, может быть ферментом, лигандом, рецептором или их фрагментом или вариантом. Терапевтический пептид может представлять собой антибактериальный пептид или его фрагмент или вариант.

В некоторых вариантах осуществления целевой белок представляет собой гибридный белок, содер-

жащий CD13, MME, ENPP1 или NRP1 или его фрагмент или вариант, и нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть специфичным для органа, ткани или клетки. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосома) дополнительно содержит второй, другой целевой белок, где другой целевой белок содержит CD13, MME, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосома) выделяется на основе связывания между другим целевым белком и другим связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления целевой белок не содержит IGSF8 или его фрагмента.

В одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ВВ (например, экзосому) по данному изобретению и вспомогательное вещество.

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

В одном аспекте данное изобретение направлено на клетку для продуцирования представленной в данном документе ВВ (например, экзосомы).

В частности, некоторые варианты осуществления относятся к клетке для продуцирования ВВ (например, экзосом), содержащей экзогенную последовательность, вставленную в геномную последовательность, кодирующую CD13, MME, ENPP1 или NRP1, где экзогенная последовательность и геномная последовательность кодируют гибридный белок. В некоторых вариантах геномная последовательность не кодирует IGSF8.

Экзогенная последовательность может кодировать аффинную метку.

Экзогенная последовательность может кодировать терапевтический пептид.

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

Экзогенная последовательность может кодировать нацеливающий фрагмент.

Нацеливающий фрагмент может быть специфичным для органа, ткани или клетки.

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

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

В другом аспекте данное изобретение относится к способу выделения неэкзосомного материала, включающему стадии

обеспечения образца, содержащего ВВ (например, экзосому) и материал не из ВВ (например, экзосомы);

приведения в контакт образца со связывающим агентом, обладающим аффинностью к целевому белку, где целевой белок включает CD13, MME, ENPP1 или NRP1, или его фрагмент или вариант, индуцируя тем самым связывание ВВ (например, экзосомы) со связывающим агентом; и выделение материала не из ВВ (например, экзосомы).

В некоторых аспектах целевой белок содержит CD13 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит MME (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант). В некоторых аспектах целевой белок содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант).

В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой вирус или белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой лентивирус, ретровирус, аденоассоциированный вирус или другой вирус с оболочкой или без оболочки. В некоторых вариантах осуществления изобретения неэкзосомный материал представляет собой рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения изолированный неэкзосомный материал по существу не содержит ВВ (например, экзосом). В некоторых вариантах осуществления целевой белок дополнительно содержит аффинную метку, где аффинная метка имеет аффинность к связывающему агенту. В некоторых вариантах осуществления целевой белок содержит полипептид

SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент включает иммуноглобулин, белок, пептид или малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент прикреплен к твердой подложке, причем необязательно твердая подложка содержит пористую агарозную гранулу, микротитровальный планшет, магнитную гранулу, или мембрану. В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления стадию приведения в контакт образца со связывающим агентом осуществляют путем внесения образца в хроматографическую колонку.

В некоторых вариантах осуществления способы очистки, описанные в данном документе, используются для очистки нановезикул. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, направлены на нановезикулы. Дополнительные варианты осуществления данного изобретения более подробно описаны ниже.

6. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен точечный график, показывающий совпадения пептидных спектров отдельных белков, идентифицированных в ВВ (например, экзосомах), полученных из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (ось у) или из НЕК293 (ось х). Отдельные точки соответствуют разным белкам. ВВ, полученные из МСК обогащены CD13 и ММЕ (показаны стрелками), которые не обнаруживаются в ВВ из НЕК293. В таблице под точечным графиком показана молекулярная масса (ММ) белков CD13 и ММЕ и их относительная экспрессия в клетках НЕК293 (НЕК) и МСК.

На фиг. 2А и 2В показана экспрессия белков CD13 и PTGFRN в ВВ (например, экзосомах), полученных из клеток-продуцентов НЕК293, которые были модифицированы для сверхэкспрессии либо PTGFRN, либо CD13. На фиг. 2А представлен анализ ДСН-ПААГ-электрофореза для ВВ дикого типа (ДТ) (т.е. немодифицированных), сверхэкспрессирующих PTGFRN и CD13, полученных из НЕК293. На фиг. 2В показана количественная оценка экспрессии белка CD13 на сконструированных ВВ, полученных из НЕК293, с помощью ИФА с использованием стандарта рекомбинации CD13 (rCD13). График, показанный слева, является стандартным. График, показанный справа, относится к ВВ (например, экзосомам).

На фиг. 3А и 3В представлен анализ биоактивности белка CD13, экспрессированного на сконструированных ВВ, полученных из НЕК293 (например, экзосомах). На фиг. 3А показана ферментативная активность рекомбинантного белка CD13 (rCD13) с использованием коммерчески доступного набора для анализа активности CD13 (BioVision K523). На фиг. 3В показана биоактивность белка CD13, экспрессированного на сконструированных ВВ, полученных из НЕК293 (например, экзосомах), с использованием того же набора для анализа активности CD13. Рекомбинантные белки CD13 были протестированы при 6 различных концентрациях: (i) 880 нг/мл, (ii) 440 нг/мл, (iii) 293 нг/мл, (iv) 220 нг/мл, (v) 110 нг/мл и (vi) 55 нг/мл. На фиг. 3В ВВ были протестированы при трех различных концентрациях: (i) $1,6 \times 10^{10}$ п/мл, (ii) $7,9 \times 10^9$ п/мл и (iii) $4,0 \times 10^9$ п/мл. Несконструированные ВВ (т.е. дикого типа) использовали в качестве контроля.

На фиг. 4А и 4В представлен анализ экспрессии GFP, конъюгированного с белками CD13 и ММЕ, экспрессируемых на сконструированных ВВ, полученных из НЕК293 (например, экзосомах). На фиг. 4А показана экспрессия GFP, измеренная с помощью ДСН-ПААГ анализа. ВВ, экспрессирующие GFP, конъюгированный с PTGFRN (PTGFRN-GFP), использовали в качестве контроля. На фиг. 4В показано сравнение экспрессии GFP, конъюгированного с одним из следующих каркасных белков: (i) LAMP2B, (ii) pDisplay, (iii) PTGFRN, (iv) ММЕ и (v) CD13. Количество GFP измеряли спектрофотометрически. Необработанные измерения флуоресценции показаны для каждого из различных белков каркаса.

7. Подробное описание

7.1. Определения.

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

Используемый в данном документе термин "внеклеточная везикула" или "ВВ" относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы включают все связанные с мембраной везикулы (например, экзосомы, нановезикулы), которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. Обычно внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различные макромолекулярные грузы, которые могут находиться во внутреннем пространстве (т.е. просвете), располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. Груз может содержать нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) включает один или более грузов или другие экзогенные биологически активные молекулы. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) могут содержать один или более фрагментов каркаса. В определенных аспектах один или более фрагментов каркаса не экспрессируются в природе в клетках, из которых продуцируются ВВ (например, экзосомы). В качестве примера и без ограничения внеклеточные везикулы включают апоптотические тела, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым

или косвенным воздействием (например, путем серийного выдавливания или обработки щелочными растворами), пузырьковые органеллы и везикулы, продуцируемые живыми клетками (например, прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов, прокариотических или эукариотических клеток и/или культивируемых клеток. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) описанные в данном документе, продуцируются клетками, которые были модифицированы для экспрессии одного или более продуктов трансгена. Соответственно к ВВ по данному изобретению не относятся ВВ (например, экзосомы), встречающиеся в природе.

Используемый в данном документе термин "экзосома" относится к полученному из клетки небольшому (диаметром от 20 до 300 нм, более предпочтительно от 40 до 200 нм) пузырьку, содержащему мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая генерируется из клетки (например, клетки-продуцента) прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной. В определенных аспектах экзосомы по данному изобретению имеют диаметр около 20-290, 20-280, 20-270, 20-260, 20-250, 20-240, 20-230, 20-220, 20-210, 20-200, 20-190, 20-180, 20-170, 20-160, 20-150, 20-140, 20-130, 20-120, 20-110, 20-100, 20-90, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, 20-30, 30-300, 30-290, 30-280, 30-270, 30-260, 30-250, 30-240, 30-230, 30-220, 30-210, 30-200, 30-190, 30-180, 30-170, 30-160, 30-150, 30-140, 30-130, 30-120, 30-110, 30-100, 30-90, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, 30-40, 40-300, 40-290, 40-280, 40-270, 40-260, 40-250, 40-240, 40-230, 40-220, 40-210, 40-200, 40-190, 40-180, 40-170, 40-160, 40-150, 40-140, 40-130, 40-120, 40-110, 40-100, 40-90, 40-80, 40-70, 40-60, 40-50, 50-300, 50-290, 50-280, 50-270, 50-260, 50-250, 50-240, 50-230, 50-220, 50-210, 50-200, 50-190, 50-180, 50-170, 50-160, 50-150, 50-140, 50-130, 50-120, 50-110, 50-100, 50-90, 50-80, 50-70, 50-60, 60-300, 60-290, 60-280, 60-270, 60-260, 60-250, 60-240, 60-230, 60-220, 60-210, 60-200, 60-190, 60-180, 60-170, 60-160, 60-150, 60-140, 60-130, 60-120, 60-110, 60-100, 60-90, 60-80, 60-70, 70-300, 70-290, 70-280, 70-270, 70-260, 70-250, 70-240, 70-230, 70-220, 70-210, 70-200, 70-190, 70-180, 70-170, 70-160, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 70-80, 80-300, 80-290, 80-280, 80-270, 80-260, 80-250, 80-240, 80-230, 80-220, 80-210, 80-200, 80-190, 80-180, 80-170, 80-160, 80-150, 80-140, 80-130, 80-120, 80-110, 80-100, 80-90, 90-300, 90-290, 90-280, 90-270, 90-260, 90-250, 90-240, 90-230, 90-220, 90-210, 90-200, 90-190, 90-180, 90-170, 90-160, 90-150, 90-140, 90-130, 90-120, 90-110, 90-100, 100-300, 110-290, 120-280, 130-270, 140-260, 150-250, 160-240, 170-230, 180-220 или 190-210 нм. Размер ВВ (например, экзосомы), описанный в данном документе, может быть измерен в соответствии с способами, описанными ниже.

В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) по данному изобретению содержит билипидную мембрану, содержащую внутреннюю поверхность и внешнюю поверхность. В определенных аспектах внутренняя поверхность обращена к внутреннему ядру (т.е. просвету) ВВ (например, экзосомы). В определенных аспектах внешняя поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или клетки-мишени.

В некоторых аспектах мембрана ВВ (например, экзосомы) содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых аспектах мембрана ВВ (например, экзосомы) содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерин и фосфатидилсерин.

В некоторых аспектах 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., *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 819:170. В некоторых аспектах состав внешней мембраны составляет около 70-90% холинфосфолипидов, около 0-15% кислых фосфолипидов и около 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутренней мембраны составляет около 15-40% холинфосфолипидов, около 10-50% кислых фосфолипидов и около 30-60% фосфатидилэтаноламина.

В некоторых аспектах экзосома содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (например, терапевтический агент), приемник (например, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (например, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (например, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах экзосомы по данному изобретению содержат один или более фрагментов каркаса. В определенных аспектах один или более фрагментов каркаса не экспрессируются в природе в клетках, из которых продуцируются экзосомы. Экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. Экзосома - это вид внеклеточного пузырька. Обычно производство/биогенез экзосом не приводит к разрушению клетки-продуцента. В некоторых аспектах экзосомы по данному изобретению продуцируются клетками, которые экспрессируют один или более продуктов трансгена. Экзосомы по данному изобретению модифицированы (например, сконструированы для сверхэкспрессии белка, который не экспрессируется в природе в клетке-продуценте) и, следовательно, не содержат экзосомы природного происхождения.

Используемый в данном документе термин "гетерологичный белок экзосомных везикул" или "ГБВВ" относится к белку, который гетерологично экспрессируется в ВВ (например, экзосомах), продуцируемых конкретным типом клеток, где этот тип клеток не экспрессирует белок естественным образом,

но где белок естественным образом экспрессируется в ВВ (например, экзосомах) из другого типа клеток. Последний тип клеток упоминается в данном документе как "донорская клетка", а первый тип клеток как "клетка-продуцент".

Используемый в данном документе термин "нановезикула" относится к маленькому (диаметром от 20 до 250 нм, более предпочтительно от 30 до 150 нм) клеточному пузырьку, содержащему мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая генерируется из клетки (например, клетки-продуцента) путем прямой или косвенной манипуляции, так что нановезикула не будет произведена клеткой-продуцентом без манипуляции. Подходящие манипуляции с клеткой-продуцентом включают, но не ограничиваются ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. Производство нановезикул в некоторых случаях может привести к разрушению клетки-продуцента. В некоторых аспектах описанные в данном документе популяции нановезикул по существу не содержат везикул, которые происходят из клеток-продуцентов путем прямого отпочкования от плазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с плазматической мембраной. В некоторых аспектах нановезикула содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (например, терапевтический агент), приемник (например, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (например, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (например, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. В некоторых аспектах нановезикулы описанные в данном изобретении могут содержать один или более фрагментов каркаса. В определенных аспектах один или более фрагментов каркаса не экспрессируются в природе в клетках, из которых продуцируются нановезикулы. Сразу после получения нановезикулы из клетки-продуцента в соответствии с описанными выше манипуляциями, она может быть выделена из клетки-продуцента на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. Нановезикула - это вид внеклеточного пузырька. В контексте данного описания нановезикулы модифицированы (например, сконструированы для сверхэкспрессии белка, который не экспрессируется в природе в клетке-продуценте) и, следовательно, не содержат нановезикулы природного происхождения.

Используемый в данном документе термин "поверхностно- сконструированная экзосома" относится к экзосоме с мембраной или поверхностью, модифицированной по ее составу, так что мембрана или поверхность сконструированных экзосом отличается либо от таковой экзосомы до модификации, либо от таковой экзосомы природного происхождения. Конструирование может происходить на поверхности экзосомы или на мембране экзосомы, так что поверхность экзосомы изменяется. Например, в состав мембраны входит белок, липид, малая молекула, углевод и т.д. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее или одновременно модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью геной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной геной инженерией. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах описанная в данном документе поверхностно-сконструированная экзосома содержит один или более экзогенных белков (например, фрагменты каркаса, например, гетерологичные белки экзосомных везикул, раскрытые в данном документе) или их фрагмент или вариант, которые могут выступать на поверхности экзосомы или могут быть точкой фиксации (прикрепления) для фрагмента, экспонированного на поверхности экзосомы. В определенных аспектах один или более фрагментов каркаса не экспрессируются в природе в клетках, из которых продуцируются экзосомы. В некоторых аспектах поверхностно-сконструированная экзосома обладает более высокой экспрессией (например, большее количество) природного белка экзосомы (например, PTGFRN) или его фрагмента или варианта, которые могут выступать на поверхность экзосомы или могут быть точкой фиксации (прикрепления) для фрагмента, экспонированного на поверхность экзосомы. Хотя приведенное выше определение дано в контексте экзосом, другие типы внеклеточных везикул также могут быть поверхностно-сконструированы аналогичным образом. Следовательно, если не указано иное, описания, относящиеся к поверхностно-сконструированным экзосомам, могут в равной степени относиться к другим внеклеточным везикулам.

Используемый в данном документе термин "просветно-сконструированная экзосома" относится к экзосоме с мембраной или просветом экзосомы, модифицированным по своему составу, так что просвет сконструированных экзосом отличается либо от таковой экзосомы до модификации, либо от таковой экзосомы природного происхождения. Конструирование может происходить непосредственно в просвете или на мембране экзосомы, так что просвет экзосомы изменяется. Например, в состав мембраны входит белок, липид, малая молекула, углевод и т.д., так что просвет 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 геной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной геной инженерией. В некоторых аспектах просветно-сконструированная экзосома содержит одну или более экзогенных биологически активных молекул (например, фрагменты каркаса, например, описанные в данном документе гетерологичные белки экзосомных везикул). В определенных аспектах экзогенные биологически активные молекулы могут содержать экзогенный белок (т.е. белок, который ВВ, например экзосома, не экспрессирует в естественных условиях) или его фрагмент или вариант, которые могут выступать в

просвет экзосомы или могут быть точкой фиксации (прикрепления) для фрагмента, экспонированного на внутреннем слое экзосомы. В определенных аспектах один или более фрагментов каркаса не экспрессируются в природе в клетках, из которых продуцируются экзосомы. В некоторых аспектах просветно-сконструированная экзосома обладает более высокой экспрессией природного белка экзосомы или его фрагмента или варианта, которые могут выступать на поверхность экзосомы или могут быть точкой фиксации (прикрепления) для фрагмента, экспонированного в просвет экзосомы. Хотя приведенное выше определение дано в контексте экзосом, другие типы внеклеточных везикул также могут быть просветно-сконструированы аналогичным образом. Следовательно, если не указано иное, описания, относящиеся к просветно-сконструированным экзосомам, могут в равной степени относиться к другим внеклеточным везикулам.

Используемый в данном документе термин "модификация", когда он используется в контексте белка, относится к белку, имеющему по меньшей мере 15% идентичности последовательности с немутантной аминокислотной последовательностью белка. Модификация белка включает фрагмент или вариант белка. Модификация белка может дополнительно включать химическую или физическую модификацию фрагмента или варианта белка.

Термин "модифицированный" при использовании в контексте ВВ, например экзосом, описанных в данном документе, относится к изменению или конструированию ВВ, например экзосомы и/или ее клетки-продуцента, так что модифицированная ВВ, например экзосома, отличается от встречающейся в природе ВВ, например экзосомы. В некоторых аспектах модифицированная ВВ, например, описанная в данном документе экзосома, содержит мембрану, которая отличается по составу белка, липида, малой молекулы, углевода и т.д. по сравнению с мембраной встречающейся в природе ВВ, например экзосомы (например, мембрана содержит более высокую плотность или количество природных белков экзосом и/или мембрана содержит несколько (например, по меньшей мере две) биологически активных молекул, которые в природе не встречаются в экзосомах (например, терапевтические молекулы (например, антиген), нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). В контексте данного документа биологически активные молекулы, которые в природе не встречаются в экзосомах, также описываются как "экзогенные биологически активные молекулы". Неограничивающие примеры таких экзогенных биологически активных молекул включают описанные в данном документе гетерологичные белки экзосомных везикул (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1), терапевтические молекулы (например, антигены), нацеливающие фрагменты, адъюванты, иммуномодуляторы или их комбинации. В некоторых аспектах такие модификации мембраны изменяют внешнюю поверхность ВВ, например экзосомы (например, поверхностно-сконструированные ВВ, например экзосомы, описанные в данном документе).

Используемые в данном документе термины "фрагмент каркаса" и "каркас" могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к молекуле, которая может использоваться для закрепления груза или любой другой представляющей интерес экзогенной биологически активной молекулы (например, нацеливающего фрагмента, адъюванта и/или иммуномодулятора) к ВВ, например, на внешней поверхности ВВ, например экзосоме. В определенных аспектах фрагмент каркаса содержит синтетическую молекулу. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит неполипептидный фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит липид, углевод или белок, который в естественно присутствует в ВВ, например экзосоме. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит липид, углевод или белок, который в естественно не присутствует в ВВ, например экзосоме. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит описанный в данном документе гетерологичный белок экзосомных везикул. В некоторых аспектах фрагмент каркаса может быть целым белком или его фрагментом (например, функциональным фрагментом, например, наименьшим фрагментом, который способен фиксировать другой фрагмент на внешней поверхности или на просветной поверхности ВВ, например экзосоме). Неограничивающие примеры других фрагментов каркаса, которые можно использовать в данном описании, включают каркас X, каркас Y, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B.

Используемый в данном документе термин "каркас X" относится к белкам экзосом, которые недавно были идентифицированы на поверхности экзосом. См., например, патент США № 10195290, который в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры белков каркаса X включают: негативный регулятор рецептора простагландина F2 ("белок PTGFRN"); базигин ("белок BSG"); член суперсемейства иммуноглобулинов 2 ("белок IGSF2"); член суперсемейства иммуноглобулинов 3 ("белок IGSF3"); член суперсемейства иммуноглобулинов 8 ("белок IGSF8"); интегрин бета-1 ("белок ITGB1"); интегрин альфа-4 ("белок ITGA4"); тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 ("белок SLC3A2"); и класс белков-транспортёров АТФ ("белок АТР1А1", "белок АТР1А2", "белок АТР1А3", "белок АТР1А4", "белок АТР1В3", "белок АТР2В1", "белок АТР2В2", "белок АТР2В3", "белок АТР2В").

Используемый в данном документе термин "каркас Y" относится к белкам экзосом, которые недавно были идентифицированы в просвете экзосом. См., например, международную заявку № PCT/US2018/061679, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Неограничивающие примеры белков каркаса Y включают: миристоилированный аланин-богатый субстрат протеинкиназы С ("белок MARCKS"); миристоилированный аланин-богатый субстрат протеинкиназы С,

такой как 1 ("белок MARCKSL1"); и белок мозга 1, растворимый в кислоте ("белок BASP1"). Используемый в данном документе термин "фрагмент" белка относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче, чем встречающаяся в природе последовательность, например, с удаленным N-и/или C-концом и/или удаленной любой другой частью белка по сравнению с белком природного происхождения. Предпочтительно, чтобы фрагмент гетерологичного белка экзосомных везикул, описанный в данном документе (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1), сохранял способность специфически нацеливаться на ВВ (например, экзосомы). В некоторых аспектах описанный в данном документе фрагмент гетерологичного белка экзосомных везикул сохраняет способность закреплять другой фрагмент на внешней поверхности или на поверхности просвета ВВ (например, экзосомы). Такой фрагмент также называют "функциональным фрагментом". Используемый в данном документе термин "функциональный фрагмент" может относиться к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. В некоторых аспектах термин "функциональный фрагмент" относится к фрагменту белка, который способен экспрессироваться в линии клеток, которая естественно не экспрессирует белок полной длины. Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом в данном смысле, можно выполнить любыми известными в данной области способами определения содержания белка в ВВ (например, экзосомах), включая вестерн-блоты, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, например, как GFP. В некоторых аспектах описанный в данном документе гетерологичный белок экзосомных везикул 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 около 100% способности, например, способность закреплять фрагмент природного гетерологичного белка экзосомных везикул. В конкретном варианте осуществления фрагмент CD13, MME, ENPP1 или NRP1 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 около 100% способности встречающихся в природе CD13, MME, ENPP1 или NRP1 специфически нацеливаться на ВВ (например, экзосомы) и/или закрепить другой фрагмент на ВВ (например, на внешней поверхности).

Используемый в данном документе термин "вариант" белка относится к белку, который разделяет определенную идентичность аминокислотной последовательности с другим белком при выравнивании способом, известным в данной области. Вариант белка может включать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки считывания или перестройку в другой белок. В конкретном варианте осуществления вариант представляет собой вариант, имеющий по меньшей мере около 70% идентичности с CD13 (также известный в данной области как, например, мембранная аланиламинопептидаза, аланиламинопептидаза (AAP), аминокислотаза N (AP-N), аминокислотаза M, GP150, LAP1, P150, PEPN, ANPEP или микросомальная аминокислотаза), MME (также известный в данной области как, например, мембранная металлоэндопептидаза, неприлизин, нейтральная эндопептидаза (NEP), кластер дифференциации 10 (CD10), антигенный маркер острого лимфоцитарного лейкоза (CALLA), эластаза фибробластов кожи, атриопептидаза или энкефалиназа), ENPP1 (также известный в данной области как, например, член семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1, фосфодиэстераза/нуклеотидпирофосфатаза 1, гликопротеин плазматической мембраны PC-1, поверхностный маркер 1 компонента мембраны хромосомы 6, щелочная фосфодиэстераза 1, антиген Ly-41, ARHR2 или COLED) или NRP1 (также известный в данной области как, например, нейропиплин 1, рецептор 165 фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF165R), CD304, BDCA4, NP1 или NRP). В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов CD13 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с CD13 согласно SEQ ID NO: 47 или с его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов MME имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с MME согласно SEQ ID NO: 48 или с его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов ENPP1 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с ENPP1 согласно SEQ ID NO: 49 или с его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или варианты фрагментов NRP1 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с NRP1 согласно SEQ ID NO: 50 или с его функциональным фрагментом. В каждом из вышеупомянутых случаев предпочтительно, чтобы вариант или вариант фрагмента сохранял функцию белка (например, способность специфически нацеливаться на ВВ (например, экзосомы)).

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен 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 поляр-

ные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменяется другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной цепочкой, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

Термин "процент идентичности последовательности" или "процент идентичности" между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к количеству идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в указанной области при сравнении, с учетом добавлений или делеций (т.е. пробелов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающее положение - это любое положение, в котором идентичный нуклеотид или аминокислота присутствует как в целевой, так и в эталонной последовательности. Пробелы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, поскольку пробелы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогичным образом пробелы, представленные в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку подсчитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты из эталонной последовательности.

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

Упоминание любого белка, представленного в настоящем документе, охватывает функциональный вариант белка. Термин "функциональный вариант" белка относится к варианту белка, который сохраняет способность специфически нацеливаться на ВВ (например, экзосомы).

Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих. В одном аспекте варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые вызывают молчащие замены, добавления или делеции, но которые не меняют свойства или активность кодируемого полипептида. В другом аспекте варианты нуклеотидов продуцируются молчащими заменами из-за вырожденности генетического кода. В других аспектах варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, удалены или добавлены в любой комбинации. Варианты полинуклеотидов могут быть получены по множеству причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека на другие, например, бактериального хозяина, такого как *E.coli*).

Встречающиеся в природе варианты называются "аллельными вариантами" и относятся к одной из более альтернативных форм гена, занимающего данный локус в хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьироваться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в данное описание. В качестве альтернативы варианты неприродного происхождения могут быть получены способами мутагенеза или прямым синтезом.

Используя известные способы белковой инженерии и технологию рекомбинантных ДНК, можно создать 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. Ron et al., *J. Biol. Chem.*, 268:2984-2988 (1993), полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки, сообщили о вариантах белков KGF, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 концевых аминокислотных остатков. Точно так же гамма-интерферон проявлял в десять раз более высокую активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков с карбоксиконца этого белка (Dobeli et al., *J. Biotechnology*, 7:199-216 (1988), полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки).

Более того, имеется множество свидетельств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, аналогичную активности природного белка. Например, Gayle и коллеги (*J. Biol. Chem.*, 268:22105-22111 (1993), полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки) провели обширный мутационный анализ человеческого цитокина IL-1a. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a, это составляло в среднем 2,5 замены аминокислот на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации были исследованы во всех возможных аминокислотных положениях. Исследователи обнаружили, что "[основная] молекула может

быть изменена с небольшим влиянием на [связывающую или биологическую активность]" (см. раздел "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.

Как указано выше, варианты полипептидов включают, например модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемового компонента, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксихилирование, гликозилирование, образование GPI -якоря, гидроксиглирование, йодирование, метилирование, миристилолирование, окисление, пегилирование (Mei et al., Blood, 116:270-79 (2010), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых аспектах каркас X и/или каркас Y модифицируются в любом удобном месте.

Используемый в данном документе термины "связанный с", "конъюгированный с" и "заякоренный" используются взаимозаменяемо и относятся к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первым фрагментом (например, фрагментом каркаса, например, гетерологичным белком экзосомных везикул) и вторым фрагментом (например, полезной нагрузкой).

Используемый в данном документе термин "клетка-продуцент" относится к клетке, используемой для создания ВВ (например, экзосомы). Клетка-продуцент может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro* или *in vivo*. Клетка-продуцент включает, но не ограничивается ими, клетку, которая, как известно, эффективно генерирует ВВ, например, ВВ (например, экзосомы), например, клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (СНО), мезенхимальные стволовые клетки (МСК), клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN®, клетки амниоцитов CAP®, жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPT-EC/TERT1. В определенных аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, В-клеткой, тучной клеткой, макрофагом, нейтрофилом, клеткой Купфера-Бровича, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах клетка-продуцент по данному изобретению была модифицирована для экспрессии одного или более продуктов трансгена. В некоторых аспектах клетка-продуцент была модифицирована для экспрессии белка (например, гетерологичного белка экзосомных везикул), который клетка-продуцент не экспрессирует естественным образом. В некоторых аспектах ВВ, например экзосомы, используемые в данном описании, не несут антиген на молекуле МНС класса I или класса II, экспонированной на поверхности ВВ, например экзосоме, но вместо этого могут нести антиген в просвете ВВ, например экзосомы, или на поверхности ВВ, например экзосомы, путем присоединения к фрагменту каркаса. Используемый в данном документе термин "молекула МНС класса I" относится к белковому продукту дикого типа или варианта гена HLA класса I, кодирующего молекулу МНС класса I. Соответственно "молекула HLA класса I" и "молекула МНС класса I" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Молекулы МНС класса I являются одними из двух основных классов молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) (другой - МНС класса II) и обнаруживаются на поверхности всех ядерных клеток в телах челюстных позвоночных. Они также встречаются на тромбоцитах, но не на эритроцитах. Их функция заключается в представлении пептидных фрагментов белков внутри клетки для цитотоксических Т-клеток; это вызывает немедленный ответ иммунной системы против определенного чужеродного антигена, отображаемого с помощью белка МНС класса I. Поскольку молекулы МНС класса I представляют пептиды, полученные из цитозольных белков, путь презентации МНС класса I часто называют цитозольным или эндогенным путем. У людей HLA, соответствующие МНС классу I, представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C. Молекула МНС класса I включает две белковые цепи: альфа-цепь и цепь $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2m$). $\beta 2m$ человека кодируется геном B2M. Молекулы МНС класса I связывают пептиды, образующиеся в основном в результате деградации цитозольных белков протеасомой. Комплекс МНС I: пептид затем вставляется через эндоплазматический ретикулум во внешнюю плазматическую мембрану клетки. Пептид эпитопа связывается с внеклеточными частями молекулы МНС класса I. Таким образом, функция МНС класса I заключается в отображении внутриклеточных белков для цитотоксических Т-клеток (CTL). Однако МНС класса I может также отображать пептиды, полученные из экзогенных белков, в процессе, известном как перекрестная презентация.

Нормальная клетка будет отображать пептиды из нормального клеточного обмена белка на своем МНС класса I, и CTL не будут активироваться в ответ на них из-за центральных и периферических механизмов толерантности. Когда клетка экспрессирует чужеродные белки, например, после вирусной ин-

фекции, фракция МНС класса I будет отображать эти пептиды на поверхности клетки. Следовательно, CTL, специфичные для комплекса МНС: пептид, будут распознавать и уничтожать презентующие клетки. В качестве альтернативы, сам по себе МНС класса I может служить ингибирующим лигандом для естественных клеток-киллеров (NK). Снижение нормальных уровней поверхностных МНС I класса, механизм, используемый некоторыми вирусами и некоторыми опухолями для уклонения от ответов CTL, активирует уничтожение NK-клетками.

Используемый в данном документе термин "молекула МНС класса II" относится к белковому продукту дикого типа или варианта гена HLA класса II, кодирующего молекулу МНС класса II. Соответственно "молекула HLA класса II" и "молекула МНС класса II" используются в данном документе взаимозаменяемо. Молекулы МНС класса II представляют собой класс молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), которые обычно обнаруживаются только на профессиональных антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки, мононуклеарные фагоциты, некоторые эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки тимуса и В-клетки. Эти клетки важны для инициирования иммунных ответов. Антигены, представленные пептидами класса II, происходят из внеклеточных белков (не цитозольных, как в МНС класса I).

Подобно молекулам МНС класса I, молекулы класса II также являются гетеродимерами, но в этом случае состоят из двух гомогенных пептидов, цепи α и β , оба из которых кодируются в МНС. Подобозначение $\alpha 1$, $\alpha 2$ и т.д. относится к отдельным доменам в гене HLA; каждый домен обычно кодируется отдельным экзоном внутри гена, и некоторые гены имеют дополнительные домены, которые кодируют лидерные последовательности, трансмембранные последовательности и т.д. Эти молекулы имеют как внеклеточные области, так и трансмембранную последовательность и цитоплазматический хвост. Области $\alpha 1$ и $\beta 1$ цепей объединяются, образуя дистальный к мембране пептид-связывающий домен, в то время как области $\alpha 2$ и $\beta 2$, оставшиеся внеклеточные части цепей, образуют проксимальный к мембране иммуноглобулиноподобный домен. Антигенсвязывающая полость, где связывается антиген или пептид, состоит из двух стенок α -спиралей и β -складчатого листа. Поскольку антигенсвязывающая полость молекул МНС класса II открыта с обоих концов, в то время как соответствующая полость на молекулах класса I закрыта с каждого конца, антигены, представленные молекулами МНС класса II, длиннее, обычно от 15 до 24 аминокислотных остатков. Загрузка молекулы МНС класса II происходит путем фагоцитоза; внеклеточные белки подвергаются эндоцитозу, перевариваются в лизосомах, и полученные эпитопные пептидные фрагменты загружаются на молекулы МНС класса II до их миграции на поверхность клетки. У человека белковый комплекс МНС класса II кодируется генным комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA). HLA, соответствующие МНС классу II, - это HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR. Мутации в генном комплексе HLA могут привести к синдрому "голых" лимфоцитов (BLS), который является типом дефицита МНС класса II. Используемый в данном документе термин "целевой белок" относится к белку, который может быть нацелен на поверхность ВВ (например, экзосомы). Целевой белок может быть немутантным белком, который естественным образом нацелен на мембрану ВВ (например, экзосомы), или фрагментом или вариантом немутантного белка. Целевой белок может представлять собой гибридный белок, содержащий FLAG-метку, терапевтический пептид, нацеливающий фрагмент или другой пептид, присоединенный к немутантному белку или варианту или фрагменту немутантного белка. Целевой белок может содержать трансмембранный белок, цельный белок, периферический белок или растворимый белок, присоединенный к мембране с помощью линкера. Используемый в данном документе термин "загрязняющий белок" относится к белку, который не связан с ВВ (например, экзосомой). Например, загрязняющий белок включает белок, не встроенный в ВВ (например, экзосому) и не прикрепленный к мембране ВВ (например, экзосому) или не встроенный в нее. Используемые в данном документе термины "выделить", "выделенный" и "выделение" или "очистить", "очищенный" и "очистение", а также "извлеченный" и "извлекать" используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию приготовления (например, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных ВВ (например, экзосом), которые прошли один или несколько процессов очистки, например, отбор или обогащение желаемого препарата ВВ (например, экзосомы). В некоторых вариантах осуществления выделение или очистка, используемые в данном документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) ВВ (например, экзосом) из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления выделенная композиция ВВ (например, экзосом) не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других вариантах осуществления выделенная композиция ВВ (например, экзосом) имеет количество и/или концентрацию желаемых ВВ (например, экзосом) в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других вариантах осуществления выделенная композиция ВВ (например, экзосом) 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%, по меньшей мере около 99,9999% или более около 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты ВВ (например, экзосомы) по существу не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты ВВ (например, экзосом) являются на около 100% свободными, на около 99% свободными, на около 98% свободными, на около 97% свободными, на около 96% свободными, на около 95% свободными, на около 94% свободными, на около 93% свободными, на около 92% свободными, на около 91% свободными или около 90% свободными от каких-либо загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. "По существу свободный от остаточных биологических продуктов" может также означать, что композиция ВВ (например, экзосом) не содержит обнаруживаемых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только ВВ (например, экзосомы).

Термин "наполнитель" или "носитель" относится к инертному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый наполнитель" охватывает все вещества, одобренные регулирующим органом федерального правительства США или перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, включая людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены вспомогательные вещества и носители, которые применимы при приготовлении фармацевтической композиции и обычно безопасны, нетоксичны и желательны.

Используемый в данном документе термин "полезная нагрузка" относится к терапевтическому агенту, который действует на цель (например, клетку-мишень), которая контактирует с ВВ (например, экзосомой). Неограничивающими примерами полезной нагрузки, которая может быть включена в ВВ, например экзосомы, являются терапевтическая молекула (например, антиген или иммунодепрессант), адъювант и/или иммуномодулятор. Полезные нагрузки, которые могут быть введены в ВВ (например, экзосому) и/или клетку-продуцент, включают терапевтические 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, киРНК, антисмысловый олигонуклеотид, фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РМО) или пептид-конъюгированный фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО)), аминокислоты (например, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают трансляцию), полипептиды (например, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (например, низкомолекулярные препараты и токсины). Используемый в данном документе термин "биологически активная молекула" относится к агенту, который обладает активностью в биологической системе (например, клетке или человеку), включая, но не ограничиваясь ими, белок, полипептид или пептид, включая, но не ограничиваясь, структурный белок, фермент, цитокин (такой как интерферон и/или интерлейкин), антибиотик, поликлональное или моноклональное антитело или его эффективная часть, такая как Fv-фрагмент, причем антитело или его часть могут быть природными, синтетическими или гуманизированными, пептидный гормон, рецептор, сигнальная молекула или другой белок; нуклеиновая кислота, как определено ниже, включая, помимо прочего, олигонуклеотид или модифицированный олигонуклеотид, антисмысловый олигонуклеотид или модифицированный антисмысловый олигонуклеотид, кДНК, геномную ДНК, искусственную или естественную хромосому (например, искусственную хромосому дрожжей) или ее часть, РНК, включая мРНК, тРНК, рРНК или рибозим, или пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК); вирус или вирусоподобные частицы; нуклеотид или рибонуклеотид, или его синтетический аналог, который может быть модифицирован или не модифицирован; аминокислота или ее аналог, который может быть модифицирован или немодифицирован; непептидный (например, стероидный) гормон; протеогликан; липид; или углевод. В некоторых аспектах биологически активная молекула включает терапевтическую молекулу (например, антиген), нацеливающий фрагмент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), адъювант, иммуномодулятор или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активная молекула включает макромолекулу (например, белок, антитело, фермент, пептид, ДНК, РНК или любую их комбинацию). В некоторых аспектах биологически активная молекула включает малую молекулу (например, антисмысловый олигомер (ASO), фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РМО), пептид-конъюгированный фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО), киРНК, STING, фармацевтическое лекарственное средство или любое их сочетание). В некоторых аспектах биологически активные молекулы являются экзогенными по отношению к ВВ, т.е. естественно не встречается в ВВ.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое соединение" относится к любой молекуле, которая может лечить и/или предотвращать заболевание или нарушение у субъекта (например, у

человека).

В некоторых аспектах терапевтическая молекула включает антиген.

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает у него иммунный ответ (клеточный или гуморальный). В некоторых аспектах антиген не экспрессируется на молекулах главного комплекса гистосовместимости I и/или II. В других аспектах, хотя антиген в ВВ, например экзосоме, не экспрессируется как комплекс МНС класса I или II, ВВ, например экзосома, все еще может содержать молекулы МНС класса I/II на поверхности ВВ, например экзосомы. Соответственно в определенных аспектах ВВ, например экзосомы, раскрытые в данном документе, не взаимодействуют напрямую с рецепторами (TCR) Т-клеток, чтобы вызвать иммунный ответ против антигена. Аналогичным образом в некоторых аспектах ВВ, например экзосомы, по данному изобретению не переносят антиген непосредственно на поверхность клетки-мишени (например, дендритной клетки) посредством переодевания. Переодевание - это механизм, обычно используемый ВВ, например экзосомами, происходящими из дендритных клеток (DEX), для индукции активации Т-клеток. См. Pitt, J.M. et al., *J. Clin. Invest.*, 126(4):1224-32 (2016). В других аспектах ВВ, например экзосомы, по данному изобретению поглощаются антиген-представляющими клетками и могут экспрессироваться на поверхности антиген-презентирующих клеток в виде комплекса МНС класса I и/или МНС класса II.

В некоторых аспектах терапевтическая молекула включает иммунодепрессант. Используемый в данном документе термин "иммунодепрессант" относится к любому агенту (например, терапевтической молекуле), который замедляет или останавливает иммунный ответ у субъекта. Иммунодепрессанты можно вводить субъекту для предотвращения развития иммунной системы субъекта после трансплантации органа или для лечения заболевания, вызванного сверхактивной иммунной системой. Примеры иммунодепрессантов включают, но не ограничиваются ими, ингибитор кальцинейрина, такой как, помимо прочего, циклоспорин, ISA (TX) 247, такролимус или кальцинейрин, мишень рапамицина, такая как, помимо прочего, сиролимус, эверолимус, FK778 или TAFI-93, блокатор α -цепи интерлейкина-2, такой как, помимо прочего, базиликсимаб и даклизумаб, ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, такой как микофенолятмофетил, ингибитор редуктазы дигидрофолиевой кислоты, такой как, помимо прочего, метотрексат, кортикостероид, такой как, но не ограничиваясь ими, преднизолон и метилпреднизолон, или иммунодепрессивный антиметаболит такой как, помимо прочего, азатиоприн. В некоторых аспектах иммунодепрессант включает антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых аспектах ВВ, раскрытая в данном документе (например, экзосома), может содержать как антиген, так и иммунодепрессант. Не желая быть связанными какой-либо одной теорией, ВВ (например, экзосома), содержащая как антиген, так и иммунодепрессант, можно использовать для индукции толерантности к антигену.

Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает иммуноглобулин, природный или частично, или полностью полученный синтетическим путем, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, гомологичный связывающему домену иммуноглобулина. "Антитело" дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывается и распознает антиген. Подразумевается, что использование термина "антитело" включает цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и далее включают одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает scFv, scFab, scFab-Fc, нанотело или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает агонистическое антитело, блокирующее антитело, нацеливающее антитело, его фрагмент или их комбинацию. В некоторых аспектах агонистическое антитело представляет собой агонист CD40L. В некоторых аспектах блокирующее антитело связывает целевой белок, выбранный из белка программированной клеточной смерти 1 (PD-1), лиганда программированной клеточной смерти 1 (PD-L1), цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 и любой их комбинации.

Используемый в данном документе термин "иммуномодулятор" относится к агенту, который действует на цель (например, клетку-мишень), которая контактирует с внеклеточной везикулой, и регулирует иммунную систему. Неограничивающие примеры иммуномодулятора, который может быть введен в ВВ (например, экзосому) и/или клетку-продуцент, включают агенты, такие как модуляторы ингибиторов контрольных точек, лиганды ингибиторов контрольных точек, цитокины, их производные или любую их комбинацию. Иммуномодулятор может также включать агонист, антагонист, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, такой как кРНК, антисмысловый олигонуклеотид, фосфордиамидатный морфолиновый олигомер (РМО), пептид-конъюгированный фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РМО), микроРНК, днкРНК, мРНК, ДНК или малая молекула.

Используемый в данном документе термин "субъект-млекопитающее" включает всех млекопитающих, включая людей, домашних животных (например, собак, кошек и тому подобное), сельскохозяйствен-

венных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и тому подобное) и лабораторных животных (например, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и тому подобное).

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого требуется диагностика, лечение или терапия, в особенности люди. Способы, описанные в данном 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 "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 около 0,001%, менее около 0,01%, менее около 0,05%, менее около 0,1%, менее около 0,2%, менее около 0,3%, менее около 0,4%, менее около 0,5%, менее около 0,6%, менее около 0,7%, менее около 0,8%, менее около 0,9%, менее около 1%, менее около 2%, менее около 3%, менее около 4%, менее около 5%, менее около 6%, менее около 7%, менее около 8%, менее около 9% или менее около 10% (мас./об.) макромолекул.

Используемый в данном документе термин "макромолекула" означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "обычный экзосомный белок" означает белок, о котором ранее было известно, что ним обогащены ВВ (например, экзосомы), включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним.

Используемый в данном документе термин "линкер" относится к любой молекулярной структуре, которая может конъюгировать пептид или белок с другой молекулой (например, с другим пептидом или белком, небольшой молекулой и т.д.).

Подходящие линкеры хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, углеродные линкеры с прямой или разветвленной цепью, гетероциклические углеродные линкеры или пептидные линкеры (см., например, Chen et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol. 65:10, p. 1357-1369). Линкеры могут быть присоединены к карбоксильным и аминным концевым аминокислотам через их концевые карбоксильные или аминогруппы или через их реактивные группы боковой цепи. Кроме того, в некоторых аспектах линкеры могут быть классифицированы как гибкие или жесткие, и они могут быть расщепляемыми (например, содержат один или более сайтов, расщепляемых протеазой, которые могут располагаться внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности). 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. Используемый в данном документе термин "иммунный ответ" относится к биологическому ответу у позвоночных организмов на чужеродные агенты или аномальные, например, раковые клетки, 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 аспектах иммунный ответ представляет собой "ингибирующий" иммунный ответ. Ингибирующий иммунный ответ - это иммунный ответ, который блокирует или уменьшает действие стимула (например, антигена). В определенных аспектах ингибирующий иммунный ответ включает образование ингибирующих антител против стимула. В некоторых аспектах иммунный ответ представляет собой "стимулирующий" иммунный ответ. Стимулирующий иммунный ответ - это иммунный ответ, который приводит к образованию эффекторных клеток (например, цитотоксических Т-лимфоцитов), которые могут разрушать и устранять целевой антиген (например, опухолевый антиген или вирусы).

"Лечить", "лечение" или "лечащий" в контексте данного описания относится, например, к снижению тяжести заболевания или патологического состояния; сокращение продолжительности течения болезни; улучшение или устранение одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологи-

ческим состоянием; обеспечение благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или патологического состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или патологического состояния, или их симптомов. В одном аспекте термин "лечение" или "лечащий" означает индукцию иммунного ответа у субъекта против антигена.

Термины "предотвращать" или "предотвращение" в контексте данного описания относятся к уменьшению или снижению частоты возникновения или серьезности конкретного исхода. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения.

7.2. Другие соглашения интерпретации.

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

Термин "около" указывает и охватывает указанное значение и диапазон выше и ниже этого значения. В определенных вариантах осуществления термин "около" означает указанное значение ± 10 , ± 5 или $\pm 1\%$. В определенных вариантах осуществления, если применимо, термин "около" означает указанное значение(я) \pm одно стандартное отклонение этого значения(ий).

По всему тексту этого описания термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или более; например, "антитело" означает одно или более антител. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

Кроме того, в данном контексте "и/или" следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В"; "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

7.3. Белки ВВ (например, экзосомы).

Аспект данного изобретения относится к идентификации, использованию и модификации белков гетерологичных экзосомных везикул (ГБВВ), которыми высоко обогащены мембраны ВВ (например, экзосом), полученные из определенных клеток-продуцентов. Как описано в данном документе, разные клетки (например, мезенхимальные стволовые клетки по сравнению с НЕК293) естественным образом экспрессируют разные белки. ВВ (например, экзосомы), продуцируемые клеткой, экспрессируют один или более белков, которые естественным образом экспрессируются в клетке-продуценте. Соответственно ВВ (например, экзосомы), полученные из разных клеток-продуцентов, могут иметь разный белковый состав. ГБВВ могут быть идентифицированы путем анализа высокоочищенных ВВ (например, экзосом) с помощью масс-спектрометрии или других способов, известных в данной области.

ГБВВ по данному изобретению включают различные мембранные белки, такие как трансмембранные белки, цельные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах ВВ (например, экзосом). Они включают различные CD белки, транспортеры, интегрины, лектины и кадгеринины. В частности, белки включают, но не ограничиваются ими, CD13, MME, ENPP1 и NRP1. В некоторых аспектах ГБВВ представляет собой CD13 (или его фрагмент, или вариант). В некоторых аспектах ГБВВ представляет собой MME (или его фрагмент, или вариант). В некоторых аспектах ГБВВ представляет собой ENPP1 (или его фрагмент, или вариант). В некоторых аспектах ГБВВ представляет собой NRP1 (или его фрагмент, или вариант). В некоторых аспектах ГБВВ представляет собой трансмембранный белок типа II. Неограничивающие примеры трансмембранных белков типа II, которые можно использовать в данном изобретении, включают CD252, CD154, CD178, CD70, CD153, CD137, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, TL1, GITRL и их комбинации.

В данном изобретении показано, что белок экзосомных везикул (например, ГБВВ), который экспрессируется только в ВВ, полученных из определенных типов клеток (например, ВВ из МСК), может быть сконструирован для экспрессии в ВВ, полученных из других типов клеток, которые естественным образом не экспрессируют белок экзосомных везикул (например, ВВ из НЕК293). Один или более ГБВВ, идентифицированных в данном документе, могут быть селективно использованы в зависимости от клетки-продуцента, условий производства, способов очистки или предполагаемого применения ВВ (например, экзосом). Например, ГБВВ, которыми обогащена определенная популяция ВВ (например, экзосом), могут быть использованы для очистки конкретной популяции ВВ (например, экзосом). ГБВВ, в большом количестве находящиеся на поверхности определенных ВВ (например, экзосом), с определенным диапазоном размеров, нацеливающей частью, плотностью заряда, полезной нагрузкой и т.д., могут быть идентифицированы и использованы в некоторых вариантах осуществления данного описания. В некоторых вариантах осуществления более одного ГБВВ можно использовать одновременно или последовательно

для получения, очистки и выделения терапевтических ВВ (например, экзосом).

7.4. Поверхностно-сконструированные и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы).

Другой аспект данного изобретения относится к получению и использованию поверхностно-сконструированных ВВ, (например, экзосом). В некоторых аспектах данное изобретение относится к получению и использованию просветно-сконструированных ВВ (например, экзосом). Поверхностно-сконструированные и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) имеют мембрану, модифицированную по своему составу. Например, их мембранные композиции могут быть изменены путем изменения содержания белка, липидов или гликанов в мембране.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированы и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) генерируются химическими и/или физическими способами, такими как индуцированное ПЭГ слияние и/или ультразвуковое слияние.

В других вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированные и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) генерируются 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 аспектах генетически модифицированная клетка-продуцент или потомство генетически модифицированной клетки содержит один или более экзогенных белков, которые в природе не встречаются в клетке. В определенных аспектах один или более экзогенных белков являются фрагментами каркаса, такими как описанные в данном документе гетерологичные белки экзосомных везикул (ГБВВ). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-сконструированные и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы), имеют ГБВВ с более высокой или более низкой плотностью (по сравнению с плотностью экспрессии ГБВВ в клетке, которая естественным образом экспрессирует ГБВВ) или включают вариант или фрагмент ГБВВ.

Например, поверхностно-сконструированные и/или просветно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей ГБВВ или вариант или фрагмент ГБВВ. ВВ (например, экзосомы), включая белки, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать модифицированные композиции мембранных белков.

Различные модификации или фрагменты ГБВВ могут быть использованы для вариантов осуществления данного изобретения. Например, белки, модифицированные с целью повышения аффинности к связывающему агенту, могут быть использованы для создания поверхностно-сконструированных и/или просветно-сконструированных ВВ (например, экзосом), которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать белки, модифицированные для более эффективного нацеливания на ВВ (например, экзосомы) и/или мембраны. Также можно использовать белки, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на мембраны ВВ (например, экзосом). В некоторых аспектах ГБВВ (включая его фрагменты и варианты), которые способны закреплять груз или любые другие экзогенно биологически активные молекулы (например, те, что раскрыты в данном документе), могут быть использованы при конструировании поверхностно-сконструированных и/или просветно-сконструированных ВВ (например, экзосом). В определенных аспектах можно использовать ГБВВ (включая их фрагменты и варианты), которые способны закреплять определенные классы белков. Например, в некоторых аспектах, ГБВВ являются трансмембранными белками типа I, и такие ГБВВ могут использоваться для закрепления внеклеточного домена белка типа I на ВВ (например, экзосомах). В определенных аспектах экспрессия внеклеточного домена белка типа I на ВВ (например, экзосоме) увеличивается при закреплении на трансмембранном ГБВВ типа I по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок прикреплен к другому типу фрагмента каркаса (например, трансмембранному ГБВВ типа I) или по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок сверхэкспрессируется в клетке-продуценте ВВ (например, экзосом), которая естественным образом экспрессирует белок.

В некоторых аспектах, ГБВВ являются трансмембранными белками типа II, и такие ГБВВ могут использоваться для закрепления внеклеточного домена белка типа II на ВВ (например, экзосомах). В определенных аспектах экспрессия внеклеточного домена белка типа II на ВВ (например, экзосоме) увеличивается при закреплении на трансмембранном ГБВВ типа II по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок прикреплен к другому типу фрагмента каркаса (например, трансмембранному ГБВВ типа II) или по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок сверхэкспрессируется в клетке-продуценте ВВ (например, экзосом), которая естественным образом экспрессирует белок.

В некоторых аспектах, ГБВВ являются трансмембранными белками типа III, и такие ГБВВ могут использоваться для закрепления внеклеточных доменов белка типа III на ВВ (например, экзосомах). В определенных аспектах экспрессия внеклеточных доменов белка типа III на ВВ (например, экзосоме) увеличивается при закреплении на трансмембранном ГБВВ типа III по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок прикреплен к другому типу фрагмента каркаса (например, трансмембранному ГБВВ типа III) или по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок сверхэкспрессируется в клетке-продуценте ВВ (например, экзосом), которая естественным образом экспрессирует белок.

В некоторых аспектах, ГБВВ являются трансмембранными белками типа IV, и такие ГБВВ могут использоваться для закрепления внеклеточного домена белка типа IV на ВВ (например, экзосоме). В определенных аспектах экспрессия внеклеточного домена белка типа IV на ВВ (например, экзосоме) увеличивается при закреплении на трансмембранном ГБВВ типа IV по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок прикреплен к другому типу фрагмента каркаса (например, трансмембранному ГБВВ типа IV) или по сравнению с соответствующей экспрессией, когда белок сверхэкспрессируется в клетке-производителе ВВ (например, экзосом), которая естественным образом экспрессирует белок.

Также можно использовать гибридные белки, например, ГБВВ или их фрагменты, гибридизированные с аффинной меткой (например, His-меткой, GST-меткой, глутатион-S-трансферазой, S-пептидом, HA, Myc, FLAG™ (Sigma-Aldrich Co.), MBP, SUMO и белком A) могут быть использованы для очистки или удаления поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом) со связывающим агентом, специфичным для аффинного маркера.

Гибридные белки, обладающие терапевтической активностью, также могут быть использованы для создания поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом). Соответственно в некоторых аспектах описанные в данном документе ВВ (например, экзосомы) были сконструированы или модифицированы для экспрессии слитого белка и могут использоваться для доставки одной или более (например, двух, трех, четырех, пяти или более) терапевтических молекул к цели. Например, гибридный белок может содержать ГБВВ (например, CD13, MME, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и терапевтическое соединение (например, пептид). В некоторых аспектах слитый белок содержит CD13 (или его фрагмент или вариант) и терапевтическое соединение. В некоторых аспектах слитый белок содержит MME (или его фрагмент или вариант) и терапевтическое соединение. В некоторых аспектах слитый белок содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант) и терапевтическое соединение. В некоторых аспектах слитый белок содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант) и терапевтическое соединение. В некоторых аспектах терапевтическое соединение сливается непосредственно с ГБВВ. В некоторых аспектах терапевтическое соединение прикреплено к ГБВВ через линкер (например, через те, что раскрыты в данном документе).

В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, 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 крайней мере около 30, по крайней мере около 35, по крайней мере около 40, по крайней мере около 45, по крайней мере около 50, по крайней мере около 55, по крайней мере около 60, по крайней мере около 65, по крайней мере около 70, по крайней 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. В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В некоторых аспектах пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, природные или не встречающиеся в природе пептиды), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которой она не связана или генетически не слита в природе. Например, в некоторых аспектах пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутации, такие как добавление, замена или делеция).

Линкеры могут быть чувствительными к расщеплению ("расщепляемый линкер"), тем самым облегчая высвобождение экзогенной биологически активной молекулы (например, нацеливающего фрагмента, терапевтической молекулы, адъюванта или иммуномодулятора).

В некоторых аспектах линкер представляет собой "линкер, чувствительный к восстанавливающим условиям". В некоторых аспектах линкер, чувствительный к восстанавливающим условиям, содержит дисульфидную связь. В некоторых аспектах линкер представляет собой "кислотолабильный линкер". В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит гидразон. Подходящие кислотолабильные линкеры также включают, например, цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах линкер включает нерасщепляемый линкер.

В некоторых аспектах терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из природного пептида, рекомбинантного пептида, синтетического пептида или линкера с терапевтическим соединением. Терапевтические соединения могут представлять собой нуклеотиды, аминокислоты, липиды, углеводы или малые молекулы. Терапевтический пептид может представлять собой антитело, фермент, лиганд, рецептор, антимикробный пептид или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления терапевтический пептид представляет собой белок, связывающий нуклеиновую кислоту. Связывающий нуклеиновую кислоту белок может представлять собой Dicer, белок Argonaute, TRBP или белок оболочки бактериофага MS2. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий нуклеиновую кислоту, дополнительно содержит одну или несколько молекул РНК или ДНК. Одна или более РНК могут представлять собой киРНК, микроРНК, антисмысловый олигонуклеотид, фосфордиамидатный морфолиновый

олигомер (РМО), пептид-конъюгированный фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО), направляющую РНК, линкРНК, мРНК, антисмысловую РНК, дсРНК или их комбинации.

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

В некоторых аспектах терапевтическая молекула, которая может быть прикреплена к ГБВВ и экспрессирована на ВВ (например, экзосоме), содержит антиген. В некоторых аспектах антиген включает опухолевый антиген. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают: альфа-фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), муцин 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцин 16 (MUC16), тирозиназу, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), опухолевый белок p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой гибели (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой гибели (PD-L2), NY-ESO-1, ССПА, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелин, VEGFR, альфа-фолатный рецептор, CE7R, IL-3, раково-тестикулярный антиген (СТА), MART-1 gp100, TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд, Brachyury (предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME)) или их комбинации. В дополнительных аспектах антиген может включать неоантиген. Используемый в данном документе термин "неоантиген" относится к антигенам, кодируемым опухолеспецифическими мутированными генами. В некоторых аспектах антиген получают из бактерии, вируса, грибка, простейших или любой их комбинации. В некоторых аспектах антиген получают из онкогенного вируса. В дополнительных аспектах антиген получают из группы, включающей: гаммагерпесвирус человека 4 (вирус Эпштейна-Барра), вирус гриппа А, вирус гриппа В, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, ВИЧ-1, ВИЧ-2, коронавирус (например, MERS-CoV и SARS CoV), филловир (например, Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, виды *Plasmodia* (например, *vivax* и *falciparum*), вирус чикунгунья, вирус папилломы человека (HPV), гепатит В, гепатит С, вирус герпеса человека 8, вирус простого герпеса 2 (HSV2), *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Actinobacter* sp., коагулазонегативные стафилококки (CoNS), *Mycoplasma* sp. или их комбинации.

В некоторых аспектах терапевтическая молекула включает иммунодепрессант. Соответственно в определенных аспектах ВВ, описанные в данном документе, включает ГБВВ и иммунодепрессант.

Неограничивающие примеры других подходящих терапевтических молекул включают фармакологически активные лекарственные средства и генетически активные молекулы, включая противоопухолевые агенты, противовоспалительные агенты, гормоны или антагонисты гормонов, модификаторы ионных каналов и нейроактивные агенты. Примеры подходящих полезных нагрузок терапевтических агентов включают те, которые описаны в "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman and Gilman, McGraw-Hill, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, (1996), девятое издание, в разделах: Drugs Acting at Synaptic and Neuroeffector Junctional Sites; Drugs Acting on the Central Nervous System; Autacoids; Drug Therapy of Inflammation; Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Cardiovascular Drugs; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Drugs Affecting Uterine Motility; Chemotherapy of Parasitic Infections; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Used for Immunosuppression; Drugs Acting on Blood-Forming organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins, Dermatology; and Toxicology, все включены в данный документ посредством ссылки. Подходящие полезные нагрузки дополнительно включают токсины, а также боевые биологические и химические агенты, например, см. Somani, S.M. (ed.), *Chemical Warfare Agents*, Academic Press, New York (1992)).

В некоторых аспектах терапевтическая молекула включает аутоантиген.

Используемый в данном документе термин "аутоантиген" относится к антигену, который экспрессируется клеткой или тканью-хозяином. В нормальном здоровом состоянии такие антигены распознаются организмом как собственные и не вызывают иммунного ответа. Однако при определенных болезненных состояниях собственная иммунная система организма может распознавать аутоантигены как чужеродные и вызывать иммунный ответ против них, что приводит к развитию аутоиммунитета. В определенных аспектах ВВ, например экзосомы, по данному изобретению могут содержать аутоантиген (т.е. собственный белок (зародышевый), на который были индуцированы ответы Т-клеток, что привело к развитию аутоиммунитета). Такие ВВ, например экзосомы, можно использовать для нацеливания на аутореактивные Т-клетки и подавления их активности. Неограничивающие примеры аутоантигенов (включая ассоциированное заболевание или нарушение) включают: белки бета-клеток (диабет I типа), гликопротеин олигодендроцитов миелина (MOG, рассеянный склероз), синовиальные белки (ревматоидный артрит) или их комбинации.

В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает scFv, scFab, scFab-Fc, нанотело или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает агонистическое антитело, блокирующее антитело, нацеливающее антитело, его

фрагмент или их комбинацию. В некоторых аспектах агонистическое антитело представляет собой агонист CD40L. В некоторых аспектах блокирующее антитело связывает целевой белок, выбранный из белка программированной клеточной смерти 1 (PD-1), лиганда программированной клеточной смерти 1 (PD-L1), цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 и любой их комбинации. В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, содержит антитело к IL12 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD40L или его антигенсвязывающий фрагмент.

Гибридные белки могут быть нацелены на поверхность ВВ, (например, экзосом) и обеспечивать терапевтическую активность для ВВ (например, экзосом). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок не содержит IGSF8 или его фрагмента или модификации.

В некоторых вариантах осуществления используются гибридные белки, имеющие нацеливающий фрагмент. Например, гибридные белки могут содержать ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах гибридный белок содержит CD13 и нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах гибридный белок содержит ММЕ и нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах гибридный белок содержит ENPP1 и нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах гибридный белок содержит NRP1 и нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть использован для нацеливания ВВ (например, экзосомы) на конкретный орган, ткань или клетку для лечения с использованием ВВ (например, экзосомы). В определенных аспектах нацеливающий фрагмент связывается с маркером (или молекулами-мишенями), экспрессируемым на клетке или популяции клеток. В определенных аспектах маркер экспрессируется на множестве типов клеток, например, на всех антигенпрезентирующих клетках (например, дендритных клетках, макрофагах и В-лимфоцитах). В некоторых аспектах маркер экспрессируется только в конкретной популяции клеток (например, дендритных клетках). Неограничивающие примеры маркеров, которые экспрессируются в конкретной популяции клеток (например, дендритных клетках), включают белок А члена 9 семейства лектиновых доменов С-типа (CLEC9A), молекулы межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрин (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), Dectin-2, Bst-2 (CD317) или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и далее включают одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты также включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию.

В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанная в данном документе, может содержать ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и одну или более экзогенных биологически активных молекул. В определенных аспектах экзогенная биологически активная молекула, которая может экспрессироваться в ВВ (например, экзосоме), является адьювантом. Соответственно в некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит CD13 (или его фрагмент или вариант) и адьювант. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит ММЕ (или его фрагмент или вариант) и адьювант. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант) и адьювант. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант) и адьювант. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы), описанные в данном документе, содержат два, три, четыре, пять или более различных адьювантов. Используемый в данном документе термин "адьювант" относится к любому веществу, которое усиливает терапевтический эффект груза (например, усиливает иммунный ответ на антиген).

В некоторых аспектах адьювант, применимый в данном описании, индуцирует активацию цитозольного образраспознающего рецептора. Неограничивающие примеры цитозольного образраспознающего рецептора включают: стимулятор генов интерферона (STING), ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-1), белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), инфламасомы, содержащие нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен и повторы, богатые лейцином и пириновый домен (NLRP) или их комбинации. В определенных аспектах адьювант является агонистом STING. Стимулятор генов интерферона (STING) - это цитозольный сенсор циклических динуклеотидов, который обычно вырабатывается бактериями. После активации он приводит к выработке интерферонов типа I и запускает иммунный ответ. В определенных аспектах агонист STING включает агонист STING циклического динуклеотида или агонист STING нециклического динуклеотида.

В некоторых аспектах адьювант включает агонист толл-подобного рецептора (TLR). Неограничивающие примеры агонистов TLR включают: агонист TLR2 (например, липотейхоевую кислоту, атипичный LPS, MALP-2 и MALP-404, OspA, порин, LcrV, липоманнан, GPI-якорь, лизофосфатидилсерин, ли-

пофосфогликан (LPG), гликофосфатидилинозитол (GPI), зимозан, hsp60, гликопротеин gH/gL, гемагглютинин), агонист TLR3 (например, двухцепочечную РНК, например, поли (I:C)), агонист TLR4 (например, липополисахариды (LPS), липотейхоевую кислоту, Р-дефенсин 2, фибронектин EDA, HMGB1, снапин, тенасцин С), агонист TLR5 (например, флагеллин), агонист TLR6, агонист TLR7/8 (например, одноцепочечную РНК, CpG-A, Поли G10, Поли G3, резиквимод), агонист TLR9 (например, неметилованную ДНК CpG) и их комбинации. Неограничивающие примеры агонистов TLR можно найти в WO 2008115319 A2, US 20130202707 A1, US 20120219615 A1, US 20100029585 A1, WO 2009030996 A1, WO 2009088401 A2 и WO 2011044246 A1, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

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

В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанная в данном документе, может содержать ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и одну или более экзогенных биологически активных молекул, где одна или более экзогенных биологических молекул содержат один или более (например, два, три, четыре, пять или более) иммуномодуляторов. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит CD13 (или его фрагмент или вариант) и иммуномодулятор. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит ММЕ (или его фрагмент или вариант) и иммуномодулятор. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант) и иммуномодулятор. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант) и иммуномодулятор. В определенных аспектах один или более иммуномодуляторов экспрессируются в комбинации с другими экзогенными биологически активными молекулами, описанными в данном документе (например, нацеливающим фрагментом, терапевтической молекулой и/или адьювантом).

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор партнера по связыванию отрицательного регулятора контрольной точки. В определенных аспектах ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки включает цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), белок 1 программируемой гибели клеток (PD-1), ген 3, активируемый лимфоцитами (LAG-3), Т-клеточный белок, содержащий иммуноглобулин-и муцин-домены 3 (TIM-3), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменный иммуноглобулиновый супрессор активации Т-клеток (VISTA), рецептор аденозина A2a (A2aR), иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KTR), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), CD20, CD39, CD73 или любая их комбинация.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4). В определенных аспектах ингибитор CTLA-4 представляет собой моноклональное антитело к CTLA-4 ("антитело к CTLA-4"). В определенных аспектах ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CTLA-4. В определенных аспектах фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CTLA-4. В определенных аспектах ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело к CTLA-4. В некоторых аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой ипидимумаб. В других аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой тремелидумаб.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором белка программируемой гибели клеток 1 (PD-1). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором лиганда 1 белка программируемой гибели (PD-L1). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором лиганда 2 белка программируемой гибели (PD-L2). В определенных аспектах ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой моноклональное антитело к PD-1 ("антитело к PD-1"), PD-L1 ("антитело к PD-L1") или PD-L2 ("антитело к PD-L2"). В некоторых аспектах ингибитор представляет собой фрагмент антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2. В определенных аспектах фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных аспектах ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых аспектах антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб. В некоторых аспектах антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. В некоторых аспектах антитело к PD-1 представляет собой пидилизумаб. В некоторых аспектах антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб. В других аспектах антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором гена 3, активируемого лимфоцитами (LAG3). В определенных аспектах ингибитор LAG3 представляет собой моноклональное антитело к LAG3 ("антитело к LAG3"). В некоторых аспектах ингибитор представляет собой фрагмент антитела к LAG3, например, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd. В определенных аспектах ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело к LAG3.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором Т-клеточного белка, содержащего иммуноглобулин-и муцин-домены 3 (TIM-3). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором аттенуатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA). В некоторых аспектах иммуномодулятор является инги-

битором иммунорецептора Т-клеток с доменами Ig и ITIM (TIGIT). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором рецептора аденозина A2a, (A2aR). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором индолламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В некоторых аспектах иммуномодулятор является ингибитором CD20, CD39 или CD73. В некоторых аспектах иммуномодулятор включает активатор для положительной костимулирующей молекулы или активатор для партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы. В определенных аспектах положительная костимулирующая молекула включает член суперсемейства рецепторов TNF (например, CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептор Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептор TWEAK, TACI, рецептор BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR). В некоторых аспектах активатором позитивной костимулирующей молекулы является член суперсемейства TNF (например, TNF α , TNF-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганд 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганд GITR и EDA-2).

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором члена 4 суперсемейства рецепторов TNF (OX40). В определенных аспектах активатор OX40 представляет собой агонистическое антитело к OX40. В определенных аспектах активатор OX40 представляет собой лиганд OX40 (OX40L).

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором CD27. В определенных аспектах активатор CD27 представляет собой агонистическое антитело к CD27. В других аспектах активатором CD27 является лиганд CD27 (CD27L). В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором CD40. В определенных аспектах активатор CD40 представляет собой агонистическое антитело к CD40. В некоторых аспектах активатором CD40 является лиганд CD40 (CD40L). В определенных аспектах CD40L представляет собой мономерный CD40L. В других аспектах CD40L представляет собой тримерный CD40L.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором глюкокортикоид-индуцированного TNFR-связанного белка (GITR). В определенных аспектах активатор GITR представляет собой агонистическое антитело к GITR. В других аспектах активатор GITR представляет собой природный лиганд GITR.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором 4-1BB. В конкретных аспектах активатор 4-1BB представляет собой агонистическое антитело к 4-1BB. В определенных аспектах активатор 4-1BB представляет собой природный лиганд 4-1BB.

В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой рецептор Fas (Fas). В таких аспектах рецептор Fas отображается на поверхности BB, например экзосомы.

В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой лиганд Fas (FasL). В определенных аспектах лиганд Fas отображается на поверхности BB, например экзосомы.

В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой антитело к Fas или антитело к FasL.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором костимуляторной молекулы суперсемейства CD28. В определенных аспектах костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28. В определенных аспектах иммуномодулятор является ICOSL, CD80 или CD86.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS). В определенных аспектах активатор ICOS представляет собой агонистическое антитело к ICOS. В других аспектах активатор ICOS представляет собой лиганд ICOS (ICOSL).

В некоторых аспектах иммуномодулятор является активатором CD28. В некоторых аспектах активатор CD28 представляет собой агонистическое антитело к CD28.

В других аспектах активатор CD28 представляет собой природный лиганд CD28. В определенных аспектах лиганд CD28 представляет собой CD80.

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает цитокин или партнер по связыванию цитокина. В определенных аспектах цитокин включает IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 или IFN- γ . В некоторых аспектах иммуномодулятор включает FLT-3 (CD135).

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает белок, который поддерживает внутриклеточные взаимодействия, необходимые для ответов зародышевого центра. В определенных аспектах такой белок включает член семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAM) или SLAM-ассоциированный белок (SAP). В некоторых аспектах члены семейства SLAM включают SLAM, CD48, CD229 (Ly9), Ly108, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME, CD2F-10 или их комбинации.

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает Т-клеточный рецептор (TCR) или его производное. В определенных аспектах иммуномодулятор представляет собой α -цепь TCR или ее производное. В других аспектах иммуномодулятор представляет собой β -цепь TCR или ее производное. В дополнительных аспектах иммуномодулятор представляет собой корецептор Т-клетки или его производное.

В некоторых аспектах иммуномодулятор содержит рецептор химерного антигена (CAR) или его производное. В определенных аспектах CAR связывается с одной или более терапевтическими молекулами, описанными в данном документе (например, опухолевым антигеном, например, альфа-

фетопротеином (AFP), карциноэмбриональным антигеном (CEA), эпителиальным опухолевым антигеном (ETA), муцином 1 (MUC1), Тп-MUC1, муцином 16 (MUC16), тирозиназой, меланома-ассоциированным антигеном (MAGE), опухолевым белком p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лигандом 1 белка программируемой гибели (PD-L1), лигандом 2 белка программируемой гибели (PD-L2), NY-ESO-1, ССПА, TAG-72, HER2, GD2, сMET, EGFR, мезотелин, VEGFR, альфа-фолатным рецептором, CE7R, IL-3, раково-тестикулярным рецептором, MART-1 gp100 и TNF-связанным апоптоз-индуцирующим лигандом).

В определенных аспектах иммуномодулятор является активатором CD28. В определенных аспектах активатор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CD28. В определенных аспектах фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', and F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CD28. В определенных аспектах активатор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело к CD28.

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает ингибитор NF-κB.

Неограничивающие примеры ингибиторов NF-κB, которые можно использовать в данном описании, включают: ингибиторы комплекса ИКК (например, TRCA-1, ингибитор активации NF-κB VI (BOT-64), BMS 345541, амлексанокс, SC-514 (GK 01140), IMD 0354, ИКК-16), ингибитор деградации ИκB (например, BAY 11-7082, MG-115, MG-132, лактацистин, эпоксомидин, партенолид, карфилзомиб, MLN-4924 (певонедистат)), ингибитор ядерной транслокации NF-κB (например, JSH-23, ролипрам), ингибитор ацетилирования p65 (например, галловая кислота, анакардовая кислота), ингибитор связывания NF-κB-ДНК (например, GYY4137, p-XSC, CV3988, простагландин E2 (PGE2)), ингибитор трансактивации NF-κB (например, LY 294002, вортманнин, мезаламин) или их комбинации. См. также Gupta, S.C., et al., *Biochim Biophys Acta* 1799:775-787 (2010), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки В дополнительных аспектах иммуномодулятор включает ингибитор COX-2, ингибитор mTOR (например, рапамицин и производные), простагландины, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), ингибитор лейкотриеновых рецепторов или их комбинации. В некоторых аспектах иммуномодулятор является агонистом. В определенных аспектах представляет собой эндогенный агонист, такой как гормон или нейромедиатор. В других аспектах агонист представляет собой экзогенный агонист, такой как лекарственное средство. В некоторых аспектах агонист представляет собой физический агонист, который может вызывать агонистический ответ без связывания с рецептором. В некоторых аспектах агонист представляет собой суперагонист, который может вызывать более максимальный ответ, чем эндогенный агонист. В определенных аспектах агонист является полным агонистом с полной эффективностью в отношении рецептора. В других аспектах агонист представляет собой частичный агонист, обладающий только частичной эффективностью в отношении рецептора по сравнению с полным агонистом. В некоторых аспектах агонист представляет собой обратный агонист, который может ингибировать конститутивную активность рецептора. В некоторых аспектах агонист является коагонистом, который работает с другими коагонистами влияя на рецептор. В определенных аспектах агонист представляет собой необратимый агонист, который постоянно связывается с рецептором посредством образования ковалентной связи. В определенных аспектах агонист является селективным агонистом рецептора определенного типа.

В некоторых аспектах иммуномодулятор является антагонистом. В конкретных аспектах антагонист представляет собой конкурентный антагонист, который обратимо связывается с рецептором в том же сайте связывания, что и эндогенный лиганд или агонист, без активации рецептора. Конкурентный антагонист может влиять на количество агониста, необходимое для достижения максимального ответа. В других аспектах антагонист представляет собой неконкурентный антагонист, который связывается с активным сайтом рецептора или аллостерическим сайтом рецептора. Неконкурентный антагонист может снизить величину максимального ответа, который может быть достигнут любым количеством агониста. В дополнительных аспектах антагонист представляет собой неконкурентный антагонист, который требует активации рецептора агонистом перед его связыванием с отдельным аллостерическим сайтом связывания.

В некоторых аспектах иммуномодулятор включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Иммуномодулятор может быть полноразмерным белком или его фрагментом. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают из природных источников или частично, или полностью синтетическим путем. В некоторых аспектах антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из этих аспектов моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных аспектах моноклональное антитело представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых других аспектах антитело представляет собой поликлональное антитело. В определенных аспектах антигенсвязывающий фрагмент выбран из фрагментов Fab, Fab', и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd. В определенных аспектах антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент scFv или (scFv)₂. В некоторых других аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой NANOBODY® (однодоменное антитело). В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело. В различных аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий

фрагмент является гуманизированным. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент является химерным. В некоторых из этих аспектов химерное антитело имеет не принадлежащие человеку домены V-области и человеческие домены С-области. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является человеческим, таким как мышинный или других животных.

В определенных аспектах иммуномодулятор представляет собой полинуклеотид. В некоторых из этих аспектов полинуклеотид включает, но не ограничивается ими, мРНК, микроРНК, киРНК, антисмысловой олигонуклеотид, фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РМО), пептид-конъюгированный фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО), антисмысловую РНК, кшРНК, днкРНК и дсДНК. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой РНК (например, мРНК, киРНК, миРНК, антисмысловую РНК, кшРНК или днкРНК). В некоторых из этих аспектов, когда полинуклеотид представляет собой мРНК, он может быть транслирован в желаемый полипептид. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой молекулу микроРНК (микроРНК) или пре-миРНК. В некоторых из этих аспектов микроРНК доставляется в цитоплазму клетки-мишени, так что молекула микроРНК может подавлять экспрессию нативной мРНК в клетке-мишени. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой короткую интерферирующую РНК (киРНК) или короткую шпилечную РНК (кшРНК), способную вмешиваться в экспрессию онкогена или других дисрегулирующих полипептидов. В некоторых из этих аспектов киРНК доставляется в цитоплазму клетки-мишени, так что молекула киРНК может подавлять экспрессию нативной мРНК в клетке-мишени. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой антисмысловую РНК, комплементарную мРНК. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой длинную некодирующую РНК (нкРНК), способную регулировать экспрессию генов и модулировать заболевания. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой ДНК, которую можно транскрибировать в РНК. В некоторых из этих аспектов транскрибируемая РНК может быть транслирована в желаемый полипептид.

В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, поверхностно-сконструированные экзосомы), описанные в данном документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ (например, поверхностно-сконструированными экзосомами), известными в данной области. Например, ВВ (например, поверхностно-сконструированные экзосомы), полученные с использованием ГБВВ, представленных в данном документе, содержат модифицированные белки, которыми более высоко обогащены поверхности, чем ВВ (например, экзосомы) в предшествующем уровне техники, например, те, которые получены с использованием обычных белков экзосом. В некоторых аспектах уровень экспрессии модифицированных белков повышен (т.е. обогащен) по меньшей мере около на 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около на 20%, по меньшей мере около на 30%, по меньшей мере около на 40%, при по меньшей мере около на 50%, по меньшей мере около на 60%, по меньшей мере около на 70%, по меньшей мере около на 80%, по меньшей мере около на 90%, по меньшей мере около на 100%, по меньшей мере около на 150%, по меньшей мере около на 200% или по меньшей мере около на 300% или более по сравнению с экспрессией соответствующего белка с использованием обычных белков экзосом.

Более того, в некоторых аспектах ВВ (например, поверхностно-сконструированные экзосомы) по данному изобретению могут иметь большую, более специфическую или более контролируемую биологическую активность по сравнению с ВВ (например, поверхностно-сконструированными экзосомами), известными в данной области. Например, поверхностно-сконструированная ВВ (например, экзосома), содержащая терапевтическую или биологически релевантную экзогенную последовательность, слитую с белком ГБВВ или его фрагментом, описанным в данном документе (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагментом), больше требуемых технических характеристик, чем слияние с каркасами, известными в данной области. Белки каркаса, известные в данной области, включают молекулы тетраспанина (например, CD63, CD81, CD9 и другие), лизосом-ассоциированный мембранный белок 2 (LAMP2 и LAMP2В), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), якорные белки GPI, лактадгерин и их фрагменты, а также пептиды, которые обладают сродством к любому из этих белков или их фрагментов. Ранее избыточная экспрессия экзогенных белков основывалась на стохастическом или случайном расположении экзогенных белков на ВВ (например, экзосоме) для выработки поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом). Это привело к низкой и непредсказуемой плотности экзогенных белков на ВВ (например, экзосомах). Таким образом, белки ГБВВ и их фрагменты, описанные в данном документе, обеспечивают важные достижения в новых композициях ВВ (например, экзосом) и способах их получения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированная ВВ (например, экзосома) содержит гибридный белок, содержащий экзогенную последовательность (например, кодирующую экзогенную биологически активную молекулу, например, антиген, адъювант, нацеливающий фрагмент и/или иммуномодулятор) и идентифицированный ГБВВ в данном документе имеет более высокую плотность слитого белка, чем аналогично сконструированные ВВ (например, экзосомы), содержащие экзогенную последовательность, конъюгированную с обычным белком ВВ (например, экзосомы), известным в данной области (например, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорным белком, лактадерином LAMP2 и LAMP2В, их фрагментом или связанным с ними пептидом). В некоторых вариантах осуществ-

сом) с плотностью, которая в около 2, около 4, около 8, около 16, около 32, около 64, около 100, около 200, около 400, около 800, около 1000 раз или более превышает плотность гибридных белков на поверхностях других ВВ (например, экзосом), аналогично модифицированных с использованием обычного белка ВВ (например, экзосомы) (например, молекулы тетраспанина, такой как CD63). Слитые белки, предложенные в данном документе, могут содержать ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и дополнительный пептид (например, экзогенные биологически активные молекулы, описанные в данном документе, такие как антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). Дополнительный пептид может быть присоединен либо к N-концу, либо к С-концу ГБВВ или его фрагмента или варианта. Дополнительный пептид может быть расположен внутри (на люминальной стороне) или снаружи ВВ (например, экзосомы), прикрепленным к ГБВВ.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки, предложенные в данном документе, могут содержать ГБВВ (например, CD13, ММЕ, ENPP1 или NRP1, или их фрагмент или вариант) и два дополнительных пептида (например, экзогенные биологически активные молекулы, описанные в данном документе, такие как антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). Например, в некоторых аспектах слитый белок содержит CD13 (или его фрагмент или вариант) и два дополнительных пептида. В некоторых аспектах слитый белок содержит ММЕ (или его фрагмент или вариант) и два дополнительных пептида. В некоторых аспектах слитый белок содержит ENPP1 (или его фрагмент или вариант) и два дополнительных пептида. В некоторых аспектах слитый белок содержит NRP1 (или его фрагмент или вариант) и два дополнительных пептида. Оба из двух дополнительных пептидов могут быть присоединены либо к N-концу, либо к С-концу ГБВВ, или его фрагменту или варианту. В некоторых вариантах осуществления один из двух дополнительных пептидов присоединен к N-концу, а другой из двух дополнительных пептидов присоединен к С-концу ГБВВ, или его фрагменту или варианту. Дополнительные пептиды могут быть расположены внутри (на люминальной стороне) или снаружи ВВ (например, экзосомы), прикрепленными к ГБВВ, или и того, и другого.

7.5. Клетка-производитель для производства поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом).

ВВ (например, экзосомы) по данному изобретению могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro*, или взятой из жидкости организма субъекта. Когда ВВ (например, экзосомы) получают из культуры клеток *in vitro*, для данного изобретения можно использовать различные клетки-производители, например клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или мезенхимальные стволовые клетки (МСК), клетки НТ-1080, клетки МВ-231, клетки Раджи, клетки PER.C6 и клетки CAP. В некоторых аспектах агонистические клетки-производители представляет собой клетки НЕК293. В некоторых аспектах производитель представляет собой МСК.

Клетка-производитель может быть генетически модифицирована для включения одной или более экзогенных последовательностей для получения поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом). В некоторых аспектах одна или более экзогенных последовательностей кодируют описанный в данном документе ГБВВ. В некоторых аспектах одна или более экзогенных последовательностей кодируют экзогенную биологически активную молекулу, описанную в данном документе (например, антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). В некоторых аспектах одна или более экзогенных последовательностей кодируют как ГБВВ, так и экзогенную биологически активную молекулу, описанную в данном документе. Генетически модифицированная клетка-производитель может содержать экзогенную последовательность, введенную путем временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть введена в клетку-производитель в виде плазмиды. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-производителя, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых вариантах осуществления создается стабильная клеточная линия для получения поверхностно-сконструированных ВВ (например, экзосом).

В некоторых аспектах описанная в данном документе генетически модифицированная клетка-производитель экспрессирует эндогенный уровень ГБВВ. В некоторых аспектах экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-производителя, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей ГБВВ. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-производитель 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.

Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую ГБВВ или вариант или фрагмент белка ВВ (например, экзосомы). Может быть введена дополнительная копия последовательности, кодирующей ГБВВ, для получения поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы), имеющей более высокую плотность ГБВВ. Экзогенная последовательность, кодирующая вариант или фрагмент ГБВВ, может быть введена для получения поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы), содержащей модификацию или фрагмент ГБВВ. Экзогенная последовательность, кодирующая аффинный маркер, может быть введена для получения поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы), содержащей гибридный белок, содержащий аффинный маркер, присоединен-

ный к ГБВВ. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах экзогенная последовательность, кодирующая экзогенную биологически активную молекулу (например, антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор), может быть введена для получения поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосомы), содержащего слитый белок, содержащий экзогенную биологически активную молекулу, присоединенную (например, непосредственно или через линкер) к ГБВВ.

В некоторых вариантах осуществления поверхностно-сконструированная ВВ (например, экзосома) имеет более высокую плотность ГБВВ, чем нативные ВВ (например, экзосомы), выделенные из клеток того же или аналогичного типа клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления ГБВВ присутствует на поверхностно-сконструированной поверхности ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-, около 4-, около 8-, около 16-, около 32-, около 64-, около 100-, около 200-, около 400-, около 800-, около 1000 раз или более превышает плотность, чем на нативной ВВ (например, экзосоме). В некоторых вариантах осуществления ГБВВ присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем на нативной ВВ (например, экзосоме). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок, содержащий ГБВВ присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем на немодифицированный ГБВВ на нативной ВВ (например, экзосоме). В некоторых вариантах осуществления фрагмент или вариант ГБВВ присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем немодифицированный ГБВВ на нативной ВВ (например, экзосоме). В конкретных вариантах осуществления CD13, фрагмент или вариант CD13 или его модификация присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем немодифицированный CD13 на нативной ВВ (например, экзосоме). В конкретных вариантах осуществления ММЕ, фрагмент или вариант ММЕ, или его модификация присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем плотность немодифицированного ММЕ на нативной ВВ (например, экзосоме). В конкретных вариантах осуществления ENPP1, фрагмент или вариант ENPP1, или его модификация присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем плотность немодифицированного ENPP1 на нативной ВВ (например, экзосоме). В конкретных вариантах осуществления NRPI, фрагмент или вариант NRPI, или его модификация присутствует на поверхностно-сконструированной ВВ (например, экзосоме) с плотностью, которая в около 2-4, около 4-8, около 8-16, около 16-32, около 32-64, около 64-100, около 100-200, около 200-400, около 400-800, около 800-1000 раз или более превышает плотность, чем плотность немодифицированного NRPI на нативной ВВ (например, экзосоме).

В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент дополнительно модифицируется для включения дополнительной экзогенной последовательности. Например, дополнительная экзогенная последовательность может быть введена для модуляции экспрессии эндогенного гена или для получения ВВ (например, экзосомы), включающей определенный полипептид в качестве полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует ГБВВ, или вариант или фрагмент ГБВВ, а другая кодирует полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент может быть дополнительно модифицирована для включения дополнительной экзогенной последовательности, придающей дополнительные функциональные возможности ВВ (например, экзосомам), например, специфические возможности нацеливания, функции доставки, ферментативные функции, увеличенное или уменьшенное время полужизни *in vivo* и т.п. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, одна из которых кодирует ГБВВ, или вариант или фрагмент белка ВВ (например, экзосомы), а другая кодирует белок, придающий дополнительные функции ВВ (например, экзосомы). В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицируется для включения двух экзогенных последовательностей, каждая из двух экзогенных последовательностей кодирует гибридный белок на поверхности ВВ (например, экзосомы). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-сконструированная ВВ (например, экзосома) клетки-продуцента имеет более высокую плотность ГБВВ по сравнению с нативными ВВ (например, экзосомами), выделенными из немодифицированной клетки того же или подобного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) содержат ГБВВ с плотностью, которая в около 2, около 4, около 8, около 16, около 32, около 64, около 100, около 200, около

400, около 800, около 1000 раз или более превышает плотность, чем на нативной ВВ (например, экзосомы), выделенной из немодифицированной клетки того же или подобного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-производитель дополнительно модифицируется для включения одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более дополнительных экзогенных последовательностей. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах экзогенные последовательности кодируют один или более ГБВВ, описанных в данном документе. В некоторых аспектах экзогенные последовательности кодируют одну или более экзогенных биологически активных молекул, описанных в данном документе (например, антиген, нацеливающий фрагмент, адъювант и/или иммуномодулятор). В некоторых аспектах экзогенные последовательности кодируют как ГБВВ, так и экзогенную биологически активную молекулу, описанную в данном документе.

Более конкретно, поверхностно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей один или более ГБВВ или его вариант, включая, но не ограничиваясь ими, CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1. Любой из одного или более ГБВВ, описанных в данном документе, может быть экспрессирован в клетке-производителе из плазмиды, экзогенной последовательности, встроенной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая мессенджер-РНК (мРНК).

В некоторых вариантах осуществления один или более ГБВВ экспрессируются в клетке, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей ее полноразмерную эндогенную форму. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок CD13 последовательности SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ММЕ последовательности SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок ENPP1 последовательности SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления такая экзогенная последовательность кодирует белок NRP1 последовательности SEQ ID NO: 50

Поверхностно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент одного или более ГБВВ, включая, помимо прочего, CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент CD13. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент ММЕ. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент ENPP1. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагмент NRP1. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент ГБВВ, в котором отсутствует по меньшей мере около 5, около 10, около 50, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700 или около 800 аминокислот с N-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент ГБВВ, в котором отсутствует по меньшей мере около 5, около 10, около 50, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700 или около 800 аминокислот с C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент ГБВВ, в котором отсутствует по меньшей мере около 5, около 10, около 50, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700 или около 800 аминокислот как с N-конца, так и с C-конца нативного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент ГБВВ, в котором отсутствует один или более функциональных или структурных доменов нативного белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ГБВВ слит с одним или более гетерологичными белками (например, экзогенными биологически активными молекулами, например, антигеном, нацеливающим фрагментом, адъювантом и/или иммуномодулятором). В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков гибридизированы с N-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков гибридизированы с C-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и C-концом фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков представляют собой белки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков представляют собой белки человека.

Поверхностно-сконструированные ВВ (например, экзосомы) могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей фрагменты CD13. В некоторых вариантах осуществления фрагменты CD13 лишены одного или более функциональных или структурных доменов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты CD13 слиты с одним или более гетерологичными белками (например, экзогенными биологически активными молекулами, например, антигеном, нацеливающим фрагментом, адъювантом и/или иммуномодулятором). Один или более гетерологичных белков могут быть слиты с N-концом фрагментов CD13. Один или более гетерологичных белков могут быть слиты с C-концом фрагментов CD13. В некоторых вариантах осуществления один или более гетерологичных белков гибридизированы с N-концом и с C-концом фрагментов CD13. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является белком человека. В некоторых вариантах осуществления гетерологич-

идентичен полноразмерному ГБВВ или его фрагменту, например, по меньшей мере около на 99% идентичен SEQ ID NO: 47-50. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере около на 99,9% идентичен полноразмерному ГБВВ или его фрагменту, например, по меньшей мере около на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 47-50. 7.6. Аффинная очистка

Некоторые варианты осуществления данного изобретения относятся к выделению, очистке и субфракционированию ВВ (например, экзосом) с использованием специфического связывающего взаимодействия между белком, в большом количестве находящемся на мембране ВВ (например, экзосомы), и иммобилизованным связывающим агентом. Такие способы обычно включают в себя стадии

- (1) нанесения или загрузки образца, содержащего ВВ (например, экзосомы);
- (2) необязательно вымывания несвязанных компонентов образца с использованием соответствующих буферов, которые поддерживают взаимодействие связывания между целевыми белками ВВ (например, экзосом) и связывающими агентами; и
- (3) элюирования (диссоциации и восстановления) ВВ (например, экзосом) из иммобилизованных связывающих агентов путем изменения условий буфера таким образом, что взаимодействие связывания больше не происходит.

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

Целевой белок, используемый для этого процесса выделения, очистки, субфракционирования или удаления, может представлять собой эндогенный белок, вырабатываемый из генома клетки-производителя, белок, введенный в клетку-производитель генетической модификацией, или белок, модифицированный химическим, физическим или другим биологическим способом. В некоторых случаях белок представляет собой немутантный белок или мутантный белок, например, вариант или фрагмент эндогенного белка. В некоторых случаях белок является гибридным белком (например, таким, как описано в данном документе).

Для вариантов осуществления данного изобретения могут быть использованы различные связывающие агенты, имеющие аффинность к целевому белку. Например, белки, пептиды и малые молекулы со специфической аффинностью к целевому белку могут быть использованы в качестве связывающего агента. В некоторых вариантах связывающие агенты получают из органических или неорганических источников. Примеры связывающих агентов из органических источников включают сывороточные белки, лектины или антитела. Примеры связывающих агентов из неорганических источников включают борные кислоты, хелаты металлов и триазиновые красители. Связывающие агенты могут быть химически иммобилизованы или связаны с твердой подложкой, так что ВВ (например, экзосомы), имеющие специфическую аффинность со связывающим агентом, оказываются связанными. Могут быть использованы различные формы твердой подложки, например пористая агарозная гранула, микротитровальный планшет, магнитная гранула или мембрана. В некоторых вариантах твердая подложка образует хроматографическую колонку и может быть использован для аффинной хроматографии ВВ (например, экзосом).

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

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

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

В некоторых случаях выделение, очистка, субфракционирование и удаление ВВ (например, экзосом) осуществляются с использованием связывающего агента, прикрепленного к планшетам для микро-

титрования, магнитным гранулам или мембранам.

В этих случаях образец добавляют к связывающему агенту, прикрепленному к твердой подложке, после чего следуют стадии смешивания, отделения твердой подложки, удаления жидкой фазы, промывания, удаления промывочного буфера, добавления буфера для элюирования и удаления элюата.

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

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

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

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

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

7.6.1. Подготовка образцов.

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

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

7.6.2. Связывание.

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

Подобные подходы могут быть использованы для улучшения чистоты и выхода, а также для помощи в обогащении, истощении или выделении субпопуляций ВВ (например, экзосом). Эти свойства, наряду с максимизацией нагрузки и применением более строгих условий элюирования, могут быть использованы для дальнейшего повышения концентрации ВВ (например, экзосом). 7.6.2.1. Элюирование

Элюирование ВВ (например, экзосом) может быть достигнуто путем изменения концентрации соли, pH и/или полярности с помощью органического модификатора, этиленгликоля, пропиленгликоля или мочевины.

Селективное элюирование ВВ (например, экзосом) может быть достигнуто путем увеличения концентрации одновалентной катионной галогенидной соли (например, хлорида натрия, хлорида калия, бромида натрия, хлорида лития, йодида натрия, бромида калия, бромида лития, фторида натрия, фторида калия, фторида лития, йодида лития, ацетата натрия, ацетата калия, ацетата лития и йодида калия), двухвалентной или трехвалентной соли (например, хлорида кальция, хлорида магния, сульфата кальция,

сульфата натрия, сульфата магния, трихлорида хрома, сульфата хрома, цитрат натрия, хлорида железа (III), хлорида иттрия (III), фосфата калия, сульфата калия, фосфата натрия, хлорида железа, цитрата кальция, фосфата магния и хлорида железа) или их комбинации в буфере для элюирования с использованием увеличения градиента (ступенчатого или линейного) одновалентной катионной галогенидной соли (например, хлорида натрия, хлорида калия, бромида натрия, хлорида лития, йодида натрия, бромида калия, бромида лития, фторида натрия, фторида калия, фторида лития, йодида лития, ацетата натрия, ацетата калия, ацетата лития и йодида калия), двухвалентной или трехвалентной соли (например, хлорида кальция, хлорида магния, сульфата кальция, сульфата натрия, сульфата магния, трихлорида хрома, сульфата хрома, цитрата натрия, хлорида железа (III), хлорида иттрия (III), фосфата калия, сульфата калия, фосфата натрия, хлорида железа, цитрата кальция, фосфата магния и хлорида железа), или их комбинации при фиксированном pH. Существенной чистоты ВВ (например, экзосом) можно достичь, пропуская примеси сквозь колонку во время фазы загрузки колонки, элюируя примеси во время селективных промывок наполнителем и избирательно элюируя продукт во время элюирования, оставляя дополнительные примеси связанными с колонкой. Абсорбция, измеренная по колоночным элюатам, может указывать на чистоту ВВ (например, экзосом), полученных данными способами.

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

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

Элюирующие буферы с различными свойствами могут применяться в виде непрерывного потока во время сбора множества элюированных фракций. Элюированные фракции могут быть собраны во время изократического элюирования или градиентного элюирования. Как только по меньшей мере одна элюированная фракция собрана, состав элюированной фракции может быть проанализирован. Например, в каждой элюированной фракции может быть измерена концентрация ВВ (например, экзосом), белка клетки-хозяина, загрязняющего белка, ДНК, углеводов или липидов. Также могут быть измерены другие свойства ВВ (например, экзосом) в каждой элюированной фракции. Свойства включают в себя средний размер, среднюю плотность заряда и другие физиологические свойства, связанные с биораспределением, клеточным поглощением, периодом полураспада, фармакодинамикой, активностью, дозировкой, иммунным ответом, эффективностью нагрузки, стабильностью или реакционной способностью в отношении других соединений.

7.6.2.2. Промывание.

Необязательно чистота ВВ (например, экзосом) может быть дополнительно улучшена путем промывания образцов перед элюированием. В некоторых вариантах наполнитель может представлять собой промыточный буфер. Вспомогательное вещество может представлять собой раствор, имеющий определенные диапазоны pH, содержание соли, органических растворителей, малых молекул, детергентов, цвиттерионов, аминокислот, полимеров и любую комбинацию вышеперечисленного.

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

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

7.6.3. Другие способы улучшения результата.

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

7.7. Применения.

7.7.1. Очистка ВВ (например, экзосом).

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

7.7.2. Субфракционирование ВВ (например, экзосом).

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

Например, варианты осуществления данного изобретения предоставляют способы очистки популяции ВВ (например, экзосом) с меньшим или большим размером. Размер ВВ (например, экзосом) может быть определен способами, доступными в данной области. Например, размер может быть измерен с помощью анализа отслеживания наночастиц, многоугольного рассеяния света, одноугольного рассеяния света, эксклюзионной хроматографии, аналитического ультрацентрифугирования, поточного фракционирования в поле, лазерной дифракции, анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор или динамического рассеяния света.

Варианты осуществления данного изобретения дополнительно относятся к способам субфракционирования ВВ (например, экзосом) на основе их плотности заряда. Плотность заряда ВВ (например, экзосом) может быть определена путем потенциометрического титрования, анионного обмена, катионного обмена, изоэлектрического фокусирования, дзета-потенциала, капиллярного электрофореза, электрофореза в капиллярной зоне, гель-электрофореза или любой их комбинацией. Варианты осуществления данного изобретения также относятся к субфракционированию ВВ (например, экзосом) на основе других физиологических свойств, таких как биораспределение, клеточное поглощение, период полураспада, фармакодинамика, активность, дозирование, иммунный ответ, эффективность нагрузки, стабильность или реакционная способность по отношению к другим соединениям. Способ позволяет выделить популяцию ВВ (например, экзосом), подходящую для конкретного применения.

7.7.3. Применения.

В некоторых аспектах данное изобретение предлагает способы предотвращения и/или лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение ВВ (например, экзосом), описанных в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или расстройство, которое можно лечить с помощью данных способов, включает рак, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, глазные заболевания, болезнь трансплантат против хозяина (GvHD), аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, респираторные заболевания, аллергические заболевания, дегенеративные заболевания, инфекционные заболевания, фиброзные заболевания или любое их сочетание. В определенных аспектах заболевание или расстройство, которое можно лечить, связано с хроническим воспалением. В некоторых аспектах лечение носит профилактический характер. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) по данному изобретению используются для индукции иммунного ответа. В некоторых аспектах ВВ по данному изобретению используются для вакцинации субъекта.

В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой онкологическое заболевание. В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой болезнь "трансплантат против хозяина" (GvHD). В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой инфекционное заболевание. Как описано в данном документе, клетки (например, клетки-продуценты) можно модифицировать для экспрессии белка (например, ГБВВ), который в природе не экспрессируется в клетках (т.е. гетерологичный белок). В некоторых аспектах такая модификация приводит к получению ВВ (например, экзосом) из модифицированной клетки для экспрессии гетерологичного белка. Соответственно в некоторых аспектах изобретение предлагает способ экспрессии не встречающегося в природе белка (т.е. гетерологичного белка) в ВВ (например, экзосоме), полученной из клетки. В некото-

рых аспектах способ включает трансфекцию клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный белок (например, описанный в данном документе ГБВВ) (или его фрагмент или вариант), и выделение ВВ (например, экзосомы), полученной из клетки, при этом ВВ (например, экзосома) содержит по меньшей мере один гетерологичный белок, и этот гетерологичный белок не экспрессируется в природе в ВВ, полученной из клетки.

В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), полученная из описанной выше клетки (т.е. трансфицированная нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный белок), содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 гетерологичных белков. В определенных аспектах гетерологичные белки отличаются (например, экзосома сконструирована для экспрессии белков CD13 и ММЕ, при этом экзосомы получены из клетки, которая в природе не экспрессирует белки CD13 и ММЕ). В некоторых аспектах гетерологичные белки являются одинаковыми, так что общее количество гетерологичных белков, экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), больше, чем в ВВ, полученной из клетки, которая естественным образом экспрессирует гетерологичные белки. Для количественной оценки количества или уровня гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых на ВВ (например, экзосоме), можно использовать любой подходящий способ, известный в данной области. В некоторых аспектах количество белков (например, ГБВВ), экспрессируемых на ВВ (например, экзосоме), может быть оценено путем измерения количества спектральных совпадений пептидов в данном образце, содержащем ВВ (например, экзосомы), с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). См. примеры 1 и 3. Используемый в данном документе термин "спектральные совпадения пептидов" (ССП) относится к системе, которая присваивает числовое значение паре пептид-спектр (P, S), выражающей вероятность того, что фрагментация пептида с последовательностью P регистрируется в экспериментальном масс-спектре S. Frank, A.M., J. Proteome Res., 8(5):2241-2252 (май 2009 г.). СПП коррелируют с содержанием белка в данном образце. В некоторых аспектах уровень (или количество) гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), полученных из клетки, описанной в данном документе (например, трансфицированной нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный белок), составляет по меньшей мере около 10 спектральных совпадений пептидов (ССП), по меньшей мере около 20 СПП, по меньшей мере около 30 СПП, по меньшей мере около 40 СПП, по меньшей мере около 50 СПП, по меньшей мере около 60 СПП, по меньшей мере около 70 СПП, по меньшей мере около 80 СПП, по меньшей мере около 90 СПП, по меньшей мере около 100 СПП, по меньшей мере около 110 СПП, по меньшей мере около 120 СПП, по меньшей мере около 130 СПП, по меньшей мере около 140 СПП, по меньшей мере около 150 СПП, по меньшей мере около 160 СПП, по меньшей мере около 170 СПП, по меньшей мере около 180 СПП, по меньшей мере около 190 СПП, по меньшей мере около 200 СПП, по меньшей мере около 210 СПП, по меньшей мере около 220 СПП, по меньшей мере около 230 СПП, по меньшей мере около 240 СПП, по меньшей мере около 250 СПП, по меньшей мере около 260 СПП, по меньшей мере около 270 СПП, по меньшей мере около 280 СПП, по меньшей мере около 290 СПП, по меньшей мере около 300 СПП, по меньшей мере около 350 СПП, по меньшей мере около 400 СПП, по меньшей мере около 450 СПП, по меньшей мере около 500 PMS, по меньшей мере около 550 СПП, по меньшей мере около 600 СПП, по меньшей мере около 650 СПП, по меньшей мере около 700 СПП, по меньшей мере около 750 СПП, по меньшей мере около 800 СПП, по меньшей мере около 850 СПП, по меньшей мере около 900 СПП, по меньшей мере около 950 СПП или по меньшей мере около 1000 или более СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС.

В определенных аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), равен или превышает около 125 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В определенных аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), равен или превышает около 150 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), равен или превышает около 200 СПП. В определенных аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), равен или превышает около 700 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ, например, ММЕ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), составляет около 177 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ, например, CD13), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), составляет около 742 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС.

В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), составляет от около 20 СПП до около 80 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), составляет от около 80 СПП до около 200 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС. В некоторых аспектах уровень гетерологичных белков (например, ГБВВ), экспрессируемых в ВВ (например, экзосоме), составляет от около 150 СПП до около 750 СПП при измерении с использованием ЖХ-МС/МС.

7.8. Характеристика ВВ (например, экзосом).

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают стадию характеристики ВВ (например, экзосом), содержащихся в каждой собранной фракции. В некоторых вариантах осуществления содержимое ВВ (например, экзосом) может быть извлечено для изучения и характеристики.

В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосомы) выделяются и характеризуются определенными показателями, включая, но не ограничиваясь ими, размер, форму, морфологию или молекулярные композиции, такие как нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты и липиды.

7.8.1. Измерение содержания ВВ (например, экзосом).

ВВ (например, экзосомы) могут содержать белки, пептиды, РНК, ДНК и липиды. Общая РНК может быть экстрагирована с использованием экстракции кислота-фенол: хлороформ. Затем РНК может быть очищена с использованием стекловолоконного фильтра в условиях, которые восстанавливают малую РНК, содержащую общую РНК, или которые отделяют малые виды РНК длиной менее 200 нуклеотидов от более длинных видов РНК, таких как мРНК. Поскольку РНК элюируется в небольшом объеме, в некоторых аспектах, для выделения РНК может не потребоваться стадия осаждения спиртом. Композиции ВВ (например, экзосом) могут оцениваться способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, транскриптомику, секвенирование, протеомику, масс-спектрометрию или ВЭЖХ.

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

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

Микроматрицы могут быть созданы с помощью техник, известных в данной области техники. Например, олигонуклеотидные зонды соответствующей длины, например, 40 нуклеотидов, 5'-аминомодифицированы в положении С6 и напечатаны на активированных слайдах с использованием коммерчески доступных систем микрочипов, например, GeneMachine Omni Grid.TM 100 Microarrayer и Amersham CodeLink.TM Меченый кДНК-олигомер, соответствующий РНК-мишени, получают путем обратной транскрипции РНК-мишени с помощью меченого праймера. После синтеза первой цепи гибриды РНК/ДНК денатурируют для разрушения матриц РНК. Полученные таким образом меченые кДНК-мишени затем гибридизуют с микроматричным чипом в условиях гибридизации, например, 6 раз. SSPE/30% формамид при 25°C в течение 18 ч с последующей промывкой в 0,75 раза. ТНТ при 37°C в течение 40 мин. В положениях на матрице, где ДНК иммобилизованного зонда распознает комплементарную кДНК-мишень в образце, происходит гибридизация. Помеченная кДНК-мишень отмечает точное положение места связывания в массиве, что позволяет автоматическое обнаружение и количественное определение. Выходные данные состоят из списка событий гибридизации, указывающих на относительное содержание специфических последовательностей кДНК и, следовательно, относительное количество соответствующих комплементарных РНК в препарате ВВ (например, экзосомы). Согласно одному варианту осуществления меченый кДНК-олигомер представляет собой меченую биотином кДНК полученную из меченого биотином праймера. Затем микроматрица подвергается процедуре прямого обнаружения биотинсодержащих транскриптов с использованием, например, конъюгата стрептавидин-Alexa647, и сканируется с использованием традиционных методов сканирования. Интенсивность изображения каждого пятна на матрице пропорциональна содержанию соответствующей РНК в ВВ (например, экзосоме).

Работа по извлечению данных завершается с использованием биоинформатики, включая сканиро-

вание чипов, сбор сигналов, обработку изображений, нормализацию, статистическую обработку и сравнение данных, а также анализ путей.

Таким образом, микрочип может профилировать сотни и тысячи полинуклеотидов одновременно с высокой пропускной способностью. Анализ профиля экспрессии мРНК с помощью микрочипов позволил получить ценные данные для изучения экспрессии генов в фундаментальных исследованиях. И эта методика получила дальнейшее применение на практике в фармацевтической промышленности и в клинической диагностике. С увеличением количества данных о микроРНК и с накоплением доказательств важности микроРНК в регуляции генов, микроматрица становится полезным методом исследований микроРНК с высокой пропускной способностью. Анализ уровней микроРНК с использованием полинуклеотидных зондов также может быть выполнен в различных физических форматах. Например, для облегчения обработки большого количества тестируемых образцов могут быть использованы микротитровальные планшеты или автоматизация.

7.8.2. Измерение размера ВВ (например, экзосом).

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают измерение размера ВВ (например, экзосом) и/или популяций ВВ (например, экзосом), включенных в очищенные фракции. В некоторых вариантах осуществления размер ВВ (например, экзосомы) определяется как наибольший измеримый размер. Как правило, самый наибольший общий размер ВВ (например, экзосомы) также называют ее диаметром.

Размер ВВ (например, экзосом) может быть измерен с использованием различных способов, известных в данной области техники, например, анализа отслеживания наночастиц, многоугольного рассеяния света, одноугольного рассеяния света, эксклюзионной хроматографии, аналитического ультрацентрифугирования, поточного фракционирования в поле, лазерной дифракции, анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор или динамического рассеяния света. Размер ВВ (например, экзосом) может быть измерен с использованием динамического рассеяния света (DLS) и/или многоугольного рассеяния света (MALS). Методы использования DLS и/или MALS для измерения размера ВВ (например, экзосом) известны специалистам в данной области и включают анализ отслеживания наночастиц (NTA, например, с использованием устройства отслеживания наночастиц Malvern Nanosight NS300). В конкретном варианте осуществления размер ВВ (например, экзосомы) определяют с использованием Malvern NanoSight NS300. В некоторых вариантах осуществления ВВ (например, экзосомы), описанные в данном документе, имеют наибольший размер, измеренный с помощью NTA, приблизительно 20-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления ВВ (например, экзосомы), описанные в данном документе, наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 20-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 20-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NT A, около 20-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью NTA, около 40-1000 нм (например, с использованием Malvern Nanosight NS300).

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

ренный с помощью TRPS, около 20-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 20-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции ВВ (например, экзосом), описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% ВВ (например, экзосом) имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS, около 40-1000 нм (например, с использованием iZON qNano Gold).

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

7.8.3. Измерение плотности заряда ВВ (например, экзосом).

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

7.8.4. Измерение плотности белков ВВ (например, экзосом) или ГБВВ.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают изме-

рение плотности белков ВВ (например, экзосом) или ГБВВ на поверхности ВВ (например, экзосом). Плотность на поверхности может быть рассчитана или представлена как масса на единицу площади, количество белков на площадь, количество молекул или интенсивность молекулярного сигнала на ВВ (например, экзосоме), молярное количество белка и т.д. Плотность на поверхности может быть экспериментально измерена способами, известными в данной области, например, с использованием биослойной интерферометрии (BLI), FACS, вестерн-блоттинга, флуоресцентного обнаружения (например, слитого с GFP белка), нанопоточной цитометрии, ИФА, альфа-ИФА и/или денситометрии путем измерения полос на белковом геле.

7.9. Фармацевтические композиции.

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 вспомогательные вещества или носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество внеклеточных везикул (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005)). Фармацевтические композиции, как правило, разрабатываются стерильными и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и ВВ, например экзосому, описанные в данном документе. В определенных аспектах ВВ, например экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например экзосому, вводится до введения дополнительных терапевтических агентов. В других аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например экзосому, вводится после введения дополнительных терапевтических агентов. В дополнительных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например экзосому, вводится одновременно с дополнительными терапевтическими агентами.

7.10. Наборы.

В данном документе также предложены наборы, содержащие одну или более экзосом, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающая 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 использованию. В некоторых аспектах наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе.

7.11. Примеры.

Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и использовать данное изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы рассматривают как свое изобретение, они также не предназначены для демонстрации того, что приведенные ниже эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части означают массовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление представляет атмосферное давление или давление, близкое к атмосферному. Могут употребляться стандартные сокращения, например,

- п. о. - пара(ы) оснований;
- т.п. н. - тысяча(и) пар нуклеотидов;
- пл - пиколитр(ы);
- с - секунда(ы);
- мин - минута(ы);
- ч - час(ы);
- ак - аминокислота(ы);
- нт - нуклеотид(ы); и т.п.

В практике по данному описанию будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick, N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 21th edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and

Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992).

7.11.1. Пример 1. Идентификация белков ВВ (например, экзосом).

7.11.1.1. Сбор ВВ (например, экзосом).

ВВ (например, экзосомы) собирали из супернатанта суспензионных культур высокой плотности МСК-клеток костного мозга через 4 дня. Супернатант фильтровали и концентрировали фильтрацией в тангенциальном потоке с использованием мембран MWCO 1000 кДа (PXC01MC50). Концентрированный супернатант клеточной культуры осаждали ультрацентрифугированием с использованием 100 мл пробирок Quick-Seal Ultra-Clear (345778). Неочищенные пеллеты ВВ (например, экзосомы) дополнительно фракционировали в градиенте плотности OPTIPREP™ (60% йодиксанола мас./об.) ультрацентрифугированием.

Осажденный материал ресуспендировали в 1 мл ФСБ и 3 мл OPTIPREP™, доводя конечную концентрацию йодиксанола до 45%. Для градиента OPTIPREP™ готовили 4-х уровневый стерильный градиент с 4 мл 45% йодиксанола, содержащего ресуспендированный материал, 3 мл 30% йодиксанола, 2 мл 22,5% йодиксанола, 2 мл 17,5% йодиксанола и 1 мл ФСБ в 12 мл пробирке Ultra-Clear (344059) для ротора SW 41 Ti. Градиент OPTIPREP™ ультрацентрифугировали при 150000 g в течение 16 ч при 4°C для отделения фракции ВВ (например, экзосом). Слой ВВ (например, экзосом) затем осторожно собирали из верхних ~3 мл из пробирки.

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

7.11.1.2. Подготовка проб для анализа ЖХ-МС/МС.

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

Осаждение белка проводили добавлением 1250 мкл этанола при -20°C. Для повышения эффективности образцы энергично встряхивали в течение приблизительно 10 мин и затем инкубировали при -20°C в течение 60 мин. После инкубации образцы обрабатывали ультразвуком на водяной бане в течение 5 мин. Осажденный материал осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 15000 g при 4°C. Надосадочную жидкость сливали и осажденный материал тщательно высушивали с использованием газобразного азота. Гранулы ресуспендировали в 30,0 мкл буфера для расщепления (30 mM Трис, 1,0 M GdmCl, 100 mM ЭДТА, 50 mM ТСЕР, pH 8,5), что также ослабляло дисульфидные связи. Свободные остатки цистеина алкилировали путем добавления 5,0 мкл раствора для алкилирования (375 mM йодацетамида, 50 mM Трис, pH 8,5) и инкубирования полученного раствора при комнатной температуре в темноте в течение по меньшей мере 30 мин.

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

7.11.1.3. Анализ ЖХ-МС/МС.

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

инъекциями для минимизации переноса.

Масс-анализ проводили с помощью масс-спектрометра Q Exactive Basic (Thermo Fisher Scientific). Масс-спектры ионов-предшественников были измерены в диапазоне m/z 400-1600 Да с разрешением 70000. 10 наиболее интенсивных ионов-предшественников были отобраны и фрагментированы в ячейке HCD с использованием энергии столкновения 27, и спектры MS/MS были измерены в диапазоне m/z 200-2000 Да с разрешением 35000. Для фрагментирования были выбраны ионы с состояниями заряда от 2 до 4 и время динамического исключения было установлено равным 30 с. Список исключений, содержащий 14 распространенных полисилоксанов, был использован для минимизации ошибочной идентификации известных загрязняющих веществ.

7.11.1.4. Обработка данных.

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

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

Чтобы определить идентичность новых белков специфических для ВВ (например, экзосом), сравнивали общие спектральные совпадения пептидов (CCP) для белков, обнаруженных в верхней фракции ВВ (например, экзосом) градиента Optiprep™, по сравнению с белками в нижней фракции. Результаты показали, что существует ряд ассоциированных с мембранами белков, которыми более высоко обогащены фракции ВВ (например, экзосом). Белки ВВ (например, экзосомы) включали CD13, MME, ENPP1 и NRP1.

7.11.2. Пример 2. Проверка экспрессии поверхностного белка.

Чтобы подтвердить, что специфичные для ВВ (например, экзосом) белки, идентифицированные в масс-спектрометрических исследованиях, находились на поверхности ВВ (например, экзосом) в большом количестве, проводили белковый блоттинг в общем лизате клеток и очищенных популяциях ВВ (например, экзосом) из МСК костного мозга. Картина общего белка существенно различалась между общим клеточным лизатом (слева) и экзосомным лизатом ВВ (например, экзосомы). В частности, в лизате ВВ (например, экзосом) была сильная полоса, которая отсутствовала в общем клеточном лизате. Вестерн-блоттинг для CD13 выявил, что сильная полоса соответствует CD13, что указывает на то, что ВВ (например, экзосомы), полученные из МСК костного мозга, сильно обогащены CD13, и этот белок может быть визуально обнаружен в общем лизате ВВ (например, экзосомы).

7.11.3. Пример 3. Специфическая экспрессия белков экзосом.

Для определения специфичности белков экзосом были проведены масс-спектрометрические исследования и вестерн-блоттинг (как описано в примере 1) для идентификации потенциальных белков каркаса, экспрессируемых на очищенных экзосомах (см., например, фиг. 1), и для анализа экспрессии нескольких новых мембранных белков, ассоциированных с экзосомами, на экзосомах, полученных из различных типов клеток. В частности, были проанализированы экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и клеток НЕК293. Фракции ВВ (например, экзосомы) из этих типов клеток очищали в градиентах Optiprep™ и анализировали вестерн-блоттингом. Чтобы определить идентичность различных белков экзосом, было проведено сравнение общих спектральных совпадений пептидов (CCP) для белков, обнаруженных в экзосомах, полученных из МСК, с белками, обнаруженными в экзосомах из клеток НЕК293. Как показано на фиг. 1, при анализе образцов экзосом из МСК костного мозга было обнаружено, что фракции экзосом сильно обогащены белком CD13. Однако при анализе образцов из клеток НЕК293 CD13 не был обнаружен ни во фракции экзосом, ни в каких-либо других фракциях. Аналогичные результаты наблюдались для MME (см. фиг. 1).

Аналогичным образом анализировали каждый из новых поверхностных маркерных белков. Данные показывают, что экзосомы из определенных типов клеток (например, МСК) обогащены определенными экзосомными белками (например, CD13 и MME), но эти белки отсутствуют в экзосомах, полученных из разных типов клеток (например, НЕК293).

7.11.4. Пример 4. Сверхэкспрессия CD13 из клеток-продуцентов.

Результаты в примере 3 продемонстрировали, что CD13 и другие белки экзосом (например, MME) не всегда присутствуют на ВВ (например, экзосомах), полученных из различных типов клеток. Напри-

мер, экзосомы, полученные из МСК костного мозга, сильно обогащены CD13, но этот белок отсутствовал на экзосомах, полученных из клеток HEK293.

Чтобы определить, можно ли использовать CD13 в качестве каркасного белка экзосом на клетке-продуценте, которая в естественных условиях не продуцирует экзосомы с CD13, клетки HEK293 стабильно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей полноразмерный CD13, слитый с меткой FLAG (плазида "CD13-FLAG"). Экзосомы очищали из клеток HEK293SF дикого типа и клеток HEK293SF, трансфицированных плазмидой CD13-FLAG. В качестве контроля экзосомы также очищали из клеток HEK293SF, сконструированных для сверхэкспрессии каркасного белка PTGFRN. Результаты ДСН-ПААГ анализа, представленные на фиг. 2А показывают, что CD13-FLAG успешно сверхэкспрессируется в клетках HEK293SF, трансфицированных плазмидой CD13-FLAG. Сверхэкспрессия CD13 приводила к аналогичному обогащению экзосом, полученных из HEK293, по сравнению с PTGFRN. И, как показано на фиг. 2В (правый график), экзосомы, полученные из клеток HEK293SF, трансфицированных плазмидой CD13-FLAG, также экспрессировали высокие уровни CD13 на своей поверхности. CD13, экспрессируемые на ВВ, были биологически активными с уровнями активности, сравнимыми с активностью рекомбинантного белка CD13 (см. фиг. 3А и 3В). Эти результаты демонстрируют, что клетка-продуцент (например, HEK293SF), которая в природе не экспрессирует экзосомный белок (например, CD13), может быть модифицирована для получения экзосом, которые сверхэкспрессируют экзосомный белок (например, CD13). Эти результаты показывают, что экзосомные белки, такие как CD13, могут быть использованы для создания сконструированных ВВ (например, экзосом), содержащих гетерологичный экзосомный белок, т.е. CD13. Кроме того, ВВ (например, экзосомы), очищенные из модифицированных клеток, описанных в данном документе (например, клеток HEK293SF, трансфицированных плазмидой CD13-FLAG), проявляют нативную каталитическую активность гетерологичного белка экзосомы (например, CD13).

Аналогичные процедуры могут быть выполнены для CD13 и других ГБВВ, описанных в данном документе, с использованием различных типов клеток, например, CD13 может быть введен в клетки CHO (где он не экспрессируется в нативном виде); ММЕ может быть введен в клетки CHO и клетки HEK (где он не экспрессируется в нативном виде); ENPP1 может быть введен в клетки CHO (где он не экспрессируется в нативном виде); и NRP1 может быть введен в клетки CHO и клетки HEK (где он не экспрессируется в нативном виде).

7.11.5. Пример 5. Создание модифицированных экзосомных белков.

Как описано в данном документе, экзосомные белки могут быть модифицированы (например, усечены или присоединены к другому фрагменту) для обеспечения ВВ (например, экзосомы), экспрессирующей модифицированные экзосомные белки с определенными свойствами (например, повышенным нацеливанием на определенные типы клеток). Полинуклеотид, кодирующий модифицированный экзосомный белок, получают с использованием полинуклеотида, кодирующего целый экзосомный белок или усеченный экзосомный белок. Конкретный усеченный экзосомный белок отбирается путем скрининга различных усеченных экзосомных белков и выбора усеченного белка, обладающего оптимальными способностями для включения в экзосомные мембраны и взаимодействия со связывающим агентом. Нацеливание усеченных белков на экзосомные мембраны проверяют с помощью нано-проточной цитометрии.

Полинуклеотид, кодирующий белок модифицированных экзосом, создают путем добавления полинуклеотида, кодирующего аффинную метку (глутатион-S-трансферазу, S-пептид, метку FLAG, GFP и т.д.) к полинуклеотиду, кодирующей полной или усеченный белок экзосомы (например, CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1). Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок. Полинуклеотид дополнительно модифицируется для улучшения нацеливания на экзосомные мембраны и/или их аффинности к связывающему агенту.

Другой тип полинуклеотида, кодирующего модифицированный экзосомный белок, получают добавлением полинуклеотида, кодирующего терапевтический пептид (например, антитело, фермент, лиганд, рецептор, антимикробный пептид, вариант или его фрагмент) к полинуклеотиду, кодирующему целый или усеченный экзосомный белок (например, CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1) Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок, презентированный на поверхности экзосомы. Гибридный белок сохраняет терапевтическую активность терапевтического пептида.

Другой тип полинуклеотида, кодирующего модифицированный экзосомный белок, получают добавлением полинуклеотида, кодирующего нацеливающий фрагмент (например, нацеливающий фрагмент, специфичный для конкретного органа, ткани или клетки) к полинуклеотиду, кодирующему целый или усеченный экзосомный белок (например, CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1). Модифицированный полинуклеотид экспрессирует гибридный белок, презентированный на поверхности экзосомы. Гибридный белок позволяет нацеливать экзосому на конкретный орган, ткань или клетку. Локализация модифицированных экзосомных белков поверхности экзосом также проверяется с помощью нано-проточной цитометрии.

7.11.6. Пример 6. Создание поверхностно-сконструированных экзосом.

Клетки-продуценты, вырабатывающие поверхностно-сконструированные экзосомы, получают путем введения экзогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы или вариант или фрагмент белка экзосомы. Плазида, кодирующая экзосомный белок, временно трансфицируется для индуцирова-

ния высокого уровня экспрессии экзосомного белка на поверхности экзосомы. Плазида, кодирующая модифицированный экзосомный белок, временно трансфицируется для получения экзосом, имеющих модифицированный экзосомный белок на поверхности.

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

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

7.11.7. Пример 7. Выделение, очистка и субфракционирование экзосом методом аффинной очистки.

Связывающие агенты для аффинной очистки экзосом разрабатываются путем биопэннинга/направленной эволюции при элюировании в мягких условиях. Связывающий агент прикрепляется к твердой подложке (например, пористой агарозной грануле) и вносится в обычную хроматографическую систему (например, GE AKTA). Образец, содержащий экзосомы, наносит на колонку для аффинной очистки.

7.11.8. Пример 8. Анализ различных фрагментов каркаса для нацеливания на экзосомы.

В дополнение к примеру 6, описанному выше, способность белков CD13 и MME проверяли на их способность нацеливать белки на поверхность экзосом, полученных из клеток HEK293. Вкратце плазмиды, экспрессирующие полноразмерный CD13, слитый с зеленым флуоресцентным белком (GFP), или полноразмерный MME, слитый с GFP, стабильно трансфицировали в клетки HEK293. Для сравнения также были сконструированные клетки HEK293, сконструированные для сверхэкспрессии PTGFRN, слитого с GFP.

Как показано на фиг. 4А, клетки HEK293, трансфицированные плазмидами CD13-GFP или MME-GFP, экспрессировали конкретный представляющий интерес экзосомный белок. Общая экспрессия была подобна экспрессии PTGFRN-GFP, наблюдаемой в клетках HEK293, сконструированных для сверхэкспрессии PTGFRN. И, как показано на фиг. 4В, слитые белки CD13-GFP и MME-GFP были правильно свернуты и экспрессировались в ВВ, продуцируемых соответствующими клетками-производителями HEK293.

В совокупности приведенные выше результаты демонстрируют, что определенные экзосомные белки (например, описанные в данном документе гетерологичные белки экзосомных везикул, например, CD13 и MME) могут быть экзогенно введены в клетку-производитель, которая в природе не экспрессирует гетерологичный белок. Результаты дополнительно демонстрируют, что ВВ (например, экзосомы), полученные из таких модифицированных клеток-производителей, могут экспрессировать гетерологичные экзосомные белки, которые можно использовать для закрепления различных молекул (например, антигена, нацеливающего фрагмента, адъювантов и/или иммуномодуляторов) на ВВ (например, экзосомы).

8. Включение посредством ссылки

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

9. Эквиваленты

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

Неофициальный перечень последовательностей**SEQ ID 47**

CD13

>sp|P15144|AMPN_HUMAN Аминопептидаза N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANPEP

PE=1 SV=4

MAKGFYISKSLGILGILLGVAAVCTIIALSVVYSQEKKNANSSPVASTTPSASATTNPA
 SATTLDQSKAWNRYRLPNTLKPDSYRVTLRPLYLPNDRGLYVFKGSSTVRFCTCKEATDV
 I
 IIHKKLNYTLSQGHRVVLRGVGGSQPPDIDKTELVEPTEYLVVHLKGSLVKDSQYEMD
 S
 EFEGELADDLAGFYRSEYMEGNVRKVVATTQMQAADARKSFPCFDEPAMKAEFNITLI
 HP
 KDLTALSMLPKGPSTPLPEDPNWNVTEFHTTPKMSTYLLAFIVSEFDYVEKQASNGVLI
 RIWARPSAIAAGHDYALNVTGPILNFFAGHYDTPYPLPKSDQIGLPDFNAGAMENWGL
 V
 TYRENSLLFDPLSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWDLWLNEGFASYVE
 YL
 GADYAEPTWNLKDLMLVNDVYRVMVAVDALASSHPLSTPASEINTPAQISELFDAISYSK
 G
 ASVLRMLSSFLSEDVFKQGLASYLHTFAYQNTIYLNLWDHLQEAVNNRSIQLPTTVRDI
 M
 NRWTLQMGFPVITVDTSTGTLSEHFLDPDSNVTRPSEFNYYVWVIVPITSIRDGRQQDY
 WLIDVRAQNDFSTSGNEWVLLNLNVTGYRNYDEENWRKIQTQLQRDHSIAPVINR
 AQ
 IINDAFNLASAHKVPVTLALNNTLFLIEERQYMPWEAALSSLSYFKLMFDRSEVYGP
 MK
 N
 YLKKQVTPPLFIHFRNNTNNWREIPENLMDQYSEVNAISTACSNVPECEEMVSGLFKQW
 M
 ENPNNNPIHPNLRSTVYCNAIAQGGEEWDFAWEQFRNATLVNEADKLRAALACSKEL
 WI
 LNRYLSYTLNPDILRKQDATSTHISITNNVIGQGLVWDFVQSNWKKLFNDYGGGSF
 SFSN
 LIQAVTRRFSTEYELQQLEQFKKDNEETGFGSGTRALEQALEKTKANIKWVKENKEV
 VL
 Q
 WFTENSK

SEQ ID 48

MME

>sp|P08473|NEP_HUMAN Неприлизин OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MME PE=1 SV=2

MGKSESQMDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYATYDDGICKSS
 DCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDILRDELEV
 VLK
 D
 VLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLKLLPDIYGWPVATENWEQKY
 G
 A
 SWTAEKAIQLNSKYGKKVLINLFGTDDKNSVNHVIHIDQPRGLPSRDYECTGIYK
 E
 ACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMLEKEIANATAKPEDRNDPMLL
 Y
 NKMTLAQIQNFSLEINGKPFWSLWFTNEIMSTVNISITNEEDVVVYAPEYLTCLKPILT
 KYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALYGTSETATWRRCANYVNG
 NME

NAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDDLTWMDAETKKRAEEKALAIKER
 I
 GYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGA
 A
 VVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSLNYGGIGMVGHEITHGFDDNGRNFNKD
 GDLVDWWTQQSASNFKESQSCMVYQYGNFSWDLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLG
 QAYR
 AYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLNFAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRI
 I
 GTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKCRVW

SEQ IDD 49

ENPP1

>sp|P22413|ENPP1_HUMAN Член 1 семейства
 эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENPP1
 PE=1 SV=2

MERDGCAGGGSRGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAAALLAPMDVGE
 EPL
 EKAARARTAKDPNTYKVLVSLVSVCLTTLGCFGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNC
 RCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCIN
 Y
 SSVCQGEKSWVEEPCESINPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLK
 CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPE
 W
 YKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLP
 KDERPHFYTYLEEPDSSGHSYGPVSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLI
 L
 ISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLS
 C
 REPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDN
 V
 FSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKKNPV
 Y
 TPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYG
 RPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPL

SPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTL
 LRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFVLTSCKD
 TSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSECVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSF
 YQQRKEPVS DILK LK THLPTFSQED

SEQ ID 50

NRP1

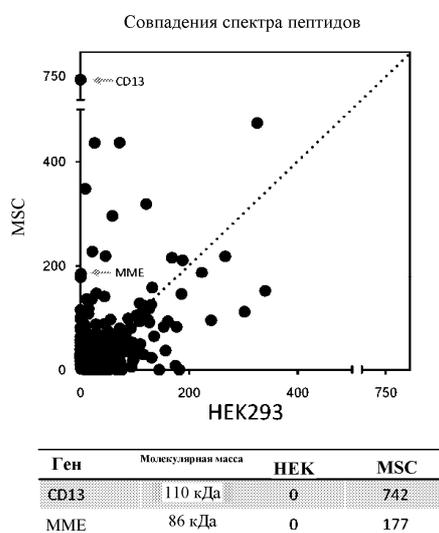
>sp|O14786|NRP1_HUMAN Нейропиплин-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRP1 PE=1
 SV=3

MERGLPLLC AVLALVLAPAGAFRNDKCGDTIKIESPGYLTSPGYPHSYHPSEKCEWLIQA
 PDPYQRIMINFNPHFDLEDRDCKYDYVEVFDGENENGFHFRGKFCGKIAPPPVSSGPFLF
 IKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPECSQNYTTPSGVIKSPGFPEKYPNSLECTYIVFVP
 KMSEIILEFESFDLEPDSNPPGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGQKTPGRIRSSS
 GILSMVFYTDSAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKMEALGMESGEIHSQITASSQYSTN
 WSAERSRLNYPENGWTPGEDSYREWIVDLGLLRVTA VGTQGAISKETKKKYVVKTY
 KI
 DVSSNGEDWITIKENKPVLFQGNTPD VVVAVFPKPLITRFVRIK PATWETGISMRFE
 VYGCKITDYP C S G M L G M V S G L I S D S Q I T S S N Q G D R N W M P E N I R L V T S R S G W A L P P A P H S
 Y
 INEWLQIDLGEEKIVRGIIIQGGKHRENKVFMRKFKIGYSNNGSDWK MIMDDSKRKA K S
 F
 EGNNDYDTPELRTFPALSTRFIRIYPERATHGGLGLRMELLGCEVEAPTAGPTTPNGNLV
 DECDDDQANCHSGTGDDFQLTGGTTVLATEKPTVIDSTIQSEFPTYGFNCEFGWGSHKT
 F
 CHWEHDNHVQLKWSVLTSKTGPIQDHTGDGNFIYSQADENQKGVARLVSPVVYSQN
 SAH
 CMTFWYHMSGSHVGLTRV K L R Y Q K P E E Y D Q L V W M A I G H Q G D H W K E G R V L L H K S L K L
 YQVI
 FEGEIGKGNLGGIAVDDISINNHSQEDCAKPADLDKKNPEIKIDETGSTPGYE G E G E G D
 KNISRKPGNVLKTLDPILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYCACWHNGMSERNLSALENY
 N
 FELVDGVK L K K D K L N T Q S T Y S E A

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

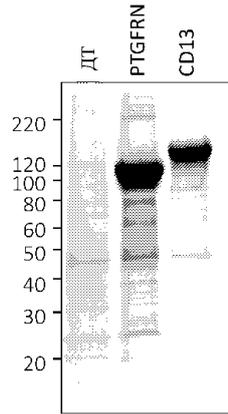
1. Внеклеточная везикула (ВВ), содержащая гетерологичный белок внеклеточной везикулы или его фрагмент (ГБВВ), при этом ВВ продуцируется из клетки-продуцента, которая в природе не экспрессирует ГБВВ.
2. ВВ по п.1, которая содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ГБВВ.
3. ВВ по п.1 или 2, отличающаяся тем, что уровень ГБВВ в ВВ составляет по меньшей мере от около 10 спектральных совпадений пептидов (СП) до около 1000 СП, измеренных с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС).
4. ВВ по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что уровень ГБВВ в ВВ составляет по меньшей мере около 5% от общего содержания белка соответствующих ВВ, продуцируемых из донорской клетки, которая естественным образом экспрессирует ГБВВ.
5. ВВ по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что плотность ГБВВ в ВВ превышает плотность ГБВВ в соответствующих ВВ, продуцируемых донорской клеткой, которая в природе экспрессирует ГБВВ.
6. ВВ по любому из предыдущих пп.1-5, отличающаяся тем, что ГБВВ содержит CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1 или их фрагмент.
7. Внеклеточная везикула (ВВ), содержащая гетерологичный белок внеклеточной везикулы или его фрагмент (ГБВВ), при этом ГБВВ содержит CD13, ММЕ, ENPP1 и NRP1 или их фрагмент.
8. ВВ по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что ГБВВ представляет собой слитый белок.
9. ВВ по п.8, отличающаяся тем, что слитый белок содержит функциональную группу.
10. ВВ по п.9, отличающаяся тем, что функциональная группа включает аффинный маркер, терапевтическое соединение, нацеливающую группу или их комбинацию.

11. ВВ по п.10, отличающаяся тем, что аффинный маркер представляет собой пептид.
12. ВВ по п.10, отличающаяся тем, что терапевтическое соединение включает природный пептид, рекомбинантный пептид, синтетический пептид и любую их комбинацию, нуклеотид, аминокислоту, липид, углевод, малую молекулу, антитело или его фрагмент, фермент, лиганд, рецептор или любую их комбинацию.
13. ВВ по любому из пп.9-12, отличающаяся тем, что слитый белок дополнительно содержит линкер.
14. ВВ по п.13, отличающаяся тем, что ГБВВ конъюгирован с функциональной группой с помощью линкера.
15. ВВ по п.13 или 14, отличающаяся тем, что линкер включает гибкий линкер, жесткий линкер, расщепляемый линкер или их комбинацию.
16. ВВ по любому из пп.1-15, отличающаяся тем, что клетка-производитель включает клетку НЕК, клетку СНО, клетку MB-231, клетку Raji, клетку PER.C6, клетку CAP, клетку МСК или любую их комбинацию.
17. ВВ по любому из пп.1-16, отличающаяся тем, что ГБВВ включает белок внеклеточной везикулы (БВВ) фибробластов легких, БВВ клеток эндотелия аорты, БВВ клеток острого миелоидного лейкоза, БВВ моноцитов, БВВ В-клеточной лимфомы, БВВ макрофагов, БВВ клеток эндотелия головного мозга, БВВ мезенхимальных клеток или любую их комбинацию.
18. ВВ по п.17, отличающаяся тем, что ГБВВ представляет собой БВВ человека, БВВ мыши, БВВ крысы, БВВ собаки или БВВ обезьяны.
19. ВВ по любому из пп.1-18, отличающаяся тем, что ВВ дополнительно включает БВВ, выбранный из PTGFRN, BSG, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, транспортера АТФ либо его фрагмента или любой их комбинации.
20. ВВ по любому из пп.1-19, отличающаяся тем, что клетка-производитель представляет собой клетку нечеловеческого происхождения, при этом ГБВВ представляет собой ГБВВ человека.
21. ВВ по любому из пп.1-19, отличающаяся тем, что клетка-производитель представляет собой клетку человека, при этом ГБВВ представляет собой ГБВВ нечеловеческого происхождения.
22. Фармацевтический состав, содержащий ВВ по любому из пп.1-21.
23. Набор для доставки одной или более терапевтических молекул субъекту, нуждающемуся в этом, содержащий ВВ или фармацевтический состав по любому из пп.1-22 и инструкции по применению.
24. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества ВВ или фармацевтического состава по любому из пп.1-22.
25. Способ по п.24, отличающийся тем, что заболевание или расстройство включает рак, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, глазные заболевания, болезнь трансплантат против хозяина (GvHD), аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, респираторные заболевания, аллергические заболевания, дегенеративные заболевания, инфекционные заболевания, фиброзные заболевания или любое их сочетание.
26. Способ экспрессии не встречающегося в природе белка в ВВ, полученной из клетки, включающий трансфекцию нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный белок внеклеточных везикул или его фрагмент (ГБВВ), в клетку и выделение ВВ, содержащей ГБВВ, из клетки, при этом ГБВВ не встречается в природе в ВВ, полученной из клетки.
27. Способ по п.26, отличающийся тем, что ВВ включает ВВ по любому из пп.1-21.

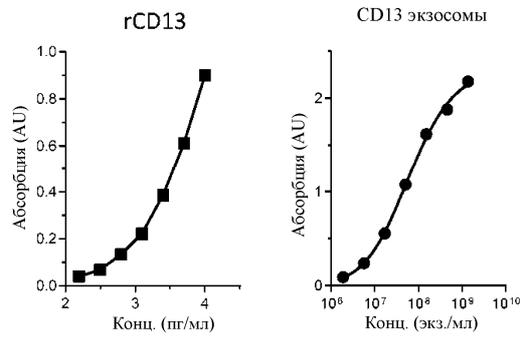


Фиг. 1

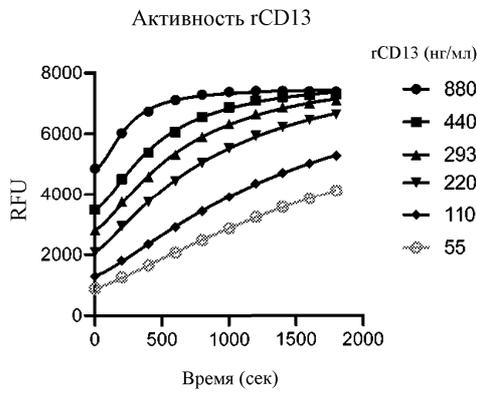
045701



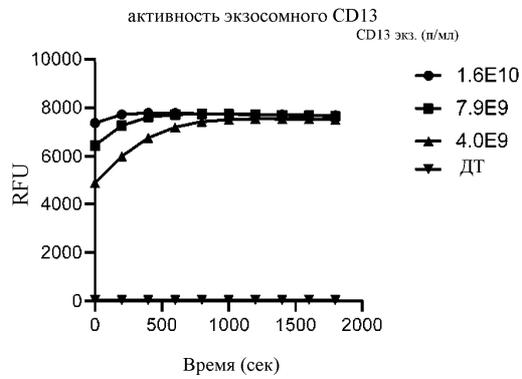
Фиг. 2А



Фиг. 2В

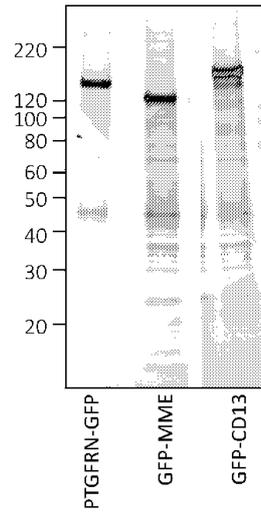


Фиг. 3А

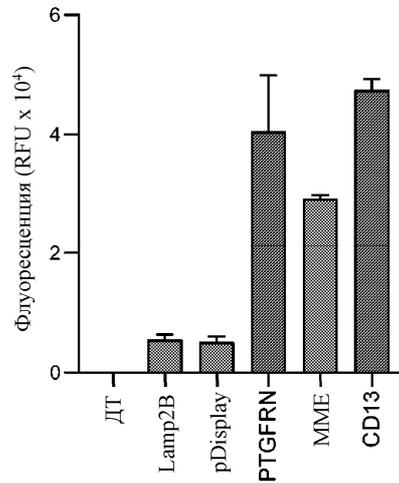


Фиг. 3В

045701



Фиг. 4А



Фиг. 4В