PREPARACIÓN DE EXOSOMAS TERAPÉUTICOS MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

0. LISTADO DE SECUENCIAS

[0000] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 22 de agosto de 2018, se denomina 40714PCT_CRF_sequencelisting.txt y tiene un tamaño de 175,092 bytes.

1. ANTECEDENTES

[0001] Los exosomas son mediadores importantes de comunicación intercelular. También son importantes biomarcadores en el diagnóstico y prognosis de muchas enfermedades, tal como cáncer. Como vehículos de administración de fármacos, los exosomas ofrecen muchas ventajas sobre los métodos de administración de fármacos tradicionales como una nueva modalidad de tratamiento en muchas áreas terapéuticas.

[0002] El uso de exosomas para fines terapéuticos requiere que exosomas sean libres o mayormente libres de impurezas que incluyen de modo no taxativo proteínas contaminantes, ADN, carbohidratos y lípidos. Los métodos de purificación actuales no ofrecen suficiente selectividad para quitar las cantidades considerables de estas impurezas por lo cual procesos adicionales se desean para mejorar la pureza.

[0003] Además, a medida que los exosomas se vuelven más frecuentemente usados en el tratamiento de enfermedades en humanos, puede que se esfuercen por cumplir las expectativas clínicas debido a la heterogeneidad en sus parámetros fisicoquímicos que confieren direccionamiento molecular, evasión inmunitaria y liberación de fármaco controlado. Esto se debe principalmente a la heterogeneidad y complejidad de las propiedades de exosomas (por ejemplo, composición, tamaño, forma, rigidez, carga de superficie, hidrofilicidad, estabilidad, y tipo de ligando y densidad), propiedades de carga (por ejemplo, tipo de fármaco, solubilidad, carga, potencia, dosificación, respuesta inmunitaria, y cinética de liberación), y barreras fisiológicas in vivo al tráfico de exosomas (por ejemplo, inmunovigilancia, extravasación de partículas, direccionamiento de tejido, penetración de tejido y absorción celular). Aunque se ha realizado una cantidad considerable de esfuerzo, métodos eficaces para obtener subpoblaciones separadas de exosomas terapéuticas con propiedades deseadas, por ejemplo, los exosomas que contienen cargas terapéuticas y que

tienen restos de direccionamiento apropiados, no están aún disponibles.

[0004] Métodos adecuados para generar, aislar y purificar subpoblaciones separadas de exosomas son necesarios para permitir un mejor uso terapéutico y otras aplicaciones de tecnologías basadas en exosomas.

COMPENDIO

[0005] Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos novedosos para preparar exosomas para uso terapéutico. Específicamente, los métodos usan marcadores de superficie que están nuevamente identificados para ser enriquecidos en la superficie de exosomas. En particular, un grupo de proteínas (por ejemplo, regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN); basigina (BSG); miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2); miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3); miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8); integrina beta-1 (ITGB1); integrina alfa-4 (ITGA4); 4F2 cadena pesada de antígeno de superficie celular (SLC3A2); y una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4)) se identificaron por ser altamente enriquecidas en la superficie de exosomas.

[0006] Las proteínas recientemente identificadas se pueden usar en varias modalidades de la presente invención. Un aspecto de la presente invención se refiere a generar una proteína de fusión al conjugar la proteína de exosomas recientemente identificada y una proteína terapéutica, y producir un exosoma modificado genéticamente que contiene la proteína de fusión en la superficie. Un fragmento biológicamente activo o de longitud completa nativo de la proteína terapéutica se puede transportar a la superficie de exosomas al ser conjugado a las proteínas enriquecidas con exosomas. El método que usa las proteínas de exosomas recientemente identificadas tal como se proporcionan en la presente son mejores al producir exosomas modificados genéticamente en la superficie que los métodos que usan algunas otras proteínas de estructura de exosoma conocidas en la técnica (por ejemplo, Lamp2B, PDGFR, lactadherina CD9, CD63 y/o CD81, o fragmentos de estos). Sin intención de limitarse a una teoría, se cree que las proteínas recientemente identificadas son mejores porque varias de las proteínas de andamiaje de exosoma conocidas en la técnica – es decir, proteínas tetraspannina tal como CD9, CD63 y CD81, tienen ambos extremos C y N en el lumen de exosoma.

[0007] Otro aspecto de la presente invención se refiere a la purificación de un exosoma mediante purificación de afinidad de una solución heterogénea tal como medio de cultivo celular o plasma usando las proteínas de exosomas que son comunes a todos los exosomas, o comunes a todos los exosomas derivados de un solo tipo celular. Algunas modalidades se refieren al aislamiento de una subpoblación de exosomas del total de exosomas al usar marcadores de superficie específicos para una subpoblación de exosomas.

[0008] Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para quitar exosomas de una muestra cuando los exosomas son un producto contaminante. Por ejemplo, los virus modificados genéticamente o naturales pueden ser purificados a partir de exosomas contaminantes. Las proteínas de exosomas descritas en la presente por lo tanto se pueden usar para quitar de forma selectiva los exosomas de procesos biológicos donde otras partículas de tamaño, forma y/o carga similar son el producto deseable.

[0009] Otro aspecto de la presente invención se refiere a la generación o uso de un exosoma modificado genéticamente en la superficie diseñado para tener una purificación de afinidad más eficiente, o para la presentación de un resto de direccionamiento o una proteína terapéuticamente relevante en la superficie. Por ejemplo, las superficies de exosomas pueden modificarse para que contengan la proteína de exosoma de longitud completa nativa y/o un fragmento o una proteína modificada de la proteína de exosoma nativo en la superficie a una densidad mayor.

[00010] La presente invención se refiere adicionalmente a una célula productora o un método para generar la célula productora para producir tal exosoma modificado genéticamente en la superficie. Un polinucleótido exógeno se puede introducir de forma transitoria o estable en una célula productora para hacer que la célula productora genere un exosoma modificado genéticamente en la superficie.

[00011] Específicamente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para aislar un exosoma, que comprende las etapas de: (1) proporcionar una muestra que comprende el exosoma; (2) contactar la muestra con un agente de unión que tiene afinidad con una proteína objetivo, donde la proteína objetivo comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador ATP o un fragmento o una variante de este; y (3) aislar el exosoma basándose en una unión entre la proteína objetivo y el agente de unión.

[00012] En algunas modalidades, la muestra se obtiene de una célula cultivada in vitro, opcionalmente donde la célula es una célula HEK293, una célula de ovario de hámster chino (CHO), o una célula madre mesenquimal (MSC). En algunas modalidades, la muestra se obtiene de un fluido corporal de un sujeto.

[00013] En algunas modalidades, la célula se modifica genéticamente para expresar la proteína objetivo. En algunas modalidades, la célula comprende un plásmido de expresión que codifica la proteína objetivo. En algunas modalidades, la célula es modificada genéticamente para que comprenda una secuencia exógena que expresa una etiqueta que tiene afinidad con el agente de unión, donde la secuencia exógena se inserta en un genoma de la célula. En algunas modalidades, la secuencia exógena se inserta en un sitio genómico ubicado en el extremo 3' o 5' de una secuencia endógena que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador de ATP. En algunas modalidades, la secuencia endógena no codifica a IGSF8. En algunas modalidades, la secuencia exógena se inserta en un sitio genómico ubicado dentro de una secuencia endógena que codifica PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador de ATP.

[00014] En algunas modalidades, la proteína objetivo es una proteína de fusión que comprende la etiqueta, y PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos. En algunas modalidades, el exosoma comprende la proteína objetivo. En algunas modalidades, la proteína objetivo no es IGSF8 o un fragmento o modificación de este. En algunas modalidades, la célula se modifica genéticamente para tener una expresión reducida de ADAM10.

[00015] En algunas modalidades, el exosoma comprende la proteína objetivo. En algunas modalidades, la proteína objetivo se selecciona de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 y transportador de ATP. En algunas modalidades, la proteína objetivo comprende un fragmento o una variante de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o transportador de ATP. En algunas modalidades, la proteína objetivo comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 33 En algunas modalidades, la proteína objetivo es una proteína de fusión que comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y una etiqueta de afinidad, donde la etiqueta de afinidad tiene afinidad con el agente de unión. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento o modificación de este.

[00016] En algunas modalidades, el agente de unión comprende una inmunoglobulina, una proteína, un péptido o una molécula pequeña. En algunas modalidades, el agente de unión está unido a un soporte sólido, opcionalmente donde el soporte sólido comprende una esfera de agarosa, una placa de microtitulación, una esfera magnética o una membrana.

[00017] En algunas modalidades, el soporte sólido forma una columna de cromatografía. En algunas modalidades, la etapa de poner en contacto la muestra con el agente de unión se realiza al aplicar la muestra a la columna de cromatografía.

[00018] En algunas modalidades, el método adicionalmente comprende las etapas de: (1) poner en contacto un subconjunto de la muestra con un agente de unión diferente que tiene afinidad con una proteína objetivo diferente; y (2) aislar el exosoma basándose en una unión entre la proteína objetivo diferente y el agente de unión diferente. En algunas modalidades, la proteína objetivo diferente comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos. En algunas modalidades, la proteína objetivo diferente comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 33

[00019] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un exosoma producido mediante los métodos proporcionados en la presente.

[00020] En aun otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el exosoma de la presente invención y un excipiente. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una concentración inferior de macromoléculas que la muestra que comprende la fuente de exosomas, donde las macromoléculas son ácidos nucleicos, proteínas contaminantes, lípidos, carbohidratos, metabolitos o una combinación de estos. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se encuentra sustancialmente libre de macromoléculas.

[00021] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un exosoma que comprende una proteína objetivo donde al menos una parte de la proteína objetivo se expresa de una secuencia exógena, y la proteína objetivo comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variantes de este. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento o una variante de este. En algunas modalidades, la proteína objetivo comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 33

[00022] En algunas modalidades, el exosoma se aísla basándose en una unión entre la

proteína objetivo y un agente de unión.

[00023] En algunas modalidades, el exosoma se produce de una célula genéticamente modificada para comprender la secuencia exógena, opcionalmente donde la célula es una célula HEK293, una célula de ovario de hámster chino (CHO), o una célula madre mesenquimal (MSC). En algunas modalidades, la célula se modifica genéticamente para tener una expresión reducida de ADAM10.

[00024] En algunas modalidades, la célula comprende un plásmido que comprende la secuencia exógena.

[00025] En algunas modalidades, la célula comprende la secuencia exógena insertada en un genoma de la célula. En algunas modalidades, la secuencia exógena se inserta en un sitio genómico ubicado en el extremo 3' o 5' de una secuencia genómica que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador de ATP. En algunas modalidades, la secuencia exógena se inserta en un secuencia genómica que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador de ATP. En algunas modalidades, la secuencia exógena no codifica a IGSF8.

[00026] En algunas modalidades, la proteína objetivo es una proteína de fusión que comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y una etiqueta de afinidad, donde la etiqueta de afinidad tiene afinidad con el agente de unión. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento de este.

[00027] En algunas modalidades, la proteína objetivo es una proteína de fusión que comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y un péptido terapéutico. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento de este.

[00028] El péptido terapéutico se puede seleccionar de un grupo que consiste en un péptido natural, un péptido recombinante, un péptido sintético o un enlazador a un compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en nucleótidos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, y moléculas pequeñas.

[00029] El péptido terapéutico puede ser un anticuerpo o un fragmento o una variante de este. El péptido terapéutico puede ser una enzima, un ligando, un receptor o un fragmento o una variante de este. El péptido terapéutico puede ser un péptido antimicrobiano o un

fragmento o una variante de este.

[00030] En algunas modalidades, la proteína objetivo es una proteína de fusión que comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y un resto de direccionamiento. El resto de direccionamiento puede ser específico a un órgano, un tejido o una célula. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento de este.

[00031] En algunas modalidades, el exosoma comprende además una segunda proteína objetivo diferente, donde la proteína objetivo diferente comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos. En algunas modalidades, el exosoma se aísla basándose en una unión entre la proteína objetivo diferente y un agente de unión diferente. En algunas modalidades, la proteína objetivo no comprende IGSF8 o un fragmento de este.

[00032] En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el exosoma de la presente invención y un excipiente.

[00033] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas están sustancialmente libres de macromoléculas, donde las macromoléculas se seleccionan de ácidos nucleicos, proteínas contaminantes, lípidos, carbohidratos, metabolitos y una combinación de estos.

[00034] En un aspecto, la presente invención se dirige a una célula para producir el exosoma presentado en la presente.

[00035] Específicamente, algunas modalidades se refieren a una célula para producir exosomas, que comprenden una secuencia exógena insertada en una secuencia genómica que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, o transportador de ATP, donde la secuencia exógena y la secuencia genómica codifica una proteína de fusión. En algunas modalidades, la secuencia genómica no codifica a IGSF8.

[00036] La secuencia exógena puede codificar una etiqueta de afinidad.

[00037] La secuencia exógena puede codificar un péptido terapéutico. El péptido terapéutico se puede seleccionar de un grupo que consiste en un péptido natural, un péptido recombinante, un péptido sintético o un enlazador a un compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en nucleótidos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, y moléculas pequeñas. El péptido terapéutico puede ser un anticuerpo o un

fragmento o una variante de este. El péptido terapéutico puede ser una enzima, un ligando, un receptor o un fragmento o una variante de este. El péptido terapéutico puede ser un péptido antimicrobiano o un fragmento o una variante de este.

[00038] La secuencia exógena puede codificar un resto de direccionamiento. El resto de direccionamiento puede ser específico a un órgano, un tejido o una célula.

[00039] En algunas modalidades, la línea celular se modifica genéticamente para tener una expresión reducida de ADAM10.

[00040] En un aspecto, la presente invención proporciona un exosoma producido de la línea celular de la presente invención. En algunas modalidades, el exosoma incluye la proteína de fusión en la superficie a una densidad mayor que una proteína de fusión diferente en la superficie de un exosoma diferente, donde el exosoma diferente se produce de una línea celular diferente que comprende la secuencia exógena insertada en una secuencia genómica que codifica una proteína de exosoma convencional, donde la secuencia exógena y la diferente secuencia genómica codifica la proteína de fusión diferente. En algunas modalidades, la proteína de exosoma convencional se selecciona del grupo que consiste en CD9, CD63, CD81, PDGFR, proteínas de anclaje GPI, LAMP2, LAMP2B, y un fragmento de estos.

[00041] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para aislar un material no exosomal, que comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende un exosoma y el material que no es exosoma; poner en contacto la muestra con un agente de unión que tiene afinidad con una proteína objetivo, donde la proteína objetivo comprende PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de esta, que induce de este modo al exosoma para que se una al agente de unión y aísle el material que no es exosoma.

[00042] En algunas modalidades, el material no exosomal es un virus o una proteína. En algunas modalidades, el material no exosomal es lentivirus, retrovirus, virus adeno-asociado, u otro virus con envoltura o sin envoltura. En algunas modalidades, el material no exosomal es una proteína recombinante. En algunas modalidades, el material no exosomal aislado está sustancialmente libre de exosomas.

[00043] En algunas modalidades, la proteína objetivo comprende además una etiqueta de afinidad, donde la etiqueta de afinidad tiene afinidad con el agente de unión. En algunas

modalidades, la proteína objetivo comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 33 En algunas modalidades, el agente de unión comprende una inmunoglobulina, una proteína, un péptido o una molécula pequeña. En algunas modalidades, el agente de unión está unido a un soporte sólido, opcionalmente donde el soporte sólido comprende una esfera de agarosa, una placa de microtitulación, una esfera magnética o una membrana. En algunas modalidades, el soporte sólido forma una columna de cromatografía. En algunas modalidades, la etapa de poner en contacto la muestra con el agente de unión se realiza al aplicar la muestra a la columna de cromatografía.

[00044] En algunas modalidades, los métodos de purificación descritos en la presente se usan para purificación de nanovesículas. En algunas modalidades, las composiciones y los métodos descritos en la presente están dirigidos a nanovesículas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[00045] Las figuras describen varias modalidades de la presente invención con fines de ilustración solamente. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente de la siguiente discusión que modalidades alternativas de las estructuras y métodos ilustrados en la presente se pueden emplear sin alejarse de los principios de la invención descritos en la presente.

[00046] La Figura 1 proporciona una imagen de gradiente de densidad de Optiprep™ que contiene la muestra después de la ultracentrifugación. Marcadas con paréntesis se encuentra la fracción superior que contiene exosomas (“superior”), la fracción del medio que contiene desechos de célula (“medio”) y la fracción inferior que contiene agregados de densidad elevada y desechos celulares (“inferior”).

[00047] La Figura 2 es una gráfica de puntos que muestra proteínas identificadas de la fracción superior (eje Y) y proteínas identificadas de la fracción inferior (eje X) de ultracentrifugación Optiprep™. Las proteínas graficadas arriba de la línea punteada representan proteínas enriquecidas con exosomas, mientras aquellas debajo de la línea punteada representan proteínas no específicas a los exosomas.

[00048] La Figura 3 proporciona un mapa de cobertura de péptido tríptico de PTGFRN (SEQ ID NO: 1).

[00049] La Figura 4 proporciona un mapa de cobertura de péptido tríptico de IGSF8 (SEQ ID NO: 14).

[00050] La Figura 5 proporciona un mapa de cobertura de péptido tríptico de Basigina

(BSG) (SEQ ID NO: 9).

[00051] La Figura 6A muestra una imagen de transferencia de proteínas del total del lisado de células (izquierda) y poblaciones de exosomas purificados (derecha) recolectado de las células HEK293. La Figura 6B muestra un resultado de transferencia Western del gel proporcionado en la Figura 6A con un anticuerpo contra PTGFRN. La banda detectada en la columna derecha se corresponde a una banda a ~110kDa en la Figura 6A.

[00052] La Figura 7A muestra transferencia de proteínas de doce fracciones recolectadas desde una purificación usando gradientes de Optiprep™ autoformadores. La Figura 7B muestra un resultado de transferencia Western del gel presentado en la Figura 7A con anticuerpos contra ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF3, IGSF8, Basigina, Alix, o Sintenina. Cada una de las proteínas de superficie de exosomas novedosas (ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, Basigina) se detecta en las mismas fracciones como las proteínas de marcadores de exosomas conocidos (Alix, Sintenina).

[00053] La Figura 8 ilustra proteínas de superficie de exosomas (ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, BSG) que se usan para varias modalidades de la presente invención, por ejemplo, para dirigirse a proteína de fusión en la superficie de un exosoma, o como un objetivo para la purificación de afinidad de un exosoma.

[00054] La Figura 9A ilustra la estructura de PTGFRN con identificación de los límites de los dominios IgV (flechas) y GFP fusionado con el extremo C de PTGFRN. La Figura 9B proporciona una imagen de gel de los exosomas de transferencia Western aislados de un cultivo celular que sobreexpresa varias proteínas de fusión GFP-PTGFRN. Las proteínas de fusión GFP-PTGFRN se detectaron usando un anticuerpo contra GFP.

[00055] La Figura 10 proporciona una imagen de gel que ejecuta el total de proteínas de los exosomas purificados aislados de las células que sobreexpresan varias proteínas de fusión GFP-PTGFRN.

[00056] La Figura 11A ilustra la estructura de PTGFRN con identificación de los límites de los dominios IgV (flechas) y FLAG fusionado con el extremo N de PTGFRN. La Figura 11B proporciona una imagen de gel de los exosomas de transferencia Western aislados de un cultivo celular que sobreexpresa varias proteínas de fusión FLAG-PTGFRN. Las proteínas de fusión GFP-PTGFRN se detectaron usando un anticuerpo contra la etiqueta FLAG.

[00057] La Figura 12A proporciona una imagen de gel que ejecuta el total de proteínas

de los exosomas purificados aislados de las células de tipo salvaje (ADAM10+) o las células de inactivación ADAM10 (ADAM10-), cada célula que expresa una proteína de fusión de GFP que contiene PTGFRN de longitud completa (PTGFRN-GFP) o un PTGFRN truncado (PTGFRN_IgV3-GFP). La Figura 12B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 12A usando un anticuerpo contra ADAM10. La Figura 12C proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 12A usando un anticuerpo contra GFP.

[00058] La Figura 13 ilustra la estructura de una proteína de fusión que contiene PTGFRN al que le faltan cinco de los seis dominios de IgV (PTGFRN_IgV6), etiqueta FLAG, y una proteína compañera de fusión.

[00059] La Figura 14A proporciona las secuencias de PTGFRN_IgV6 (#451) (SEQ ID NO: 42) y mutantes de truncamiento seriales de PTGFRN_IgV6 al que le faltan cuatro (#452) (SEQ ID NO: 43), ocho (#453) (SEQ ID NO: 44), o doce (#454) (SEQ ID NO: 45) aminoácidos adicionales. La Figura 14B proporciona una imagen de gel que ejecuta el total de proteínas de los exosomas purificados aislados de las células que sobreexpresan una proteína de fusión #451, 452, 453 o 454. La Figura 14C proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de la muestra de la Figura 14B usando un anticuerpo contra FLAG.

[00060] La Figura 15 proporciona las señales de fluorescencia GFP detectadas de exosomas aislados de células que sobreexpresan varias proteínas de fusión GFP – las proteínas de fusión GFP contienen GFP fusionado al lado luminal del andamiaje pDisplay frecuentemente usado (receptor PDGF), PalmPalm (secuencia de palmitoilación), CD81, o ya sea PTGFRN (FL) o PTGFRN_454 de longitud completa (sIgV).

[00061] La Figura 16A ilustra la estructura de una proteína de fusión que contiene IGSF8 y GFP fusionado con el extremo C de IGSF8. La Figura 16B proporciona una imagen de gel que ejecuta el total de proteínas de los exosomas aislados de las células HEK293 no transfectadas (nativas) o las células HEK transfectadas de forma estable con una construcción que codifica una proteína de fusión IGFS8-GFP. La Figura 16B también proporciona en la parte inferior de una imagen de gel de la transferencia Western la muestra con un anticuerpo contra GFP.

[00062] La Figura 17 proporciona las señales de fluorescencia GFP detectadas de exosomas aislados de células que sobreexpresan varias proteínas de fusión GFP – las

proteínas de fusión GFP contienen GFP fusionado al lado luminal del andamiaje pDisplay frecuentemente usado (receptor PDGF), CD81, IGSF8 de longitud completa, o bien PTGFRN de longitud completa (FL) o PTGFRN_454 (sIgV).

[00063] La Figura 18 proporciona una estructura de una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular (ECD) de PTGFRN, el péptido de señal endógena en el extremo N (SP), un sitio de escisión PAR1, y el dominio Fc en el extremo C. La Figura 18 describe la SEQ ID NO: 46

[00064] La Figura 19A proporciona un resultado de cromatografía de filtración de gel de ECD purificado de PTGFRN en PBS pH 7.4 usando una columna Superdex 200 (Millpore Sigma) a fluorescencia UV de 280 nm. La Figura 19B proporciona una imagen de gel SDS-PAGE de cromatografía de filtración de gel de eluido que contiene ECD purificado de PTGFRN.

[00065] La Figura 20A proporciona los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño/difusión de luz de múltiple ángulo (SEC-MALS) de PTGFRN ECD, anticuerpo anti-VLA4 y BSA. La Figura 20B proporciona los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de PTGFRN ECD en la ausencia de cloruro de guanidio (GuHCl), o en la presencia de cloruro de guanidio 1 M, o 2 M (GuHCl). Se indican los picos que representan un monómero o un dímero de PTGFRN.

[00066] La Figura 21 proporciona los tres primeros resultados identificados como compañeros de unión de ectodominio PTGFRN de un ensayo de unión a pH 7.4 (superior), y los cinco primeros resultados identificados del ensayo de unión a pH 5.6 (inferior).

[00067] La Figura 22 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre PTGFRN y LGALS1 en la presencia de concentraciones en aumento de LGALS1.

[00068] La Figura 23 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre PTGFRN y LGALS1 en la presencia de concentraciones en aumento de lactosa.

[00069] La Figura 24 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre PTGFRN y el anticuerpo anti-CD315 en la presencia de concentraciones en aumento de anticuerpo anti-CD315.

[00070] La Figura 25 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI)

para estudiar la interacción entre el anticuerpo anti-CD315 y los exosomas nativos en la presencia de concentraciones en aumento de exosomas nativos aislados de HEK293.

[00071] La Figura 26 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre el anticuerpo anti-CD315 y los exosomas modificados para sobreexpresar PTGFRN (exosomas PTGFRN++) en la presencia de concentraciones en aumento de los exosomas modificados.

[00072] La Figura 27 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para comparar la interacción entre el anticuerpo anti-CD315 y los exosomas nativos, o entre el anticuerpo anti-CD315 y exosomas modificados que sobreexpresan PTGFRN (PTGFRN++).

[00073] La Figura 28 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre el anticuerpo anti-CD315 y PTGFRN de longitud completa o entre el anticuerpo anti-CD315 y una serie de mutantes truncados de PTGFRN.

[00074] La Figura 29A proporciona una imagen de gel que ejecuta proteínas biotiniladas in vivo que incluyen mutantes truncados de PTGFRN recombinante aislado de células HEK transfectadas, y exosomas purificados de células HEK293. La Figura 29B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de la muestra de la Figura 29A usando anticuerpos PTGFRN policlonales agrupados.

[00075] La Figura 30 proporciona los resultados de la interferometría de biocapa (BLI) para estudiar la interacción entre anticuerpos PTGFRN policlonales y varios mutantes de truncamiento de PTGFRN.

[00076] La Figura 31 proporciona la cantidad de emparejamientos de espectro de péptido (PSM) de proteínas de superficie (PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 y CD9) para exosomas purificados de varias líneas celulares de diferentes orígenes (HEK293SF, riñón; HT1080, tejido conjuntivo; K562, médula ósea; MDA-MB-231, mama; Raji, linfoblasto; célula madre mesenquimal (MSC), médula ósea).

[00077] La Figura 32A proporciona una imagen de gel que ejecuta exosomas de PTGFRN inactivado (KO) y nativos. La Figura 32B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 32A usando anticuerpos PTGFRN policlonales agrupados.

[00078] La Figura 33 proporciona una gráfica de dispersión de emparejamientos de espectro de péptido (PSM) de exosomas purificados nativos (eje y) y de PTGRN KO (eje x).

[00079] La Figura 34 proporciona los resultados BLI para estudiar la interacción entre un anticuerpo anti-CD315 monoclonal y exosomas ya sea nativos, PTGFRN++ y de PTGFRN KO.

[00080] La Figura 35A proporciona una imagen de un gel de poliacrilamida de una purificación de exosoma in vitro de exosomas nativos y de PTGFRN inactivado (KO) usando un anticuerpo anti-PTGFRN monoclonal inmovilizado. La Figura 35B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 35A usando un anticuerpo anti-PTGFRN.

[00081] La Figura 36A proporciona una imagen de un gel de poliacrilamida que ejecuta exosomas nativos o exosomas modificados diseñados para expresar PTGFRN-BDDFIII. La Figura 36 B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 36A usando anticuerpos CD81 (parte superior) o anticuerpos FVIII (parte inferior).

[00082] La Figura 37A proporciona una imagen de un gel de poliacrilamida que ejecuta exosomas nativos o exosomas modificados diseñados para expresar XTEN-PTGFRN-GFP. La Figura 37B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 37A usando anticuerpos ALIX (parte superior) o anticuerpos GFP (parte inferior).

[00083] La Figura 38 es una gráfica que proporciona porcentajes de partículas GFP positivas (barras negras, eje y izquierdo) e intensidad fluorescente media (barras grises, eje y derecho) en cuatro grupos diferentes de exosomas – exosomas modificados diseñados para expresar (i) CD9-GFP, (ii) CD81-GFP, o (iii) PTGFRN-GFP, o (iv) exosomas nativos no modificados.

[00084] La Figura 39 proporciona intensidad de fluorescencia de GFP (FU) de exosomas modificados que expresan una proteína de fusión de GFP que contiene un PTGFRN nativo (PTGFRN-GFP), un PTGFRN truncado (454-PTGFRN-GFP) con su propio péptido señal o un PTGFRN truncado (454-PTGFRN-GFP) con un péptido señal sintético de DsbA11.

[00085] La Figura 40A muestra una estructura de una proteína de fusión que consiste en un Fab de cadena simple que reconoce el CLEC9A de lectina, un PTGFRN de longitud completa, GFP, y una etiqueta FLAG. La Figura 40B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de exosomas purificados Optiprep™ usando anticuerpos anti-ALIX (parte superior) o anticuerpos GFP (parte inferior).

[00086] La Figura 41 proporciona los resultados BLI para estudiar la interacción entre

CLEC9A-Fc y los exosomas modificados para expresar una proteína de fusión que consiste en un Fab de cadena simple que reconoce el CLEC9A de lectina, un PTGFRN de longitud completa, GFP, y una etiqueta FLAG ("αCLEC9A-PTGFRN").

[00087] La Figura 42 proporciona imágenes de gel de transferencia Western de exosomas purificadas de células HEK293SF ("HEK") o MSC ("MSC") con anticuerpos contra PTGFRN, ALIX, TSG101, CD63, CD9, o CD81.

[00088] La Figura 43A proporciona una imagen de un gel de poliacrilamida que ejecuta exosomas purificados de células HEK no transfectadas, células HEK transfectadas con un plásmido que expresa PTGFRN de longitud completa fusionado a una etiqueta FLAG ("el plásmido PTGFRN-FLAG"), células CHO no transfectadas, o células CHO transfectadas con el plásmido PTGFRN-FLAG. La Figura 43B proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 43A usando un anticuerpo contra PTGRN. La Figura 43C proporciona una imagen de gel de la transferencia Western de las muestras de la Figura 43A usando un anticuerpo contra una etiqueta FLAG.

[00089] Las Figuras 44A-B ilustran un sistema experimental para evaluar la carga de una proteína de carga en el lumen de exosoma usando CD9 (Figura 44A) o PTGFRN (Figura 44B). La Figura 44A ilustra una célula que expresa CD9 fusionada a GFP, una etiqueta FLAG y FKBP, que puede interactuar con mCherry fusionada a una etiqueta V5 y FKBP en la presencia de Rapamicina. La Figura 44B ilustra una célula que expresa PTGFRN fusionada a GFP, una etiqueta FLAG y FKBP, que puede interactuar con mCherry fusionada a una etiqueta V5 y FKBP en la presencia de Rapamicina.

[00090] La Figura 45A proporciona una imagen de un gel de poliacrilamida que ejecuta exosomas purificados de las muestras de cultivo celular ilustradas en la Figura 44A (CD9) o la Figura 44B (PTGFRN) (parte superior). La figura también proporciona los resultados de la transferencia Western usando un anticuerpo contra FLAG (αFlag) o V5 (αV5) (parte inferior). La Figura 45B proporciona intensidades de banda para FLAG y V5 de la transferencia Western en la Figura 45A, medido por densitometría y normalizado a la cantidad de exosomas recolectados.

DESCRPCIÓN DETALLADA

4.1 Definiciones

[00091] A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos

utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Tal como se usan en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen más adelante.

[00092] Tal como se usa en la presente, el término “vesícula extracelular” o “EV” (por su sigla en inglés) se refiere a una vesícula derivada de células que comprende una membrana que encierra un espacio interno. Las vesículas extracelulares comprenden todas las vesículas unidas a la membrana que tienen un diámetro más pequeño que la célula de la cual derivan. Generalmente las vesículas extracelulares varían en diámetro de 20 nm a 1000 nm, y pueden comprender varias cargas macromoleculares ya sea dentro del espacio interno, mostrado en la superficie externa de la vesícula extracelular, y/o que abarca la membrana. Dicha carga puede comprender ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y/o combinaciones de estos. A modo de ejemplo y de modo no taxativo, las vesículas extracelulares incluyen cuerpos apoptóticos, fragmentos de células, vesículas derivadas de células mediante manipulación directa o indirecta (por ejemplo, por extrusión serial o tratamiento con soluciones alcalinas), organelos vesiculados, y vesículas producidas por células vivientes (por ejemplo, mediante gemación de membrana plasmática directa o fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática). Las vesículas extracelulares se pueden derivar de un organismo vivo o muerto, órganos o tejidos explantados, y/o células cultivadas.

[00093] Tal como se usa en la presente, el término “exosoma” se refiere a una vesícula pequeña derivada de célula (entre 20-300 nm de diámetro, más preferentemente 40-200 nm de diámetro) que comprende una membrana que encierra un espacio interno, y que es generado de dicha célula mediante gemación de membrana plasmática directo o mediante fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática. El exosoma comprende ácidos grasos o lípidos y polipéptido y opcionalmente comprende una carga (por ejemplo, un agente terapéutico), un receptor (por ejemplo, un resto de direccionamiento), un polinucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico, ARN o ADN), un azúcar (por ejemplo, un azúcar simple, polisacárido, o glicano) u otras moléculas. El exosoma puede derivar de una célula productora, y aislado de la célula productora basado en su tamaño, densidad, parámetros bioquímicos, o una combinación de estos. Un exosoma es una especie de vesícula extracelular. Generalmente, la producción/biogénesis de exosoma no tiene como resultado la destrucción de la célula productora.

[00094] Tal como se usa en la presente, el término “nanovesícula” se refiere a una vesícula pequeña derivada de célula (entre 20-250 nm de diámetro, más preferentemente 30-150 nm de diámetro) que comprende una membrana que encierra un espacio interno, y que es generado de dicha célula mediante manipulación directa o indirecta de modo que dicha nanovesícula no sería producida por dicha célula productora sin dicha manipulación. Las manipulaciones apropiadas de dicha célula productora incluyen de modo no taxativo extrusión serial, tratamiento con soluciones alcalinas, sonicación o combinaciones de estos. La producción de nanovesículas puede, en algunos casos, tener como resultado la destrucción de dicha célula productora. Preferentemente, las poblaciones de nanovesículas están sustancialmente libres de vesículas que derivan de células productoras mediante gemación directa de la membrana plasmática o fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática. La nanovesícula comprende ácidos grasos o lípidos y polipéptido y opcionalmente comprende una carga (por ejemplo, un agente terapéutico), un receptor (por ejemplo, un resto de direccionamiento), un polinucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico, ARN o ADN), un azúcar (por ejemplo, un azúcar simple, polisacárido, o glicano) u otras moléculas. La nanovesícula, una vez que deriva de una célula productora de acuerdo con dicha manipulación, se puede aislar de la célula productora basada en su tamaño, densidad, parámetros bioquímicos, o una combinación de estos. Una nanovesícula es una especie de vesícula extracelular.

[00095] Tal como se usa en la presente el término “exosoma modificado genéticamente en la superficie” se refiere a un exosoma con una membrana modificada en su composición. Por ejemplo, la membrana se modifica en su composición de una proteína, un lípido, una molécula pequeña, un carbohidrato, etc. La composición se puede cambiar mediante un método químico, físico o biológico o al ser producido de una célula previa o simultáneamente modificada por un método químico, físico o biológico. Específicamente, la composición se puede cambiar mediante una modificación genética o al ser producida a partir de una célula previamente modificada por modificación genética.

[00096] Tal como se usa en la presente, el término “una modificación” de una proteína se refiere a una proteína que tiene al menos 15 % de identificación con una secuencia de aminoácidos no mutante de la proteína. Una modificación de una proteína incluye un fragmento o una variante de la proteína. Una modificación de una proteína puede además

incluir una modificación química o física a un fragmento o una variante de la proteína.

[00097] Tal como se usa en la presente, el término “un fragmento” de una proteína se refiere a una proteína que se elimina en el extremo N y/o C en comparación con la proteína de origen natural. Preferentemente, un fragmento de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, o transportador de ATP retiene la capacidad de ser específicamente dirigido a exosomas. También se hace referencia a tal fragmento como “fragmento funcional”. Si un fragmento es un fragmento funcional en ese sentido se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar el contenido de proteína de exosomas que incluyen transferencias Western, análisis FACS y fusiones de los fragmentos con proteínas autofluorescentes como, por ejemplo, GFP. En una modalidad particular, el fragmento de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP retiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la capacidad de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, o transportador de ATP de origen natural para que sea específicamente dirigido a los exosomas.

[00098] Tal como se usa en la presente, el término “variante” de una proteína se refiere a una proteína que comparte una determinada identidad de secuencia de aminoácido con otra proteína luego de la alineación mediante un método conocido en la técnica. Una variante de una proteína puede incluir una sustitución, inserción, eliminación, desplazamiento del marco de lectura o redisposición en otra proteína. En una modalidad particular, la variante es una variante que tiene al menos 70 % de identidad con PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento de PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, o transportador de ATP. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de PTGFRN comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con PTGFRN de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de BSG comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con BSG de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de IGSF2 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con IGSF2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 34 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de IGSF3 comparten al

menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con IGSF3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de IGSF8 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con IGSF8 de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ITGB1 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ITGB1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ITGA4 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ITGA4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de SLC3A2 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con SLC3A2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP1A1 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP1A1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 24 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP1A2 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP1A2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 25 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP1A3 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP1A3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP1A4 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP1A4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP1B3 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP1B3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 28 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP2B1 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP2B1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 29 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP2B2 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %

o 99 % de identidad de secuencia con ATP2B2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 30 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP2B3 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP2B3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 o con un fragmento funcional de esta. En algunas modalidades, las variantes o variantes de los fragmentos de ATP2B4 comparten al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con ATP2B4 de acuerdo con la SEQ ID NO: 32 o con un fragmento funcional de esta. En cada uno de los casos anteriores, se prefiere que la variante o variante de un fragmento retenga la capacidad de ser dirigido específicamente a los exosomas.

[00099] Los métodos para alinear las secuencias para su comparación son conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981); Needleman y Wunsch, J. Mol. Bio. 48: 443 (1970); Pearson y Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31 (1988); Higgins y Sharp, Gene 73: 15 237-44 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-3 (1989) Corpet et ál., Nuc. Acids Res. 16: 10881-90 (1988); Huang et ál., Comp. Appl. BioSci. 8: 155-65 (1992); y Pearson et ál., Meth. Mol. Biol. 24: 307-31 (1994). La herramienta de búsqueda de alineación local básica de NCBI (BLAST) [Altschul 20 et ál., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990) J se encuentra disponible de varias fuentes, que incluyen el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md.) y en internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastm, blastx, tblastn y tblastx. BLAST y una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando el programa puede ser accedida en el sitio web oficial del NCBI (Centro nacional para la información de biotecnología) bajo NIH (Instituto nacional de salud).

[000100] La recitación de cualquier proteína proporcionada en la presente abarca una variante funcional de la proteína. El término “variante funcional” de una proteína se refiere a una variante de la proteína que retiene la capacidad de ser específicamente dirigido a los exosomas.

[000101] Tal como se usa en la presente el término “célula productora” se refiere a una célula usada para la generación de un exosoma. Una célula productora puede ser una célula cultivada in vitro, o una célula in vivo. Una célula productora incluye, pero de modo no taxativo, una célula conocida por ser eficaz para generar exosomas, por ejemplo, células HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO), y células madre mesenquimales (MSC).

[000102] Tal como se usa en la presente, el término “proteína objetivo” se refiere a una proteína que se puede dirigir a la superficie de un exosoma. La proteína objetivo puede ser una proteína no mutante que está dirigida naturalmente a una membrana de exosoma, o un fragmento o una variante de la proteína no mutante. La proteína objetivo puede ser una proteína de fusión que contiene una etiqueta de bandera, un péptido terapéutico, un resto de direccionamiento, u otro péptido unido a la proteína no mutante o una variante o un fragmento de la proteína no mutante. La proteína objetivo puede comprender una proteína transmembrana, una proteína integral, una proteína periférica, o una proteína soluble unida a la membrana mediante un enlazador.

[000103] Tal como se usa en la presente, el término “proteína contaminante” se refiere a una proteína que no está asociada con un exosoma. Por ejemplo, una proteína contaminante incluye una proteína, no abarcada en el exosoma y no unida o incorporada en la membrana del exosoma.

[000104] Tal como se usa en la presente, los términos “aislar”, “aislado”, y “que aísla” o “purificar”, “purificado” y “que purifica” así como “extraído” y “que extrae” se usan de manera intercambiable y se refieren al estado de una preparación (por ejemplo, una pluralidad de cantidad y/o concentración conocida o desconocida) de EV deseados, que han sido sometidos a uno o más procesos de purificación, por ejemplo, una selección o un enriquecimiento de la preparación de exosoma deseado. En algunas modalidades, aislar o purificar como se usa en la presente es el proceso de quitar, quitar parcialmente (por ejemplo, una fracción) de los exosomas de una muestra que contiene células productoras. En algunas modalidades, una composición de exosoma aislado no tiene actividad no deseada detectable o, de manera alternativa, el nivel o cantidad de la actividad no deseada se encuentra en o debajo de una cantidad o nivel aceptable. En otras modalidades, una composición de exosoma aislado tiene una cantidad y/o concentración de exosomas deseados a o sobre una concentración y/o cantidad aceptable. En otras composiciones, la composición de exosoma aislado es enriquecida en comparación con el material de partida (por ejemplo, preparaciones de células productoras) de las cuales se obtiene la composición. Este enriquecimiento puede ser de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95%, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 %, 99,999 %, 99,9999 %, o mayor que 99,9999 % en comparación con el material de partida. En algunas modalidades, las preparaciones de exosomas aislados están

sustancialmente libres de productos biológicos residuales. En algunas modalidades, las preparaciones de exosomas aislados están 100 % libres, 99 % libres, 98 % libres, 97 % libres, 96 % libres, 95 % libres, 94 % libres, 93 % libres, 92 % libres, 91 % libres, o 90 % libres de cualquier materia biológica contaminante. Los productos biológicos residuales pueden incluir materiales abióticos (que incluyen químicos) o ácidos nucleicos no deseados, proteínas, lípidos o metabolitos. Sustancialmente libre de productos biológicos residuales puede también significar que la composición de exosomas no contiene células productoras detectables y que solo los exosomas son detectables.

[000105] El término “excipiente” o "portador” hace referencia a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. El término “portador farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de Estados Unidos o enumerados en la farmacopea estadounidense para su uso en animales, que incluye humanos, así como cualquier portador o diluyente que no causa una irritación considerable a un sujeto y no deroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluyen los excipientes y portadores que son útiles para preparar una composición farmacéutica y son generalmente seguros, no tóxicos y deseables.

[000106] Tal como se usa en la presente, el término “carga” se refiere a un agente terapéutico que actúa en un objetivo (por ejemplo, una célula objetivo) que se pone en contacto con el EV. Las cargas que se pueden introducir en un exosoma y/o una célula productora incluye agentes terapéuticos tales como, nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos que comprenden un resto detectable o una toxina o que altera la transcripción), ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN o ARNm que codifican un polipéptido tal como una enzima, o moléculas de ARN que tienen función reguladora tal como miARN, ADNcd, ARNInc, y ARNip), aminoácidos (por ejemplo, los aminoácidos que comprenden un resto detectable o una toxina o que interrumpe la traducción), polipéptidos (por ejemplo, enzimas), lípidos, carbohidratos, y moléculas pequeñas (por ejemplo, toxinas y fármacos de molécula pequeña).

[000107] Tal como se usa en la presente, “un sujeto mamífero” incluye todos los mamíferos, que incluyen de modo no taxativo, humanos, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y

similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, monos, ratas, ratones, conejos, conejillos de indias y similares).

[000108] Los términos "individuo", "sujeto", "hospedador" y "paciente" se utilizan de forma intercambiable en la presente y hacen referencia a cualquier sujeto mamífero para el cual se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente humanos. Los métodos descritos en la presente son aplicables tanto a la terapia humana como a las aplicaciones veterinarias. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero y en otras modalidades el sujeto es un ser humano.

[000109] Tal como se usa en la presente, el término “sustancialmente libre” significa que la muestra que comprende exosomas comprende menos de 10 % de macromoléculas en la concentración de porcentaje de masa/volumen (m/v). Algunas fracciones pueden contener menos de 0,001 %, menos de 0,01 %, menos de 0,05 %, menos de 0,1 %, menos de 0,2 %, menos de 0,3 %, menos de 0,4 %, menos de 0,5 %, menos de 0,6 %, menos de 0,7 %, menos de 0,8 %, menos de 0,9 %, menos de 1 %, menos de 2 %, menos de 3 %, menos de 4 %, menos de 5 %, menos de 6 %, menos de 7 %, menos de 8 %, menos de 9 %, o menos de 10 % (m/v) de macromoléculas.

[000110] Tal como se usa en la presente, el término “macromolécula” significa ácidos nucleicos, proteínas contaminantes, lípidos, carbohidratos, metabolitos o una combinación de estos.

[000111] Tal como se usa en la presente, el término “proteína de exosoma convencional” significa una proteína previamente conocida por estar enriquecida en exosomas, que incluye de modo no taxativo CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI proteínas de anclaje, lactadherina LAMP2, y LAMP2B, un fragmento de este, o un péptido que se une a este.

4.2 Otras convenciones interpretacionales

[000112] Se entiende que los intervalos recitados en la presente se abrevian para todos los valores dentro del intervalo que incluye los extremos recitados. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier cantidad, combinación de cantidades, o subintervalo del grupo que consiste en 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 y 50.

4.3 Proteínas de exosoma

[000113] Un aspecto de la presente invención se refiere a la identificación, uso y modificación de proteínas de exosoma, que están altamente enriquecidas en membranas de exosoma. Tales proteínas de exosoma se pueden identificar al analizar exosomas altamente purificados con espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica.

[000114] Las proteínas de exosoma incluyen varias proteínas de membrana, tal como proteínas transmembrana, proteínas integrales y proteínas periféricas, enriquecidas en las membranas de exosoma. Incluyen varias proteínas de CD, transportadores, integrinas, lectinas y cadherinas. Específicamente, las proteínas incluyen, de modo no taxativo, (1) regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), (2) basigina (BSG), (3) miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3), (4) miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8), (5) integrina beta-1 (ITGB1), (6) integrina alfa-4 (ITGA4), (7) 4F2 cadena pesada de antígeno de superficie celular (SLC3A2), (8) una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), y (9), miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2).

[000115] Una o más proteínas de exosoma identificadas en la presente se pueden usar de forma selectiva dependiendo de una célula productora, condición de producción, métodos de purificación, o aplicación pretendida de los exosomas. Por ejemplo, las proteínas de exoma enriquecidas en una población específica de exosomas se pueden usar para purificar la población específica de exosomas. Las proteínas de exosomas enriquecidas en la superficie de determinados exosomas con un intervalo de tamaño específico, un resto de direccionamiento, una densidad de carga, una carga, etc., se pueden identificar y usar en algunas modalidades de la presente invención. En algunas modalidades, más de una proteína de exosoma se puede usar de forma simultánea o posterior para la generación, purificación y aislamiento de exosomas terapéuticos.

4.4 Exosomas modificados genéticamente en la superficie

[000116] Otro aspecto de la presente invención se refiere a la generación y uso de exosomas modificados genéticamente en la superficie. Los exosomas modificados genéticamente en la superficie tienen una membrana modificada en sus composiciones. Por ejemplo, sus composiciones de membrana se pueden modificar al cambiar el contenido de la proteína, lípido o glicano de la membrana.

[000117] En algunas modalidades, los exosomas modificados genéticamente en la

superficie son generados por métodos químicos y/o físicos, tal como fusión inducida por PEG y/o fusión ultrasónica.

[000118] En otras modalidades, los exosomas modificados genéticamente en la superficie son generados por modificación genética. Los exosomas producidos de una célula productora genéticamente modificada o una progenie de la célula genéticamente modificada pueden contener composiciones de membrana modificadas. En algunas modalidades, los exosomas modificados en la superficie tienen la proteína de exosoma a una densidad mayor o menor o incluyen una variante o un fragmento de la proteína de exosoma.

[000119] Por ejemplo, los exosomas modificados genéticamente en la superficie pueden producirse desde una célula transformada con una secuencia exógena que codifica la proteínas de exosoma o una variante o un fragmento de la proteína de exosoma. Los exosomas que incluyen proteínas expresadas de la secuencia exógena pueden incluir composiciones de proteína de membrana modificada.

[000120] Varias modificaciones o fragmentos de la proteína de exosoma se pueden usar para las modalidades de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas modificadas para que tengan afinidad aumentada a un agente de unión se pueden usar para generar exosomas modificados genéticamente en la superficie que se pueden purificar usando el agente de unión. Se pueden usar las proteínas modificadas para ser dirigidas más eficazmente a exosomas y/o membranas. Las proteínas modificadas para comprender un fragmento mínimo requerido para el direccionamiento específico y eficaz a las membranas de exosomas también se pueden usar.

[000121] Las proteínas de fusión también se pueden usar, por ejemplo, las proteínas de exosomas o sus fragmentos fusionados a una etiqueta de afinidad (por ejemplo, etiqueta His, etiqueta GST, glutatión-S-transferasa, S-péptido, HA, Myc, FLAG™ (Sigma-Aldrich Co.), MBP, SUMO, y Proteína A) se pueden usar para la purificación o eliminación de los exosomas modificados genéticamente en la superficie con un agente de unión específico a la etiqueta de afinidad.

[000122] Las proteínas de fusión que tienen una actividad terapéutica también se pueden usar para generar exosomas modificados genéticamente en la superficie. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y un péptido

terapéutico. El péptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un péptido natural, un péptido recombinante, un péptido sintético o un enlazador a un compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico pueden ser nucleótidos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, o moléculas pequeñas. El péptido terapéutico puede ser un anticuerpo, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido antimicrobiano o un fragmento o una variante de este. En algunas modalidades, el péptido terapéutico es una proteína de unión de ácido nucleico. La proteína de unión al ácido nucleico puede ser Dicer, una proteína Argonauta, TRBP, o proteína de cubierta del bacteriófago MS2. En algunas modalidades, la proteína de unión al ácido nucleico comprende adicionalmente una o más moléculas de ARN o ADN. El uno o más ARN puede ser un miARN, ARNip, ARN guía, ARNlinc, ARNm, ARN antisentido, ARNcd, o combinaciones de estos.

[000123] En algunas modalidades, el péptido terapéutico es una parte de un sistema de interacción proteína-proteína. En algunas modalidades, el sistema de interacción de proteína-proteína comprende un sistema de interacción FRB-FKBP, por ejemplo, el sistema de interacción FRB-FKBP tal como se describe en Banaszynski et ál., J Am Chem Soc. 6 de abril de 2005; 127(13):4715-21.

[000124] Las proteínas de fusión se pueden dirigir a la superficie de exosomas y proporcionar una actividad terapéutica al exosoma. En algunas modalidades, la proteína de fusión no comprende IGSF8 o un fragmento o modificación de este.

[000125] En algunas modalidades, se usan las proteínas de fusión que tienen un resto de direccionamiento. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden comprender PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP o un fragmento o una variante de estos, y un resto de direccionamiento. El resto de direccionamiento se puede usar para dirigir el exosoma a un órgano, tejido o célula específico para un tratamiento usando el exosoma. En algunas modalidades, el resto de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos incluyen anticuerpos enteros, anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, fragmentos de estos, y además incluye anticuerpos de cadena simple, anticuerpos humanizados, anticuerpos murinos, anticuerpos monoclonales quiméricos, de ratón-humano, ratón-primate, primate-humano, anticuerpos anti-idiotipo, fragmentos de anticuerpos, tal como, por ejemplo, scFv, (scFv)2, Fab, Fab', y F(ab')2, F(ab1)2, Fv, dAb, y fragmentos de Fd,

diacuerpos, y polipéptidos relacionados con anticuerpos. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de este también incluyen anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos siempre y cuando exhiban la función o actividad biológica deseada.

[000126] En algunas modalidades, la proteína de fusión no comprende IGSF8 o un fragmento o modificación de este.

[000127] En algunas modalidades, los exosomas modificados genéticamente en la superficie descritos en la presente demuestran características superiores en comparación con los exosomas modificados genéticamente en la superficie conocidos en la técnica. Por ejemplo, los exosomas modificados genéticamente en la superficie producidos al usar las proteínas de exosoma nuevamente identificados proporcionados en la presente contienen proteínas modificadas más altamente enriquecidas en su superficie que exosomas en la técnica previa, por ejemplo, aquellos producidos usando proteínas de exosoma convencional. Además, los exosomas modificados genéticamente en la superficie de la presente invención pueden tener una mayor actividad biológica, más específica o más controlada en comparación con los exosomas conocidos en la técnica. Por ejemplo, un exosoma modificado en la superficie que comprende una secuencia exógena relevante terapéutica o biológicamente fusionada a una proteína de superficie de exosoma o un fragmento de este descrito en la presente (por ejemplo, PTGFRN o un fragmento de este) puede tener más de las características modificadas genéticamente deseadas que se fusionan a andamiajes conocidos en la técnica. Las proteínas de andamiaje conocidas en la técnica incluyen moléculas de tetraspanina (por ejemplo, CD63, CD81, CD9 y otros), proteína 2 de membrana asociada a lisosoma (LAMP2 y LAMP2B), receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), proteínas de anclaje de GPI, lactadherina y fragmentos de estos, y péptidos que tienen afinidad con cualquiera de estas proteínas o fragmentos de estos. Previamente, la sobreexpresión de proteínas exógenas contó con disposición estocástica o aleatoria de las proteínas exógenas sobre el exosoma para producir exosomas modificados genéticamente en la superficie. Esto tuvo como resultado una densidad no predecible de bajo nivel de las proteínas exógenas en los exosomas. Por lo tanto, las proteínas de superficie de exosoma y fragmentos de estos descritos en la presente proporcionan avances importantes en composiciones de exosomas novedosos y métodos para hacerlos.

[000128] En algunas modalidades, el exosoma modificado genéticamente en la superficie

que comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia exógena y una proteína de superficie de exosoma nuevamente identificada en la presente tiene una densidad mayor de la proteína de fusión que los exosomas modificados genéticamente de forma similar que comprenden una secuencia exógena conjugada a una proteína de exosoma convencional conocida en la técnica (por ejemplo, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI proteínas de anclaje, LAMP2 de lactadherina, y LAMP2B, un fragmento de estos, o un péptido que se une a estos. En algunas modalidades, dicha proteína de fusión que contiene una proteína de exosoma nuevamente identificada en la presente está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional. En algunas modalidades, dicha proteína de fusión que contiene una proteína de exosoma nuevamente identificada en la presente está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional.

[000129] En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando CD9. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando CD63. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando CD81. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor

en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando PDGFR. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando proteínas de anclaje GPI. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando lactadherina. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando LAMP2. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificadas usando LAMP2B. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando un fragmento de una proteína de exosoma convencional. En algunas modalidades, una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una variante de una proteína de exosoma convencional.

[000130] En modalidades particulares una proteína de fusión de PTGFRN, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de

exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de BSG, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares, una proteína de fusión de IGSF2, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de IGSF3, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de IGSF8, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares, una proteína de fusión de ITGB1, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de ITGA4, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma

similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de SLC3A2, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En modalidades particulares una proteína de fusión de transportador de ATP, una variante, un fragmento, una variante de un fragmento o una modificación de estos está presente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional (por ejemplo, una molécula de tetraspanina, como CD63). En algunas modalidades, dicha proteína de fusión que contiene una proteína de exosoma nuevamente identificada en la presente está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en la superficie de exosoma que las proteínas de fusión en otras superficies de exosoma similarmente modificado usando una proteína de exosoma convencional.

[000131] Las proteínas de fusión proporcionadas en la presente pueden comprender PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP, o un fragmento o una variante de estos, y un péptido adicional. El péptido adicional se puede unir a cualquiera el extremo N o el extremo C de la proteína de exosoma o un fragmento o una variante de este. El péptido adicional se puede ubicar dentro (en el lado luminal) o fuera del exosoma unido a la proteína de exosoma.

[000132] En algunas modalidades, las proteínas de fusión proporcionadas en la presente comprenden PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador de ATP, o un fragmento o una variante de estos, y dos péptidos adicionales. Dos de los dos péptidos adicionales se pueden unir a cualquiera el extremo N o el extremo C de la proteína de exosoma o un fragmento o una variante de este. En algunas modalidades, uno de los dos péptidos adicionales se une al extremo N y el otro de los dos péptidos adicionales se une al extremo C de la proteína de exosoma o un fragmento o una variante de este. Los péptidos adicionales se pueden ubicar dentro (en el lado luminal) o fuera del exosoma unido a la

proteína de exosoma, o ambos.

4.5. Célula productora para producción de exosomas modificados genéticamente en la superficie

[000133] Los exosomas de la presente invención se pueden producir desde una célula cultivada in vitro o un fluido corporal de un sujeto. Cuando los exosomas se producen de cultivo celular in vitro, varias células productoras, por ejemplo, células HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO), o las células madre mesenquimales (MSC), se pueden usar para la presente invención.

[000134] La célula productora puede ser genéticamente modificada para comprender una o más secuencias exógenas para producir exosomas modificados genéticamente en la superficie. La célula productora modificada genéticamente puede contener la secuencia exógena introducida por transformación transitoria o estable. La secuencia exógena puede ser introducida a la célula productora como un plásmido. Las secuencias exógenas pueden ser establemente integradas en un secuencia genómica de la célula productora, en un sitio dirigido o en un sitio aleatorio. En algunas modalidades, una línea celular estable se genera para la producción de exosomas modificados genéticamente en la superficie.

[000135] Las secuencias exógenas se pueden insertar en una secuencia genómica de la célula productora, ubicada dentro, corriente arriba (extremo 5') o corriente abajo (extremo 3') de una secuencia endógena que codifica la proteína de exosoma. Varios métodos conocidos en la técnica se pueden usar para la introducción de las secuencias exógenas en la célula productora. Por ejemplo, las células modificadas mediante el uso de varios métodos de edición de genes (por ejemplo, métodos que usan un sistema mediado por transposones, de recombinación homólogo, sistema loxP-Cre, CRISPR/Cas9 o TALEN) se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

[000136] Las secuencias exógenas pueden comprender una secuencia que codifica la proteína de exosoma o una variante o un fragmento de la proteína de exosoma. Una copia extra de la secuencia que codifica la proteína de exosoma se puede introducir para producir un exosoma modificado genéticamente en la superficie que tiene la proteína de exosoma a una densidad mayor. Una secuencia exógena que codifica una variante o un fragmento de la proteína de exosoma se puede introducir para producir un exosoma modificado genéticamente en la superficie que contiene la modificación o el fragmento de la proteína de exosoma. Una

secuencia exógena que codifica una etiqueta de afinidad se puede introducir para producir un exosoma modificado genéticamente en la superficie que contiene una proteína de fusión que comprende la etiqueta de afinidad unida a la proteína de exosoma.

[000137] En algunas modalidades, un exosoma modificado genéticamente en la superficie tiene una densidad mayor de la proteína de exosoma que los exosomas nativos aislados de los mismos tipos de células productoras o similares. En algunas modalidades, dicha proteína de exosoma está presente a 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que dicho exosoma nativo. En algunas modalidades, dicha proteína de exosoma está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que dicho exosoma nativo. En algunas modalidades, una proteína de fusión que comprende la proteína de exosoma está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que la proteína de exosoma no modificado en dicho exosoma nativo. En algunas modalidades, un fragmento o una variante de la proteína de exosoma está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que la proteína de exosoma no modificado en dicho exosoma nativo.

[000138] En modalidades particulares, PTGFRN, un fragmento o una variante de PTGFRN, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el PTGFRN no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, BSG, un fragmento o una variante de BSG, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el BSG no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, IGSF2, un fragmento o

una variante de IGSF2, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el IGSF2 no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, IGSF3, un fragmento o una variante de IGSF3, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el IGSF3 no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, ITGB1, un fragmento o una variante de ITGB1, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el ITGB1 no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, ITGA4, un fragmento o una variante de ITGA4, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el ITGA4 no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, SLC3A2, un fragmento o una variante de SLC3A2, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el SLC3A2 no modificado en dicho exosoma nativo. En modalidades particulares, el transportador de ATP, un fragmento o una variante del transportador de ATP, o una modificación de este está presente de 2 a 4 veces, 4 a 8 veces, 8 a 16 veces, 16 a 32 veces, 32 a 64 veces, 64 a 100 veces, 100 a 200 veces, 200 a 400 veces, 400 a 800 veces, 800 a 1000 veces o a una densidad mayor en dicho exosoma modificado genéticamente en la superficie que el transportador de ATP no modificado en dicho exosoma nativo.

[000139] En algunas modalidades, la célula productora está modificada adicionalmente para comprender una secuencia exógena adicional. Por ejemplo, una secuencia exógena adicional se puede introducir para modular la expresión génica endógena, o producir un

exosoma que incluye un determinado polipéptido como una carga. En algunas modalidades, la célula productora está modificada para comprender dos secuencias exógenas, una que codifica la proteína de exosoma o una variante o un fragmento de la proteína de exosoma, y el otro que codifica una carga. En algunas modalidades, la célula productora se puede modificar adicionalmente para comprender una secuencia exógena adicional que confiere funcionalidades adicionales a los exosomas, por ejemplo, capacidades de direccionamiento específico, funciones de administración, funciones enzimáticas, semivida aumentada o disminuida in vivo, etc. En algunas modalidades, la célula productora está modificada para comprender dos secuencias exógenas, una que codifica la proteína de exosoma o una variante o un fragmento de la proteína de exosoma, y el otro que codifica una proteína que confiere las funcionalidades adicionales a los exosomas.

[000140] En algunas modalidades, la célula productora se modifica para comprender dos secuencias exógenas, cada una de las dos secuencias exógenas que codifica una proteína de fusión en la superficie de exosoma. En algunas modalidades, un exosoma modificado genéticamente en la superficie de la célula productora tiene una densidad mayor de una proteína de exosoma en comparación con los exosomas nativos aislados de una célula no modificada del mismo tipo de célula o similar. En algunas modalidades, el exosoma modificado genéticamente en la superficie contiene una proteína de exosoma a una densidad de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 400, 800, 1.000 veces o mayor que un exosoma nativo aislado de una célula no modificada del mismo tipo de célula o similar. En algunas modalidades, la célula productora está adicionalmente modificada para comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más secuencias exógenas adicionales.

[000141] Más específicamente, los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir a partir de una célula transformada con una secuencia que codifica una o más proteínas de superficie de exosomas o una variante de estas que incluye, de modo no taxativo, (1) regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), (2) basigina (BSG), (3) miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3), (4) miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8), (5) integrina beta-1 (ITGB1), (6) integrina alfa-4 (ITGA4), (7) 4F2 cadena pesada de antígeno de superficie celular (SLC3A2), (8) una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), y (9) miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2).

Cualquiera una o más proteínas de superficie de exosoma descritas en la presente se pueden expresar en la célula productora de un plásmido, una secuencia exógena insertada en el genoma u otro ácido nucleico exógeno tal como un ARN mensajero sintético (ARNm).

[000142] En algunas modalidades, la una o más proteínas de superficie de exosoma se expresa en una célula transformada con una secuencia exógena que codifica su forma endógena de longitud completa. En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de PTGFRN de la SEQ ID NO: 1 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de BSG de la SEQ ID NO: 9 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de IGSF8 de la SEQ ID NO: 14 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de IGSF3 de la SEQ ID NO: 20 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ITGB1 de la SEQ ID NO: 21 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ITGA4 de la SEQ ID NO: 22 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de SLC3A2 de la SEQ ID NO: 23 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP1A1 de la SEQ ID NO: 24 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP1A2 de la SEQ ID NO: 25 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP1A3 de la SEQ ID NO: 26 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP1A4 de la SEQ ID NO: 27 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP1B3 de la SEQ ID NO: 28 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP2B1 de la SEQ ID NO: 29 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP2B2 de la SEQ ID NO: 30 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP2B3 de la SEQ ID NO: 31 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de ATP2B4 de la SEQ ID NO: 32 En algunas modalidades, tal secuencia exógena codifica la proteína de IGSF2 de la SEQ ID NO: 34

[000143] Los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir a partir de una célula transformada con una secuencia que codifica un fragmento de una o más proteínas de superficie de exosoma que incluye, de modo no taxativo, (1) regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), (2) basigina (BSG), (3) miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3), (4) miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8), (5) integrina beta-1 (ITGB1), (6) integrina alfa-4 (ITGA4), (7) 4F2 cadena pesada de

antígeno de superficie celular (SLC3A2), (8) una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), y (9) miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2). En algunas modalidades, la secuencia codifica un fragmento de la proteína de superficie de exosoma que le falta al menos 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, o 800 aminoácidos del extremo N de la proteína nativa. En algunas modalidades, la secuencia codifica un fragmento de la proteína de superficie de exosoma que le falta al menos 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, o 800 aminoácidos del extremo C de la proteína nativa. En algunas modalidades, la secuencia codifica un fragmento de la proteína de superficie de exosoma que le falta al menos 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, o 800 aminoácidos de ambos el extremo N y el extremo C de la proteína nativa. En algunas modalidades, la secuencia codifica un fragmento de la proteína de superficie de exosoma a la que le falta uno o más dominios estructurales o funcionales de la proteína nativa.

[000144] En algunas modalidades, el fragmento de la proteína de superficie de exosoma se fusiona a una o más proteínas heterólogas. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo N del fragmento. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo C del fragmento. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo N y al extremo C del fragmento. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas son proteínas de mamífero. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas son proteínas humanas.

[000145] Los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir desde una célula transformada con una secuencia que codifica fragmentos de PTGFRN. En algunas modalidades, a los fragmentos de PTGFRN les falta uno o más dominios funcionales o estructurales, tal como IgV. Por ejemplo, el fragmento de PTGFRN pueden comprender un polipéptido de la SEQ ID NO: 2-7, o 33. En algunas modalidades, los fragmentos de PTGFRN se fusionan a una o más proteínas heterólogas. La una o más proteínas heterólogas se pueden fusionar al extremo N de dichos fragmentos PTGFRN. La una o más proteínas heterólogas se pueden fusionar al extremo C de dichos fragmentos PTGFRN. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas a ambos el extremo N y el extremo C de dichos fragmentos PTGFRN. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es

una proteína mamífera. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína humana. En algunas modalidades, dicha proteína heteróloga fusionada a dicho fragmento PTGFRN adicionalmente contiene un péptido de secuencia de señal. El péptido de secuencia de señal puede ser un polipéptido de la SEQ ID NO: 8

[000146] Los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir desde una célula transformada con una secuencia que codifica fragmentos de Basigina. En algunas modalidades, a los fragmentos de Basigina les falta uno o más dominios funcionales o estructurales, tal como IgV. Por ejemplo, los fragmentos de Basigina pueden comprender un polipéptido de la SEQ ID NO: 10-12. En algunas modalidades, los fragmentos de Basigina se fusionan a una o más proteínas heterólogas. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo N de dichos fragmentos de Basigina. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo C de dichos fragmentos de Basigina. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas a ambos el extremo N y el extremo C de dichos fragmentos de Basigina. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína mamífera. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína humana. En algunas modalidades, dicha proteína heteróloga fusionada a dicho fragmento de Basigina adicionalmente contiene un péptido de secuencia de señal. El péptido de secuencia de señal puede ser un polipéptido de la SEQ ID NO: 13

[000147] Los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir desde una célula transformada con una secuencia que codifica fragmentos de IGSF8. En algunas modalidades, a los fragmentos de IGSF8 les falta uno o más dominios funcionales o estructurales, tal como IgV. Por ejemplo, los fragmentos de IGSF8 pueden comprender un polipéptido de la SEQ ID NO: 15-18. En algunas modalidades, los fragmentos de IGSF8 se fusionan a una o más proteínas heterólogas. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo N de dichos fragmentos de IGSF8. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo C de dichos fragmentos de IGSF8. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas a ambos el extremo N y el extremo C de dichos fragmentos de IGSF8. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína mamífera. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína humana. En algunas modalidades, dicha proteína

heteróloga fusionada a dicho fragmento de IGSF8 adicionalmente contiene un péptido de secuencia de señal. El péptido de secuencia de señal puede ser un polipéptido de la SEQ ID NO: 19

[000148] Los exosomas modificados genéticamente en la superficie se pueden producir desde una célula transformada con una secuencia que codifica fragmentos de IGSF2. En algunas modalidades, a los fragmentos de IGSF2 les falta uno o más dominios funcionales o estructurales, tal como IgV. En algunas modalidades, los fragmentos de IGSF2 se fusionan a una o más proteínas heterólogas. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo N de dichos fragmentos de IGSF2. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas al extremo C de dichos fragmentos de IGSF2. En algunas modalidades, la una o más proteínas heterólogas están fusionadas a ambos el extremo N y el extremo C de dichos fragmentos de IGSF2. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína mamífera. En algunas modalidades, la proteína heteróloga es una proteína humana. En algunas modalidades, dicha proteína heteróloga fusionada a dicho fragmento de IGSF2 adicionalmente contiene un péptido de secuencia de señal. El péptido de secuencia de señal puede ser un polipéptido de la SEQ ID NO: 35

[000149] En algunas modalidades, los exosomas modificados genéticamente en la superficie comprenden un polipéptido de una secuencia idéntica o similar a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo que incluye, de modo no taxativo, (1) regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), (2) basigina (BSG), (3) miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3), (4) miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8), (5) integrina beta-1 (ITGB1), (6) integrina alfa-4 (ITGA4), (7) 4F2 cadena pesada de antígeno de superficie celular (SLC3A2), (8) una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), y (9) miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2). En algunas modalidades, dicho péptido es 50 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 50 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 60 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 60 % idéntico a la SEQ ID NO: 1- 34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 70 % idéntico a

una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 70 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 80 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 80 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 90 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 1- 34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 95 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 95 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 99 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34. En algunas modalidades, dicho polipéptido es 99,9 % idéntico a una longitud completa o un fragmento de una proteína de superficie de exosoma nativo, por ejemplo, 99,9 % idéntico a la SEQ ID NO: 1-34.

4.6 Purificación de afinidad

[000150] Algunas modalidades de la presente invención se refieren al aislamiento, purificación y subfraccionamiento de exosomas usando una interacción de unión específica entre una proteína enriquecida en la membrana de exosoma y un agente de unión inmovilizado. Estos métodos generalmente comprenden las etapas de (1) aplicar o cargar una muestra que comprende exosomas, (2) opcionalmente lavar los componentes de la muestra no unida usando amortiguadores apropiados que mantienen la interacción de unión entre las proteínas objetivo de los exosomas y agentes de unión, y (3) eludir (disociar y recuperar) los exosomas de los agentes de unión inmovilizados al alterar las condiciones de amortiguador para que la interacción de unión ya no ocurra.

[000151] Algunas modalidades se refieren a un método para quitar exosomas de una muestra usando una interacción de unión específica entre una proteína enriquecida en la membrana de exosoma y un agente de unión inmovilizado. En los casos, los exosomas unidos al agente de unión no son eluidos del agente de unión y se puede recolectar una fracción que no se une al agente de unión. El método se puede usar para purificar una muestra que comprende exosomas y un material no exosomal tal como varios virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, virus adeno-asociado, o cualquier otro virus con envoltura o sin envoltura) o una proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpos, enzimas u otros polipéptidos), donde los

exosomas son partículas contaminantes. Los exosomas unidos se pueden retener unidos al agente de unión y el material no exosomal se recolecta, sustancialmente libre de exosomas.

[000152] La proteína objetivo, usada para este aislamiento, la purificación, proceso de subfraccionamiento o eliminación, puede ser una proteína endógena producida del genoma de una célula productora, una proteína introducida a la célula productora mediante una modificación genética, o una proteína modificada por métodos químicos, físicos u otros métodos biológicos. En algunos casos, la proteína es una proteína no mutante o una proteína mutante, por ejemplo, una variante o un fragmento de una proteína endógena. En algunos casos, la proteína es una proteína de fusión.

[000153] Varios agentes de unión que tienen afinidad con la proteína objetivo se pueden usar para las modalidades de la presente invención. Por ejemplo, proteínas, péptidos, y moléculas pequeñas con afinidades específicas con la proteína objetivo se pueden usar como un agente de unión. En algunas modalidades, los agentes de unión se obtienen de fuentes orgánicas o inorgánicas. Ejemplos de agentes de unión de fuentes orgánicas incluyen proteínas de suero, lectinas o anticuerpos. Ejemplos de agentes de unión de fuentes inorgánicas incluyen ácidos borónicos, quelatos de metal, y tintas de triazina.

[000154] Los agentes de unión se pueden inmovilizar químicamente o acoplar a un soporte sólido para que los exosomas que tienen afinidad específica al agente de unión se unan. Se pueden usar varias formas de soporte sólido, por ejemplo, una esfera de agarosa porosa, una placa de microtitulación, una esfera magnética o una membrana. En algunas modalidades, el soporte sólido forma una columna de cromatografía y se puede usar para la cromatografía de afinidad de los exosomas.

[000155] En algunos casos, el aislamiento, purificación, subfraccionamiento y eliminación de exosomas se realizan mediante cromatografía en columna usando una columna donde los agentes de unión y el soporte sólido se empacan. En algunas modalidades, una muestra que contiene exosomas se pasa por la columna para permitir la sedimentación, un amortiguador de lavado se pasa por la columna, y el amortiguador de elución es posteriormente aplicado a la columna y recolectado. Estas etapas se pueden realizar a presión ambiente o con aplicación de presión adicional.

[000156] En algunos casos, el aislamiento, purificación, subfraccionamiento y eliminación de exosomas se realiza usando un tratamiento de lote. Por ejemplo, una muestra se agrega al

agente de unión unido a un soporte sólido en un recipiente, al mezclar, separar el soporte sólido, quitar la fase líquida, lavar, centrifugar, agregar el amortiguador de elución, volver a centrifugar y quitar el eluido.

[000157] En algunos casos, se puede emplear un método híbrido. Por ejemplo, se agrega una muestra al agente de unión unido a un soporte sólido en un recipiente, el soporte sólido unido a los exosomas posteriormente se empaqueta en una columna, y se realiza lavado y elución en la columna.

[000158] En algunos casos, el aislamiento, purificación, subfraccionamiento y eliminación de exosomas se realiza usando un agente de unión unido a las placas de microtitulación, esferas magnéticas o membranas. En los casos, una muestra se agrega al agente de unión unido a un soporte sólido, seguido por las etapas de mezclar, separar el soporte sólido, quitar la fase líquida, lavar, quitar el amortiguador de lavado, agregar el amortiguador de elución, y quitar el eluido.

[000159] La unión entre el agente de unión y una proteína objetivo en el exosoma se realiza en varias condiciones fisiológicas óptimas para interacciones específicas entre el agente de unión y la proteína objetivo en el exosoma. La elución de los exosomas unidos se puede lograr al cambiar las concentraciones de sal, pH, pI, carga y fuerza iónica directamente o a través de un gradiente.

[000160] En algunas modalidades, una muestra aislada, purificada o subfraccionada con un agente de unión es procesada posteriormente con un agente de unión diferente.

[000161] En algunas modalidades, más de una columna se usa en serie, donde cada una de las columnas múltiples contiene un agente de unión diferente específico a una proteína objetivo diferente.

[000162] En algunas modalidades, una sola columna contiene múltiples agentes de unión, cada uno específico a una proteína objetivo diferente.

[000163] En algunos casos, el agente de unión y el soporte sólido se vuelven a usar mediante introducción de una etapa de higienización periódica. Por ejemplo, se pueden higienizar con una combinación de propilenglicol, isopropanol, fuerza iónica alta, y/o hidróxido de sodio.

4.6.1. Preparación de muestras

[000164] Los métodos descritos en la presente se pueden usar para purificar, aislar,

subfraccionar o quitar exosomas de varias muestras que comprenden exosomas. En algunas modalidades, la muestra es un material de cultivo aclarado que contiene exosomas. En algunos casos, la muestra comprende exosomas parcialmente purificadas mediante un método de purificación conocido en la técnica. Por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrofóbica, filtración profunda, o cromatografía de intercambio iónico de unión/elución se pueden usar para purificar parcialmente los exosomas antes de aplicar a un agente de unión para la purificación de afinidad.

[000165] En algunos casos, el material parcialmente purificado es procesado adicionalmente para que tenga determinadas condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH, temperatura, concentración de sal, tipo de sal, polaridad) para la interacción deseada con el agente de unión. Se puede preparar una muestra mediante dilución o concentración para obtener determinadas concentraciones de exosomas, o al agregar excipientes para cambiar la estructura de los exosomas. En algunos casos, el material parcialmente purificado se aplica al agente de unión sin ninguna manipulación.

4.6.2. Unión

[000166] Los métodos descritos en la presente requieren interacción específica entre una proteína objetivo de un exosoma y un agente de unión. El barrido de alto rendimiento se puede realizar para identificar condiciones de amortiguador ideales para la unión específica – a través de alteración de la concentración de sal, pH, y/o reducción de la polaridad con un modificador orgánico, etilenglicol, propilenglicol, o urea. La interacción entre una proteína objetivo y un agente de unión también puede cambiar dependiendo de las condiciones de muestra (por ejemplo, cantidad de muestra cargada por volumen de resina cromatográfica, concentración de exosomas, concentración de impurezas), amortiguadores de carga (por ejemplo, pH, concentraciones de sal, tipos de sal, polaridad), y otras condiciones físicas (por ejemplo, temperatura). Además, agregar excipientes que alteran la estructura de los exosomas también puede cambiar sus interacciones. Además, el tiempo de residencia se puede ajustar basándose en velocidades de adsorción diferencial entre impurezas y exosomas. Por lo tanto, varias condiciones de purificación descritas en la presente se pueden evaluar para identificar las condiciones ideales para la etapa.

[000167] Enfoques similares se pueden usar para mejorar la pureza y rendimiento, y

ayudar a enriquecer, agotar o aislar subpoblaciones de exosomas. Estas propiedades, junto con la maximización del desafío de carga y la aplicación de condiciones de elución más rigurosas, podrían emplearse para aumentar adicionalmente la concentración de exosomas.

4.6.3. Elución

[000168] La elución de exosomas se puede lograr a través de alteración de la concentración de sal, pH, y/o polaridad con un modificador orgánico, etilenglicol, propilenglicol o urea.

[000169] La elución selectiva de exosomas se puede lograr al aumentar la concentración de una sal de haluro catiónico monovalente (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de sodio, cloruro de litio, yoduro de sodio, bromuro de potasio, bromuro de litio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de litio, yoduro de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de litio, y yoduro de potasio), una sal divalente o trivalente (por ejemplo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, tricloruro de cromo, sulfato de cromo, citrato de sodio, cloruro de hierro (III), cloruro de itrio (III), fosfato de potasio, sulfato de potasio, fosfato de sodio, cloruro ferroso, citrato de calcio, fosfato de magnesio y cloruro férrico), o una combinación de estos, en el amortiguador de elución, a través del uso de una gradiente en aumento (en etapa o lineal) de una sal de haluro catiónico monovalente (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de sodio, cloruro de litio, yoduro de sodio, bromuro de potasio, bromuro de litio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de litio, yoduro de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de litio, y yoduro de potasio), una sal divalente o trivalente (por ejemplo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, tricloruro de cromo, sulfato de cromo, citrato de sodio, cloruro de hierro (III), cloruro de itrio (III), fosfato de potasio, sulfato de potasio, fosfato de sodio, cloruro ferroso, citrato de calcio, fosfato de magnesio, y cloruro férrico), o una combinación de estos, a un pH fijo.

[000170] La pureza de exosoma sustancial se puede lograr al fluir a través de impurezas durante la fase de carga de columna, eluyendo impurezas durante los lavados de excipiente selectivos y eluyendo producto de forma selectiva durante la elución mientras se dejan impurezas adicionales unidas a la columna. La absorbancia medida de eluidos de columna puede identificar la purificación de exosomas obtenidas por los métodos.

[000171] La elución también se puede lograr al modular el intervalo de pH, sales,

solventes orgánicos, moléculas pequeñas, detergentes, zwiteriones, aminoácidos, polímeros, temperatura, y cualquier combinación de lo antemencionado. Los agentes de elución similares se pueden usar para mejorar la pureza, mejorar el rendimiento y aislar las subpoblaciones de exosomas.

[000172] La elución también se puede realizar con múltiples amortiguadora de elución que tienen diferentes propiedades, tal como pH, sales, solventes orgánicos, moléculas pequeñas, detergentes, zwiteriones, aminoácidos, polímeros, temperatura, y cualquier combinación de lo antemencionado. Una pluralidad de fracciones eluidas se pueden recolectar, donde los exosomas recolectados en cada fracción tienen diferentes propiedades. Por ejemplo, los exosomas recolectados en una fracción tienen una pureza mayor, un tamaño promedio más pequeño o más grande, una composición preferida, etc. que los exosomas en otras fracciones.

[000173] Los amortiguadores de elución con diferentes propiedades se pueden aplicar como un flujo continuo, mientras que una pluralidad de fracciones eluidas se recolectan. Las fracciones eluidas se pueden recolectar durante la elución isocrática o la elución de gradiente. Una vez que se recolecta al menos una fracción eluida, se puede analizar una composición de la fracción eluida. Por ejemplo, la concentración de exosomas, una proteína de célula hospedadora, una proteína contaminante, ADN, carbohidratos, o lípidos se pueden medir en cada fracción eluida. Otras propiedades de exosomas en cada fracción eluida también se puede medir. Las propiedades incluyen un tamaño promedio, una densidad de carga promedio, y otras propiedades fisiológicas relacionadas con la biodistribución, absorción celular, semivida, farmacodinámica, potencia, dosificación, respuesta inmunitaria, eficiencia de carga, estabilidad, o reactividad a otros compuestos.

4.6.2.2. Lavado

[000174] Opcionalmente, la pureza de los exosomas pueden adicionalmente ser mejorados al lavar muestras antes de la elución. En algunas modalidades, el excipiente puede ser un amortiguador de lavado. El excipiente puede ser una solución que tiene intervalos de pH específicos, sales, solventes orgánicos, moléculas pequeñas, detergentes, zwiteriones, aminoácidos, polímeros, y cualquier combinación de lo antemencionado.

[000175] Más específicamente, el excipiente puede comprender arginina, lisina, glicina, histidina, calcio, sodio, litio, potasio, yoduro, magnesio, hierro, cinc, manganeso, urea,

propilenglicol, aluminio, amonio, polietilenglicol de guanidio, EDTA, EGTA, un detergente, cloruro, sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos siálicos, fosfato, acetato, glicina, borato, formiato, perclorato, bromuro, nitrato, ditiotreitol, mercaptoetanol beta, o fosfato de tri-n-butilo.

[000176] El excipiente puede también comprender un detergente, que se selecciona del grupo que consiste en cloruro de cetiltrimetilamonio, octoxinol-9, TRITONTM X-100 (es decir, polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter) y TRITONTM CG-110 disponible de Sigma-Aldrich; dodecil sulfato de sodio; lauril solfato de sodio; ácido deoxicólico; Polisorbato 80 (es decir, sorbitán monooleato de polioxietileno (20)); Polisorbato 20 (es decir, sorbitán monolaurato de Polioxietileno (20)); etoxilato de alcohol; éter de polietilenglicol de alquilo; glucósido de decilo; octoglucósidos; SafeCare; ECOSURF™ EH9, ECOSURF™ EH6, ECOSURF™ EH3, ECOSURF™ SA7, y ECOSURF™ SA9 disponible de DOW Chemical; LUTENSOL™ M5, LUTENSOL™ XL, LUTENSOL™ XP y APG™ 325N disponible de BASF; TOMADOL™ 900 disponible de AIR PRODUCTS; NATSURF™ 265 disponible de CRODA; SAFECARE™1000 disponible de Bestchem, TERGITOL™ L64 disponible de DOW; ácido caprílico; CHEMBETAINE™ LEC disponible de Lubrizol; y Mackol DG.

4.6.3. Otros métodos para mejorar el resultado

[000177] La cantidad de exosomas que se pueden cargar por volumen de resina cromatográfica se puede mejorar la modular el material de suministro, por ejemplo, al aumentar la concentración de exosomas, disminuir la concentración de impurezas, alterar el pH, disminuir las concentraciones de sal, disminuir la fuerza iónica, o alterar las subpoblaciones específicas de exosomas. Debido a las limitaciones de la transferencia de masa y la lenta adsorción y desorción de exosomas en la resina, la cantidad de exosomas que se pueden cargar por volumen de resina cromatográfica se puede aumentar al ralentizar la velocidad de flujo durante la carga de la columna, empleando columnas más largas para aumentar el tiempo de residencia.

4.7 Aplicaciones

4.7.1 Purificación de exosomas

[000178] El uso de exosomas para fines médicos requiere que los exosomas sean libres o mayormente libres de impurezas que incluyen de modo no taxativo macromoléculas, tales como proteínas contaminantes de ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, metabolitos, moléculas pequeñas, metales o una combinación de estos. La presente invención proporciona

un método para purificar los exosomas de contaminar macromoléculas. En algunas modalidades, los exosomas purificados están sustancialmente libres de macromoléculas contaminantes.

4.7.2. Subfraccionamiento de exosomas

[000179] Las modalidades de la presente invención proporcionan además métodos para el subfraccionamiento de poblaciones de exosomas basados en su proteína de membrana, tamaño, densidad de carga, tipo de ligando (por ejemplo, tetraspaninas) y heparina u otros sitios de unión al carbohidrato sulfatado. La elección de la etiqueta de afinidad, carga y composiciones y protocolos de amortiguador de elución puede tener como resultado la elución de diferentes subpoblaciones de exosomas.

[000180] Por ejemplo, las modalidades de la presente invención proporcionan métodos para purificar una población de exosomas con un tamaño más pequeño o más grande. El tamaño de los exosomas se puede determinar a través de métodos disponibles en el campo. Por ejemplo, el tamaño se puede medir mediante análisis de rastreo de nanopartículas, dispersión de luz a múltiples ángulos, dispersión de luz a un solo ángulo, cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación analítica, fraccionamiento de flujo de campo, difracción láser, detección de pulso resistivo ajustable o dispersión de luz dinámica.

[000181] Las modalidades de la presente invención se refieren adicionalmente a métodos para subfraccionar exosomas basados en su densidad de carga. La densidad de carga de los exosomas se puede determinar mediante titulación potentiométrica, intercambio aniónico, intercambio catiónico, enfoque isoeléctrico, potencial Zeta, electroforesis capilar, electroforesis de la zona capilar, electroforesis en gel.

[000182] Las modalidades de la presente invención también se refieren al subfraccionamiento de los exosomas basado en otras propiedades fisiológicas, tal como la biodistribución, absorción celular, semivida, farmacodinámica, potencia, dosificación, respuesta inmunitaria, eficiencia de carga, estabilidad, o reactividad a otros compuestos. El método permite el aislamiento de una población de exosomas que son apropiados para una aplicación específica.

4.8. Caracterización de exosomas.

[000183] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden además la etapa de caracterizar los exosomas contenidos en cada fracción recolectada. En

algunas modalidades, los contenidos de los exosomas se pueden extraer para su estudio y caracterización. En algunas modalidades, los exosomas están aislados y caracterizados por métrica que incluye, de modo no taxativo, tamaño, forma, morfología o composiciones moleculares tales como ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos y lípidos.

4.8.1. Medición de los contenidos de los exosomas

[000184] Los exosomas pueden incluir proteínas, péptidos, ARN, ADN y lípidos. El ARN total se puede extraer usando extracción de ácido-fenol:cloroformo. El ARN se puede purificar luego usando un filtro de fibra de vidrio en condiciones que recuperan el ARN pequeño que contiene el ARN total, o que separa especies de ARN pequeños de menos de 200 nucleótidos de longitud de las especies de ARN más largas tal como ARNm. Dado que el ARN se eluye en un volumen pequeño, puede que no se necesite una etapa de precipitación de alcohol para el aislamiento del ARN.

[000185] Las composiciones de exoma se pueden evaluar mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen, de modo no taxativo, transcriptómica, secuenciación, proteómica, espectrometría de masas, o HP-LC.

[000186] La composición de los nucleótidos asociados con los exosoma aislados (que incluyen ARN o AND) se pueden medir usando una variedad de técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, RT-PCR cuantitativo o semicuantitativo, análisis de transferencia Northern, detección de hibridación de solución). En una modalidad particular, el nivel de al menos un ARN se mide mediante ARN de transcripción inversa de la composición de exosomas para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos objetivo, que hibridan los oligodesoxinucleótidos objetico a uno o más oligonucleótidos de sonda específicos de ARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos de sonda específicos de ARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la composición de exosoma, y que compara el perfil de hibridación de composición de exosoma a un perfil de hibridación generado de una muestra de control. Una alteración en la señal de al menos un ARN en la muestra de prueba respecto a la muestra de control indica la composición de ARN.

[000187] Además, una micromatriz se puede preparar a partir de sondas de oligonucleótidos específicas de genes generadas a partir de secuencias de ARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas de oligonucleótidos diferentes para cada ARN, una que contenga la secuencia madura activa y la otra que sea específica para el precursor del ARN

(por ejemplo miARN y pre-miARN). La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieran de los ortólogos humanos solo en algunas bases, que pueden actuar como controles para las condiciones de rigurosidad de hibridación. Los ARNt y otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies también se pueden imprimir en el microchip, lo que proporciona un control positivo interno, relativamente estable, para la hibridación específica. También se pueden incluir en el microchip uno o más controles apropiados para la hibridación no específica. Con este fin, se seleccionan secuencias basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier ARN conocido.

[000188] La micromatriz se puede fabricar utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos de sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican con 5'-amina en la posición C6 y se imprimen en portaobjetos activados utilizando sistemas de micromatriz comercialmente disponibles, por ejemplo, GeneMachine OmniGrid™ 100 Microarrayer y Amersham CodeLink.TM. El oligómero de ADNc marcado que corresponde a los ARN diana se prepara mediante transcripción inversa del ARN diana con el cebador marcado. Después de la síntesis de primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc objetivos etiquetados así preparados luego se hibridan al chip de micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo, 6 veces. SSPE/30 % formamida a 25° C. durante 18 horas, seguido por lavado en 0.75. veces. TNT a 37 °C durante 40 minutos. En las posiciones en la matriz en donde el ADN de sonda inmovilizada reconoce un ADNc diana complementario en la muestra, se produce la hibridación. El ADNc objetivo marcado indica la posición exacta en la matriz en donde se produce la unión, lo que permite la detección automática y la cuantificación. El resultado consiste en una lista de eventos de hibridación, lo que indica la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas y, por ende, la abundancia relativa de los ARN complementarios correspondientes, en la preparación del exosoma. De acuerdo con una modalidad, el oligómero de ADNc etiquetado es un ADNC etiquetado con biotina, preparado a partir de un cebador etiquetado con biotina. La micromatriz luego se procesa mediante detección directa de la biotina que contiene transcripciones usando, por ejemplo, conjugado de estreptavidina-Alexa647, y se barre usando métodos de barrido convencionales. Las intensidades de las imágenes de cada mancha en la matriz son proporcionales a la abundancia del ARN correspondiente en el exosoma.

[000189] El trabajo de extracción de datos es completado mediante bioinformática, que incluye chips de barrido, adquisición de señal, procesamiento de imágenes, normalización, tratamiento estadístico y comparación de datos así como análisis de pasajes. Como tal, la micromatriz puede perfilar cientos y miles de polinucleótidos de forma simultánea con desempeño de alto rendimiento. El análisis de perfilado de micromatrices de expresión de ARNm ha proporcionado de forma exitosa datos valiosos para los estudios de expresión génica en investigación básica. Y la técnica se ha puesto adicionalmente en práctica en la industria farmacéutica y en diagnóstico clínico. Dado que cantidades en aumento de datos de ARNmi se han vuelto disponibles, y con evidencia que se acumula de la importancia de ARNmi en la regulación génica, los micromatrices se vuelven una técnica útil para los estudios de ARNmi de alto rendimiento. El análisis de los niveles de ARNmi que usan sondas de polinucleótidos se pueden llevar a cabo en una variedad de formatos físicos también. Por ejemplo, el uso de las placas de microtitulación o automatización se pueden usar para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de prueba.

4.8.2 Medición del tamaño de los exosomas

[000190] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden medir el tamaño de los exosomas y/o las poblaciones de exosomas incluidos en las fracciones purificadas. En algunas modalidades, el tamaño del exosoma se mide como la dimensión medible más larga. Generalmente, la dimensión general más larga de un exosoma también es referida como su diámetro.

[000191] El tamaño del exosoma se puede medir usando varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de rastreo de nanopartículas, dispersión de luz a múltiples ángulos, dispersión de luz a un solo ángulo, cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación analítica, fraccionamiento de flujo de campo, difracción láser, detección de pulso resistivo ajustable o dispersión de luz dinámica.

[000192] El tamaño del exosoma se puede medir usando dispersión de luz dinámica (DLS) y/o dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS). Los métodos para usar DLS y/o MALS para medir el tamaño de los exosomas son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen el ensayo de rastreo de nanopartícula (NTA, por ejemplo, usando un dispositivo de rastreo de nanopartícula Malvern Nanosight NS300). En una modalidad específica, el tamaño del exosoma es determinado usando un Malvern NanoSight NS300. En algunas modalidades,

los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern NanosightNS300). En otras modalidades, los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern NanosightNS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern Nanosight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern Nanosight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern Nanosight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40- 1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern NS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern Nanosight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por NTA (por ejemplo, mediante el uso de un Malvern Nanosight NS300).

[000193] El tamaño del exosoma se puede medir usando detección de pulso resistivo ajustable (TRPS). En una modalidad específica, el tamaño del exosoma tal como se mide mediante TRPS se determina usando un iZON qNANO Gold. En algunas modalidades, los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de

alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por TRPS (por ejemplo, mediante el uso de un iZON qNano Gold).

[000194] El tamaño del exosoma se puede medir usando microscopía electrónica. En algunas modalidades, el método de microscopía de electrones usada para medir el tamaño de exosomas es la microscopía de electrones de transmisión. En una modalidad específica, el microscopio de electrones de transmisión usado para medir el tamaño del exosoma es un Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN. Los métodos para medir el tamaño del exosoma usando un microscopio de electrones son conocidos por los expertos en la técnica, y cualquiera de tales métodos pueden ser apropiados para medir el tamaño del exosoma. En algunas modalidades, los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, los exosomas descritos en la presente tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000

nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 20-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 90 % de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 95% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40- 1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de exosomas descritas en la presente comprenden una población, donde 99% de dichos exosomas tienen una dimensión más larga de alrededor de 40-1000 nm tal como fue medido por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN).

4.8.3. Medición de la densidad de carga de los exosomas

[000195] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden medir la densidad de carga de los exosomas y/o las poblaciones de exosomas incluidos en las fracciones purificadas. En algunas modalidades, la densidad de carga se mide mediante titulación potentiométrica, intercambio aniónico, intercambio catiónico, enfoque isoeléctrico, potencial Zeta, electroforesis capilar, electroforesis de la zona capilar, o electroforesis en gel.

4.8.4. Medición de densidad de proteínas de exosoma

[000196] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden medir la densidad de las proteínas de exosoma en la superficie de exosoma. La densidad de superficie se puede calcular o presentar como la masa por área de unidad, la cantidad de proteínas por área, cantidad de moléculas o intensidad de la señal de la molécula por exosoma, cantidad molar de la proteína, etc. La densidad de la superficie puede ser medida de forma experimental mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, al usar interferometría de biocapa (BLI), FACS, transferencia Western, detección de fluorescencia (por ejemplo, proteínas de fusión-GFP), citometría de nano-flujo, ELISA, alphaLISA, y/o densitometría al medir bandas en un gel de proteína.

4.9. Ejemplos

[000197] Los siguientes ejemplos se proponen a efectos de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran que es la invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se ha intentado asegurar la exactitud de las cifras utilizadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se debe considerar la posibilidad de algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es atmosférica o similar. Se pueden utilizar abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, par/es de base(s); kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o seg, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); nt, nucleótido(s); y similares.

[000198] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la técnica. Tales técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); AL. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 21a edición (Easton, Pennsylvania: Mack

Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3.ª Ed. (Plenum Press) Vol. A y B (1992).

4.9.1. Ejemplo 1: Identificación de proteínas de exosoma

4.9.1.1. Recolección de exosomas

[000199] Los exosomas se recolectaron del sobrenadante de cultivos de suspensión de alta densidad de células HEK293 SF después de 9 días. El sobrenadante se filtró y fraccionó mediante cromatografía de intercambio de aniones y se eluyó en un gradiente en etapas de cloruro de sodio. La fracción pico con la concentración de proteína más alta contenía exosomas y componentes celulares contaminantes. La fracción pico se aisló y se fraccionó adicionalmente en un gradiente de densidad Optiprep™ (60 % iodixanol p/v) mediante ultracentrifugación.

[000200] La fracción del exosoma se concentró mediante ultracentrifugación en un tubo de 38.5 mL Ultra-Clear (344058) para un rotor SW 32 Ti a 133,900 x g durante 3 horas a 4 °C. El material sedimentado se volvió a suspender en 1 mL de PBS y 3 mL de OptiprepTM, que lleva la concentración de iodixanol final a 45 %. Para el gradiente OptiprepTM, un gradiente estéril 4-tier se preparó con 4 mL de iodixanol al 45 % que contiene el material resuspendido, 3 mL de iodixanol al 30 %, 2 mL de iodixanol al 22,5 %, 2 mL de iodixanol al 17,5 %, y 1 mL de PBS en un tubo Ultra-Clear (344059) de 12 mL para un rotor SW 41 Ti. El gradiente OptiprepTM se ultracentrifugó a 150,000 x g durante16 horas a 4 °C para separar la fracción de exosoma. La ultracentrifugación tuvo como resultado una Fracción Superior conocida por contener exosomas, una Fracción media que contiene desechos de célula de densidad moderada, y una Fracción inferior que contiene agregados de alta densidad y desechos de célula (Figura 1). La capa de exosoma fue luego suavemente recolectada de ~3 mL superior del tubo.

[000201] La fracción del exosoma se diluyó en ~32 mL de PBS en un tubo de 38,5 mL Ultra-Clear (344058) y se ultracentrifugó a 133,900 x g durante 3 horas a 4 °C para sedimentar los exosomas purificados. Los exosomas sedimentados fueron luego resuspendidos en un volumen mínimos de PBS (~200 µL) y se almacenaron a 4 °C.

4.9.1.2. Preparación de muestra para análisis de LC-MS/MS

[000202] Para determinar las proteínas específicas a los exosomas, la Fracción superior y la Fracción inferior del gradiente de Optiprep™ se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Todas las muestras se recibieron en amortiguador de

solución salina tamponada con fosfato (PBS) o PBS y sacarosa al 5 %. Antes del análisis, la concentración de la proteína total de cada muestra se determinó mediante ensayo de ácido bicinconínico (BCA), después de lo cual cada muestra se diluyó apropiadamente hasta 125 µg/mL en amortiguador de PBS. Luego, 50,0 µL de cada muestra se agregó a un tubo de microcentrifugación separado de 1,5 mL que contiene un volumen igual de amortiguador de lisis de exosoma (Tris 60 mM, GdmCl 400 mM, EDTA 100 mM, TCEP 20 mM, Triton X-100 al 1,0 %) seguido por la transferencia de solución de Triton X-100 2,0 µL al 1,0 %. Todas las muestras luego se incubaron a 55 ºC durante 60 minutos.

[000203] La precipitación de proteína se realizó al agregar 1250 µL de etanol a -20°C. Para mejorar la eficiencia, las muestras se agitaron en un vórtex de forma vigorosa durante aproximadamente 10 minutos y luego se incubaron a -20°C durante 60 minutos. Después de la incubación, las muestras se sometieron a sonicación en un baño de agua durante 5 minutos. El material precipitado se sedimentó al centrifugar durante 5 minutos a 15.000 g a 4°C. El sobrenadante se decantó, y el material sedimentado se secó minuciosamente usando gas nitrógeno. Los sedimentos se volvieron a suspender en amortiguador de digestión 30,0 µL (Tris 30 mM, GdmCl 1,0 M, EDTA 100 mM, TCEP 50 mM, pH 8.5) que también tenía enlaces de disulfuro reducidos. Los residuos de cisteína libres se sometieron a alquilación al agregar solución de alquilación 5,0 µL (375 mM yodoacetamida, Tris 50 mM, pH 8.5) y se incuba la solución resultante a temperatura ambiente en la oscuridad durante al menos 30 minutos.

[000204] Después de la incubación, cada muestra se diluyó usando 30,0 µL 50 mM Tris pH 8.5, y digestión proteolítica se inició al agregar tripsina 2,0 µg. Todas las muestras se mezclaron y luego se incubaron durante la noche a 37°C. Después de la incubación, la actividad de tripsina se cesó al agregar 5,0 µL ácido fórmico al 10 %. Antes del análisis mediante LC-MS/MS, cada muestra se desaló usando columnas de centrifugación Pierce C18. Al final de este proceso, cada muestra se secó y se reconstituyó en 50,0 µL de agua con ácido fórmico al 0,1 % y se transfirió a un vial de HPLC para análisis.

4.9.1.3. Análisis LC-MS/MS

[000205] Las muestras se inyectaron en un sistema de cromatografía de flujo bajo UltiMate 3000 RSCLnano (Thermo Fisher Scientific), y péptidos trípticos se cargaron en una columna de captura Acclaim PepMap 100 C18 (75 µm x 2 cm, tamaño de partícula 3 µm, tamaño de poro 100 Å, Thermo Fisher Scientific) usando fase móvil de carga (MPL: agua,

ácido fórmico al 0,1 %) a una velocidad de flujo de 1.000 µL/min. Los péptidos se eluyeron y separaron con un gradiente de fase móvil A (MPA: agua, ácido fórmico al 0,1 %) y la fase móvil B (MPB: acetonitrilo, ácido fórmico al 0,1 %) a una velocidad de flujo de 300 nL/min a través de una columna analítica EASY-Spray C18 (75 µm x 25 cm, tamaño de partícula 2 µm, tamaño de poro 100 Å, Thermo Fisher Scientific). El gradiente paso a paso usado para la elución comenzó a 2 % MPB, donde se mantuvo durante 8 minutos durante la carga. El porcentaje de MPB luego aumentó de 2-17 % durante 35 minutos, una vez más de 17-25 % durante 45 minutos, y finalmente de 25-40 % durante 10 minutos. Las especies más hidrofóbicas se quitaron al aumentar a 98 % MPB durante 5 minutos, luego se mantuvieron allí durante 10 minutos. El tiempo de ejecución total para el método fue 135 minutos y se permitió suficiente tiempo para la reequilibración de la columna. Los ciclos de lavado se realizaron en medio de inyecciones analíticas no idénticas para minimizar el arrastre.

[000206] Los análisis de masa se realizaron con un espectrómetro de masas Q Exactive Basic (Thermo Fisher Scientific). Los espectros de masas de iones precursores se midieron a través de un intervalo m/z de 400-1600 Da a una resolución de 70,000. Los 10 iones precursores más intensos se seleccionaron y fragmentaron en la célula HCD usando una energía de colisión de 27, y los espectros MS/MS se midieron a través de un intervalo m/z de 200-2000 Da a una resolución de 35,000. Los iones con estados de carga de 2-4 se seleccionaron para fragmentación y el tiempo de exclusión dinámica se estableció en 30 segundos. Cualquier lista de exclusión que contiene 14 polisiloxanos comunes se usaron para minimizar la identificación incorrecta de contaminantes conocidos.

4.9.1.4. Procesamiento de datos

[000207] Las proteínas se identificaron primero y se cuantificaron (libres de etiquetas) usando software Proteome Discoverer (versión 2.1.1.21, Thermo Fisher Scientific) y el algoritmo Sequest HT combinado con el validador de PSM señuelo objetivo. Las búsquedas fueron realizadas comparando con la base de datos de referencia del Homo sapiens Swiss-Prot completo (taxonomía 9606 versión 2017-05-10: 42,153 entradas), así como una base de datos Uniprot personalizada que contiene proteínas E1a (7 entradas). Se usaron los siguientes parámetros de búsqueda: enzima, tripsina; máximo de 2 escisiones perdidas; longitud de péptidos mínima de 6 residuos; tolerancia de masa precursora de 10 ppm; y tolerancia de masa de fragmento de 0,02 Da. La búsqueda también incluyó modificaciones

dinámicas específicas (oxidación de M; desamidación de N o Q; fosforilación de S, T, o Y; piro-glutamación de péptido-terminal E; y acetilación de la proteína de extremo N) y modificaciones estáticas (carbamidometilación de C).

[000208] En el validador de PSM de señuelo objetivo, el Cn delta máximo y ambas velocidades de descubrimiento falsas objetivas relajadas (FDR) se establecieron en 1 porque los datos se buscaron una vez más usando software Scaffold (versión 4.8.2, Proteome Software Inc.). En Scaffold, los datos también fueron buscados usando el X! El algoritmo de fuente abierta en tándem para identificar proteínas usando un umbral de proteína de 99,0 %, un mínimo de 2 péptidos, y un umbral de péptido de 95 %.

[000209] Para determinar la identidad de proteínas específicas de exosomas novedosas, coincidencias espectrales de péptidos totales (PSM) se compararon para las proteínas encontradas en la fracción de exosoma superior del gradiente Optiprep™ versus aquellos en la fracción inferior. Tal como se muestra en la Figura 2, hubo una correlación débil entre las proteínas de fracción superior (eje Y) y las proteínas de fracción inferior (eje X). Las proteínas graficadas arriba de la línea punteada representan proteínas enriquecidas con exosomas, mientras aquellas debajo de la línea punteada representan proteínas enriquecidas con contaminantes. De manera importante, hubo una cantidad de proteínas asociadas a la membrana que estaban altamente enriquecidas en la fracción de exosomas, que incluyen (1) regulador negativo de receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), (2) basigina (BSG), (3) miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3), (4) miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8), (5) integrina beta-1 (ITGB1), (6) integrina alfa-4 (ITGA4), (7) 4F2 cadena pesada de antígeno de superficie celular (SLC3A2), y (8) una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4). Tal como se muestra en los mapas de cobertura de péptido tríptico en las Figuras 3-5, el estudio de espectrometría de masas tuvo como resultado una amplia cobertura de PTGFRN (Figura 3), IGSF8 (Figura 4), y Basigina (Figura 5). Juntos, estos resultados demuestran que hay numerosas proteínas transmembrana enriquecidas en poblaciones de exosomas purificados que podrían ser útiles para purificar los exosomas de poblaciones heterogéneas o para usar como estructuras en la generación de exosomas modificados genéticamente.

4.9.2. Ejemplo 2: Verificación de expresión de proteína de superficie

[000210] Para confirmar que las proteínas específicas al exosoma identificadas en los estudios de espectrometría de masas estaban altamente enriquecidas en la superficie de exosomas, se llevó a cabo transferencia de proteínas en el lisado del total de células y poblaciones de exosomas purificados de células HEK293. Tal como se muestra en la Figura 6A, el patrón de proteína total difería sustancialmente entre el lisado del total de células (izquierda) y el lisado de exosomas (derecha). Específicamente, hubo una fuerte banda a ~110 kDa en el lisado de exosomas que estuvo ausente en el lisado del total de células. La transferencia Western para PTGFRN reveló una banda al tamaño esperado de ~110 kDa en el lisado de exosomas pero no en el lisado de células (Figura 6B), lo cual indica que PTGFRN está altamente enriquecido en exosomas, y puede ser visualmente detectable en el lisado del total de exosomas.

[000211] Los estudios de espectrometría de masas indicaron la presencia de varias proteínas novedosas de membrana asociadas al exosoma. Para confirmar adicionalmente esta asociación, las fracciones de exosomas se purificaron en gradientes de Optiprep™ autoformantes y analizados por transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 7A, el total de proteínas se detecta en todas las fracciones del gradiente y las proteínas marcadoras de exosoma Alix y sintenina están enriquecidas en las fracciones 2-6. De manera importante, cada una de las proteínas marcadoras de superficie novedosas analizadas estaban enriquecidas en estas mismas fracciones, que indican una fuerte y específica asociación con exosomas (Figura 7B). La demostración que estas proteínas de transmembrana están altamente expresadas y enriquecidas en los exosomas proporciona una oportunidad para purificar los exosomas al usar un agente de unión dirigido contra cualquiera de estas proteínas, así como generar exosomas modificados en la superficie de alta expresión que contienen proteínas heterólogas fusionadas a cualquiera de estas proteínas novedosas (Figura 8).

4.9.3. Ejemplo 3: Caracterización de dominio de PTGFRN

[000212] PTGFRN, BSG, IGSF3 e IGSF8 son todas proteínas de transmembrana de un solo pase de tipo I con un extremo N frente al entorno extracelular/extravesicular y un extremo C ubicado en el lumen de citoplasma/exosoma y contiene al menos dos repeticiones de inmunoglobulina V (IgV), tal como se ilustra en la Figura 8. PTGFRN fue la proteína de superficie más altamente enriquecida detectada en el análisis de espectrometría de masas

mostrado en la Figura 2. Las construcciones de expresión que codifican las proteínas de fusión entre GFP y PTGFRN de longitud completa o varios mutantes de truncamiento de IgV de PTGFRN descritos en las Figuras 9A y B estaban expresados de forma estable en las células HEK293. Los exosomas se aislaron del cultivo de la célula HEK293 usando el método descrito en el Ejemplo 1 y analizado por transferencia Western usando un anticuerpo anti-GFP. Tal como se muestra en la Figura 9B, la expresión de las proteínas de fusión entre GFP y PTGFRN truncado o de longitud completa se detectaron en los exosomas purificados. De manera interesante, la eliminación del primer dominio de IgV tuvo como resultado una banda de peso molecular inferior (marcado como “producto escindido”) que no fue detectable con sobreexpresión de la proteína de longitud completa. Este producto más pequeño fue detectado de forma consistente en todos los mutantes de truncamiento, lo cual sugiere que se generó como resultado de la escisión de proteasa. Los exosomas que contienen varias proteínas de fusión GFP-PTGFRN se analizaron en un gel libre de tinta mini-PROTEAN® TGX de SDS-PAGE (Bio-Rad, Inc.) para medir el total de proteínas de exosomas. Se proporciona el resultado en la Figura 10. La expresión de la proteína de fusión de GFP y PTGFRN de longitud completa fue fácilmente detectable y muy abundante, a un nivel tan alto como ~50 % de las proteínas totales en los exosomas purificados (carril 2). El producto de escisión de peso molecular inferior (marcado como "producto escindido”) no estaba claramente visible y por lo tanto estaba ausente en los exosomas nativos o exosomas que sobreexpresan PTGFRN de longitud completa (carriles 1 y 2), lo que sugiere que el primer dominio IgV (IgV 1) en el extremo N de la proteína puede prevenir la escisión de PTGFRN.

[000213] PTGFRN de longitud completa y varios mutantes PTGFRN truncados fueron luego expresados de forma estable con una etiqueta FLAG de extremo N en las células HEK293 (Figura 11A). Los exosomas del cultivo celular se recolectaron y analizaron mediante transferencia Western con un anticuerpo anti-FLAG. El resultado se proporciona en la Figura 11B. En contraste con las proteínas de fusión que contienen GFP en su extremo C (Figuras 9 y 10), las proteínas de fusión que contienen una etiqueta FLAG en el extremo N no proporcionaron una banda de peso molecular bajo (marcada como “producto sin escisión” en la Figura 11B), y los truncamientos más cortos se detectaron a un nivel bajo. Este resultado sugiere que el evento de escisión probablemente esté quitando el extremo N de la proteína unido al epítopo de FLAG usado para transferencia Western (Figura 11B).

[000214] PTGFRN está apenas detectado en el lisado de células y una mezcla de PTGFRN intacto y escindido se detecta en exosomas purificados tal como lo sugiere la transferencia Western proporcionada en las Figuras 6A y B. Esto sugiere que PTGFRN está siendo escindido mientras se ubica e integra en la membrana de exosoma o durante la formación de exosomas. ADAM10 (un dominio 10 de desintegrina y metaloproteinasa) es una proteína de exosoma convencional y una metaloproteinasa asociada a la membrana. Las células HEK293 se transfectaron con Cas9 y cuatro ARN guía que se dirigen al locus de ADAM10 (CRISPR32174_SG, CRISPR726928_SG, CRISPR726931_SG, y CRISPR726933_SG, Thermo Fisher Scientific) para generar células ADAM10 inactivadas. Las células ADAM10 inactivadas (ADAM 10 -) o células de tipo salvaje (ADAM10 +) fueron luego transfectadas con una construcción que codifica una proteína de fusión que contiene PTGFRN de longitud completa fusionada a GFP o una proteína de fusión diferente que contiene PTGFRN truncado al que le falta los primeros tres dominios IgV fusionados a GFP (PTGFRN_IgV3-GFP). Los exosomas se aislaron de estas células y la expresión de las proteínas de fusión se midieron mediante PAGE de total de proteína y transferencia Western usando un anticuerpo anti-GFP. La Figura 12A muestra que las cantidades comparables de proteínas totales se cargaron en cada carril. La transferencia Western que usa un anticuerpo anti-ADAM10 (ab124695; Abcam) mostró eliminación eficiente de ADAM 10 en las células con inactivación (Figura 12B). La transferencia Western que usa un anticuerpo anti-GFP mostró alto nivel de expresión de proteínas de fusión que contienen PTGFRN de longitud completa y GFP en ambas células de tipo salvaje (ADAM10 +) y con inactivación de ADAM10 (ADAM10 -) tal como se proporciona en la Figura 12C (carriles 1 y 2). Este resultado es consistente con el resultado en la Figura 9B donde no se detectó ninguna escisión de proteínas de fusión que contienen el PTGFRN de longitud completa. De manera interesante, el producto de escisión previamente detectado para PTGFRN_IgV3-GFP se detectó en las células de tipo salvaje pero estuvo ausente en las células ADAM10 inactivadas (Figura 12C, carriles 3 y 4). Esto sugiere que ADAM 10 media la escisión de fragmentos de PTGFRN exosomales. Este resultado también sugiere que una proteína de fusión que contiene fragmentos de PTGFRN truncados sería más exitosamente expresada en exosomas de células a las que les falta ADAM10 (ADAM10 -).

[000215] PTGFRN se puede usar como un compañero de fusión atractivo para

decoración/carga de exosomas de alta densidad, pero dado su tamaño (~100kDa) una versión truncada más pequeña se preferiría para permitir la coexpresión de moléculas biológicamente activas, grandes. La escisión dependiente de ADAM10 detectada en cada uno de los mutantes de truncamiento de IgV presenta un problema para la carga de alta densidad porque un determinado porcentaje de cualquier proteína de fusión sería escindida de la superficie de exosomas, lo cual reduce el grado de carga/muestra. Para identificar un fragmento de PTGFRN mínimo que facilita la muestra de superficie de exosomas de alta densidad sin sufrir de la escisión de proteasa, PTGFRN al que le falta cinco de los seis dominios de IgV (PTGFRN_IgV6) se expresó como una fusión a una etiqueta FLAG y una proteína de compañero de fusión (Figura 13). La expresión de las proteínas de fusión que contienen PTGFRN_IgV6 proporcionaron el producto de escisión previsto previamente identificado (Figura 14B, #451). Los mutantes de truncamiento serial de PTGFRN_IgV6 al que le faltan cuatro aminoácidos adicionales en un momento también fueron evaluados, y la eliminación de 12 aminoácidos proporcionaron exosomas que no fueron sometidos a escisión de PTGFRN (Figura 14A, Figura 14B, #454). El PTGFRN #454 es un polipéptido de la SEQ ID NO: 33 De manera adicional, dado que la etiqueta FLAG está en un extremo N respecto al sitio de escisión, truncamientos más cortos de PTGFRN_IgV6 tuvieron como resultado una expresión más alta de la proteína de fusión, lo que sugiere que la escisión no ocurre con estos truncamientos (Figura 14C).

[000216] Estos resultados proporcionados en la Figura 15 sugieren además que PTGFRN (FL) de longitud completa y PTGFRN_454 (sIgV) serían ideales compañeros de fusión para la expresión de alta densidad de proteínas luminales (fusiones de extremo C) o de superficie (extremo N) sobre y/o en exosomas. Para evaluar esta hipótesis, varias proteínas de andamiaje se evaluaron para ver su capacidad de producir exosomas de muestra de alta densidad. Las proteínas de fusión que comprenden una proteína de andamiaje y GFP se expresaron en el cultivo celular, específicamente las proteínas de fusión que contienen GFP fusionado al lado luminal del andamiaje pDisplay frecuentemente usado (receptor PDGF), PalmPalm (secuencia de palmitoilación), CD81, o ya sea PTGFRN (FL) o PTGFRN_454 de longitud completa (sIgV). Una titulación de dosis de exosomas purificados de las células que expresan establemente cada proteína de fusión demostró que las proteínas de fusión PTGFRN tuvieron como resultado una fluorescencia de GFP mucho mayor que cualquier otro

andamiaje, que incluye la conocida proteína de exosoma CD81. En comparación con el andamiaje pDisplay, PTGFRN de longitud completa y sIgV tuvo como resultado un aumento de >25 veces en la eficiencia de carga (Figura 15). Estos resultados sugieren que el uso de PTGFRN de longitud completa o el PTGFRN truncado (sIgV) que es lo suficientemente corto para quitar el sitio de escisión, como un compañero de fusión permite una muestra de alta densidad o carga de exosoma.

4.9.4. Ejemplo 4: Sobreexpresión de IGSF8 no lleva a alta densidad de muestra de exosoma

[000217] El nivel de expresión de PTGFRN sugiere que sería un compañero de fusión ideal para producir exosomas modificadas genéticamente. Para determinar si otros miembros de la familia de proteínas que contienen inmunoglobulina serían adecuados para la modificación de exosomas, las células HEK293 se transfectaron de forma estable con una proteína de fusión de IGFS8-GFP y los exosomas resultantes se purificaron (Figura 16A). Los exosomas nativos y los exosomas IGSF8-GFP se analizaron en un gel libre de manchas mini-PROTEAN® TGX de SDS-PAGE (Bio-Rad, Inc.), que usa una tinta de unión a triptófano para detectar proteínas, tal como se proporciona en la Figura 16B. IGSF8 contiene 10 residuos de triptófano, que permite su fácil detección. La transferencia Western que usa un anticuerpo anti-GFP confirmó la expresión de IGSF8-GFP en los exosomas que se sobreexpresan (Figura 16B, parte inferior). De manera interesante, cuando los exosomas IGSF8-GFP se evaluaron para la fluorescencia de GFP en comparación con las fusiones de GFP con el andamiaje pDisplay (receptor PDGF), CD81, o PTGFRN de longitud completa (FL) o PTGFRN_454 (sIgV), IGSF8 (FL IGSF8) no pudieron mostrar el enriquecimiento de GFP sobre la muestra estocástica de nivel bajo observado con pDisplay (Figura 17). Este resultado sugiere que no todo miembro de la familia IgV se puede usar como una proteína de fusión para diseñar la visualización de superficie de exosomas de alta densidad/carga de luminal, y que PTGFRN y otros miembros de la familia son superiores a IGSF8 en este aspecto. La expresión de IGSF8, sin embargo, se detectó a niveles elevados en la superficie de exosomas no modificados, que permitirían que IGSF8 sea usado como un objetivo para purificación de afinidad de exosoma.

4.9.5. Ejemplo 5: Expresión y caracterización del dominio extracelular de PTGFRN en células mamarias

[000218] El dominio extracelular (ECD) de PTGFRN es 98 kDa y contiene seis repeticiones IgV en tándem. El ECD de PTGFRN puede ser un objetivo deseable para los reactivos de purificación de afinidad de exosomas debido a su tamaño y niveles de expresión elevados. Para caracterizar este segmento de PTGFRN, el PTGFRN ECD se expresó como una proteína de fusión con el péptido de señal endógeno en el extremo N (SP), y un sitio de escisión PAR1 y dominio Fc en el extremo C (Figura 18). PAR1 es un sustrato para la trombina y se puede usar para eluir proteínas de fusión Fc usando resina de Proteína A. PTGFRN tiene nueve sitios de glicosilación unidos a N previstos y 6 enlaces de disulfuro previstos, que excluyen el uso de sistemas de expresión bacterianas para la producción de glucoproteínas endógenas. El PTGFRN ECD se sobreexpresó usando el Sistema de expresión Expi293 (Thermo Fisher Scientific), que se usa para producir proteínas recombinantes de mamífero de alto rendimiento. El medio de cultivo celular acondicionado de células Expi293 transfectadas fue 0,2 µm filtrado y purificado en Proteína A seguido por elución de glicina de pH bajo y neutralización inmediata. La etiqueta de Fc se quitó sin tratamiento de trombina y el grupo de la proteína escindida se volvió a realizar sobre la Proteína A. Se recolectó el paso de flujo, se concentró y se pulió en SEC preparativa. El PTGFRN ECD purificado se analizó mediante cromatografía de filtración de gel en PBS pH 7.4 usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) y se detectó a fluorescencia UV de 280 nm. La Figura 19A muestra un solo pico de elución a ~55mL y la Figura 19B muestra un solo producto de proteína del tamaño previsto de PTGFRN ECD cuando el pico eluido se analizó en un gel libre de manchas mini-PROTEAN® TGX de SDS-PAGE desnaturalizante (Bio-Rad, Inc.), que indica que PTGFRN ECD se puede purificar a partir de células de mamífero.

[000219] Para confirmar la expresión apropiada del PTGFRN ECD, la proteína purificada se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño/dispersión de luz múltiples ángulos (SEC-MALS), usando BSA y un anticuerpo anti-VLA4 como estándares para comparación. PTGFRN ECD recombinante se eluyó a ~2x su peso molecular previsto (198 kDa en oposición al peso molecular previsto, 98 kDa; Figura 20A). Para determinar si PTGFRN ECD forma un homodímero en solución, se ejecutó PTGFRN ECD recombinante en una columna SEC analítica (Tosoh, 7.8x30cm, G3000SW xl) en PBS en ausencia de cloruro de guanidio (GuHCl) o en presencia de cloruro de guanidio 1M o 2M (GuHCl). La Figura 20B muestra el perfil de elución del PTGFRN ECD bajo GuHCl en aumento (sin GuHCl (una curva etiquetada

“PTGFRN”), GuHCl 1M (una curva etiquetada “PTGFRN + 1M GuHCl”), o GuHCl 2M (una curva etiquetada “PTGFRN + GuHCl 2M”)) y la conversión del pico dimérico previsto a un pico monomérico. Estos resultados sugieren que PTGFRN ECD forma un homodímero, y que la dimerización de PTGFRN puede ocurrir naturalmente en la superficie del exosoma.

4.9.6. Ejemplo 6: Matriz de proteína de PTGFRN

[000220] El PTGFRN está mal caracterizado en la literatura, y su rol como una proteína exosomal está mayormente inexplorada. El PTGFRN también es conocido como Compañero 1 de CD9 (CD9P-1) debido a su interacción con CD9, que también se encuentra en la superficie de los exosomas. Para entender más qué proteínas se une PTGFRN, se generó PTGFRN ECD humano mono-biotinilado recombinante y se sondeó en una micromatriz de proteína que contiene más de 20.000 proteínas que abarcan 81 % del proteoma humano (CDI Laboratories). Los análisis de unión se realizaron a pH 5.6 y 7.4 para representar el pH del endosoma acidificante y el citosol, respectivamente. Nueve resultados positivos se identificaron a pH 7.4, y 16 se identificaron a pH 5.6. Tres proteínas (LGALS1, galectina-1; FCN1, ficolina-1; MGAT4B, alfa-1,3-manosil-glucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa B) se identificaron a ambos pH 5.6 y pH 7.4 (Figura 21). LGALS1 se conoce por unir los carbohidratos monoméricos y los glicanos complejos pero no se ha implicado como un compañero de unión de PTGFRN. Para confirmar la interacción entre PTGFRN y LGALS1, PTGFRN ECD recombinante biotinilado se unió a una sonda óptica de Estreptavidina y se analizó mediante interferometría de biocapa (BLI) usando un Octet® RED96 (Pall). La unión dependiente de la dosis de galectina-1 a PTGFRN se confirmó mediante BLI (Figura 22). La interacción entre LGALS1 y PTGFRN fue reversible y compitió por la lactosa en una manera dependiente de la dosis (Figura 23), lo que demuestra la especificidad de esta interacción. Estos resultados también sugieren que los exosomas se pueden purificar al usar compañeros de unión de PTGFRN como reactivos de afinidad.

4.9.7. Ejemplo 7: Unión de anticuerpo anti-PTGFRN a PTGFRN o Exosomas

[000221] PTGFRN biotinilado se unió a una sonda de Estreptavidina de un Octet® RED96 (Pall) y se incubó en PBS + 0,1 % Tween 20 con concentraciones en aumento de un anticuerpo de rata monoclonal contra CD315, un alias para PTGFRN (MABT883, Millipore Sigma). La unión dependiente de la dosis se detectó lo que sugiere un reconocimiento específico de PTGFRN por el anticuerpo (Figura 24). Para determinar si el anticuerpo anti-

CD315 podría unirse a los exosomas, el anticuerpo anti-CD315 se unió a una sonda de Proteína L y se incubó con cantidades en aumento de exosomas HEK293 purificadas Optiprep™ (Figura 25). Tal como se muestra en la Figura 25, la deformación dependiente de la dosis después de la incubación con exosomas purificados muestra que el anticuerpo anti-CD315 puede reconocer el PTGFRN endógeno en la superficie del exosoma. Un experimento similar se realizó con células HEK293 transfectadas de forma estable con PTGFRN de longitud completa para generar exosomas que sobreexpresan PTGFRN (exosomas PTGFRN++). Los exosomas que se sobreexpresan se incubaron con el anticuerpo anti-CD315 inmovilizado y tuvieron como resultado una deformación dependiente de la dosis que indica la unión específica entre el anticuerpo y los exosomas (Figura 26). Para comparar el alcance del anticuerpo que se une a exosomas que sobreexpresan PTGFRN o nativos, los exosomas 1.1E11 de cada variedad se incubaron en la presencia del anticuerpo anti-CD315 y se midieron mediante BLI. Tal como se muestra en la Figura 27, los exosomas que sobreexpresan PTGFRN llevan a una deformación mucho mayor que los exosomas nativos, lo cual indica que niveles aumentados de PTGFRN llevan a mayor unión, y que la unión de PTGFRN puede por lo tanto ser usada para purificación de exosomas.

4.9.8. Ejemplo 8: Reconocimiento de dominio mediante anticuerpos anti-PTGFRN

[000222] Los resultados en los Ejemplos 6 y 7 sugieren que los exosomas se pueden purificar basados en las interacciones de afinidad con PTGFRN. El PTGFRN de longitud completa y una serie de mutantes de truncamiento se expresaron como proteínas recombinantes monobiotiniladas usando el sistema Expi293 descrito anteriormente (Figura 28, izquierda). Cada uno de los truncamientos se incubó con el anticuerpo anti-CD315 y la unión se midió mediante BLI. Solo el PTGFRN de longitud completa se unió al anticuerpo anti-CD315, lo que indica que el epítopo se encuentra en el extremo N de la proteína en el primer dominio de IgV.

[000223] Se generaron grupos de anticuerpos policlonales al inyectar a conejos con ectodominio de longitud completa recombinante de PTGFRN similar a la construcción 1 en la Figura 28 pero que le falta una secuencia de biotinilación. Los grupos de anticuerpos policlonales se purificaron de extracciones de sangre en extremidades mediante Proteína A y se evaluaron para ver la reactividad contra los fragmentos de truncamiento de PTGFRN. Cada uno de los fragmentos se analizó en un gel libre de manchas mini-PROTEAN® TGX de SDS-

PAGE desnaturalizante (Bio-Rad, Inc.) que confirma la expresión de proteínas de longitud correcta (Figura 29A). El análisis de transferencia Western se llevó a cabo en las muestras usando los anticuerpos de conejo policlonales agrupados, y se detectaron bandas de tamaño correcto en cada carril así como para el control de exosomas nativas, que confirman la reactividad específica con anticuerpos PTGFRN policlonales (Figura 29B). Para confirmar este resultado, cada uno de los fragmentos de PTGFRN biotinilados se analizó mediante BLI y los resultados se proporcionaron en la Figura 30. La incubación con los grupos de anticuerpos policlonales mostraron unión en todas las condiciones, que demuestra una amplia reactividad con los anticuerpos para cada uno de los dominios de IgV de PTGFRN.

4.9.9 Ejemplo 9: Exosomas de diversas líneas celulares expresan miembros de familia IgV y otras proteínas de superficie novedosas

[000224] Las líneas celulares de diferentes tejidos de origen (HEK293SF, riñón; HT1080, tejido conjuntivo; K562, médula ósea; MDA-MB-231, mama; Raji, linfoblasto) se cultivaron hasta la fase logarítmica y se transfirieron a medio complementado con suero con exosomas agotados durante ~6 días. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC) se cultivaron en microportadores en 3D durante cinco días y se complementaron en medio libre de suero durante tres días. El sobrenadante se aisló, y los exosomas se purificaron usando el método de ultracentrifugación de gradiente de densidad Optiprep™ descrito anteriormente. Cada uno de los exosomas purificados se analizó mediante LC-MS/MS tal como se describe anteriormente, se contó la cantidad de coincidencias de espectro de péptido (PSM) para varias proteínas de superficie (PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 y CD9), y los resultados se proporcionan en la Figura 31. Las tetraspaninas CD81 y CD9 fueron detectables en la mayoría de las poblaciones de exosomas purificados, pero, en algunos casos, fueron iguales o menores que los otros marcadores de superficie (por ejemplo, comparar CD9 con PTGFRN, BSG, y SLC3A2 en todas las líneas celulares). Este descubrimiento indica que los marcadores de superficie nuevamente identificados, que incluyen los miembros de familia de proteína de IgV son objetivos adecuados para desarrollar los métodos de purificación de afinidad para varias líneas celulares no relacionadas derivadas de diferentes tejidos.

4.9.10. Ejemplo 10: Generación de células PTGFRN inactivadas y exosomas

[000225] Para generar células PTGFRN inactivadas, las células HEK293SF se

transfectaron con Cas9 recombinante y ARN guía que se dirige a exón 2 y la región transmembrana de PTGFRN. El ARN guía que se dirige a exon2 generado por ThermoFisher incluía: (1) CGTTGGCAGTCCGCCTTAAC, CRISPR926045_CR (SEQ ID NO: 36); (2) CATAGTCACTGACGTTGCAG, CRISPR926054_CR (SEQ ID NO: 37); (3) TTGTGGAGCTTGCAAGCACC, CRISPR926055_CR (SEQ ID NO: 38); y (4) GTTCTTTATGTGGAGCTCCA, CRISPR926071_CR (SEQ ID NO: 39). El ARN guía que se dirige a la región transmembrana generado por ThermoFisher incluía (1) TATCCCTTGCTGATCGGCGT, TMgRNA5.1.97 (SEQ ID NO: 40); (2) GCTGCAGTACCCGATGAGAC, TMgRNA3.7.87 (SEQ ID NO:41).

[000226] La edición y eliminación de gen dirigido del exón 2 y la región transmembrana de PTGFRN se confirmó mediante PCR y secuenciación. Los exosomas de cinco líneas celulares con PTGFRN inactivadas clonales (PTGFRN KO) se purificaron tal como se describe anteriormente y se analizaron mediante PAGE y transferencia Western usando los grupos de anticuerpos de conejo policlonales descritos en el Ejemplo 8. Tal como se muestra en la Figura 32B, las bandas que corresponden a PTGFRN no se detectaron en ninguno de los cinco clones inactivados, lo que demuestra la eliminación dirigida de PTGFRN en las células productoras y exosomas purificados. De manera importante, el rendimiento de producción de exosoma y patrones de unión de proteínas generales (Figura 32A) no fueron afectados por la eliminación de PTGFRN, lo cual indica que los exosomas PTGFRN KO se pueden usar para fines experimentales.

[000227] Para determinar si la eliminación de PTGFRN alteró el perfil proteómico de exosomas purificadas, los exosomas nativos y los exosomas PTGFRN KO se analizaron mediante espectrometría de masas comparativa. Tal como se muestra en la Figura 33, el contenido de proteína de los exosomas PTGFRN KO y nativos fue muy similar con la sola excepción de PTGFRN, que no fue detectable en los exosomas PTGFRN KO. Los marcadores de exosomas Alix, CD81, TSG101, y CD9 no fueron considerablemente diferentes entre los grupos. Estos datos demuestran que PTGFRN se pueden quitar de los exosomas sin alterar el perfil proteómico de los exosomas.

[000228] Para verificar que la eliminación de PTGFRN tuviera como resultado una eliminación funcional completa de PTGFRN y para demostrar el anticuerpo anti- PTGFRN (anti-CD315) descrito en el Ejemplo 7 es específico de PTGFRN, los experimentos de unión a

exosoma usando BLI fueron llevados a cabo con exosomas nativos, exosomas que sobreexpresan PTGFRN (PTGFRN++) y exosomas PTGFRN KO. De manera similar a los resultados experimentales descritos en la Figura 27 y el Ejemplo 7, los exosomas PTGFRN++ se unieron al anticuerpo anti-CD315 inmovilizado con una mayor afinidad que los exosomas nativos (Figura 34). Por el contrario, un número igual de exosomas PTGFRN KO no pudieron unirse al anticuerpo inmovilizado (Figura 34), lo cual demuestra que la eliminación de PTGFRN extirpa la interacción de los exosomas PTGFRN KO con reactivos de afinidad anti-PTGFRN.

4.9.11. Ejemplo 11: Los exosomas se puede purificar con reactivos de afinidad que reconocen PTGFRN

[000229] Los anticuerpos monoclonales personalizados contra PTGFRN se generaron de los conejos inmunizados tal como se describe en el Ejemplo 8. Para determinar si los exosomas se podrían aislar al atraer PTGFRN, 5x1010 exosomas PTGFRN KO o nativos se agregaron a ya sea perlas de proteína A magnéticas (catálogo #10001D; Invitrogen) o perlas de Proteína A funcionalizadas con 10 µg de un anticuerpo monoclonal anti-PTGFRN personalizado. Cada mezcla de exosoma-perla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS+ 0,1 % v/v TWEEN® 20. Las perlas lavadas se eluyeron al incubar en amortiguador de elución (glicina 20 mM pH 3.6, 2x amortiguador de muestra Laemmli (núm. de catálogo #1610737, Bio-Rad, Inc.), β-mercaptoetanol al 10 %) a 95° C durante 10 minutos y el sobrenadante hervido se analizó mediante PAGE y transferencia Western anti-PTGFRN usando un anticuerpo monoclonal anti-PTGFRN personalizado. El total de proteínas analizado por PAGE mostró una banda que corresponde al peso molecular de PTGFRN solo en la condición de exosoma nativa en la presencia del anticuerpo anti-PTGFRN (Figura 35A). Esta banda se verificó como PTGFRN mediante transferencia Western (Figura 35B). HC y LC corresponden a la cadena pesada y la cadena liviana, respectivamente, del anticuerpo anti-PTGFRN usado para purificación. Estos datos demuestran que los exosomas que contienen PTGFRN se pueden purificar desde una solución al atraer PTGFRN en la superficie del exosoma.

4.9.12. Ejemplo 12: Diversas proteínas heterólogas se pueden fusionar a PTGFRN para facilitar la sobreexpresión en los exosomas

[000230] Los datos experimentales proporcionados en las Figuras 11, 13, 14 y 15

demuestra que varias proteínas se pueden sobreexpresar de forma dramática al usar PTGFRN como un andamiaje de sobreexpresión. La sobreexpresión usando PTGFRN fue considerablemente mejor que la expresión usando otros andamiajes de sobreexpresión de exosomas. Para determinar el ancho de las proteínas que puede ser sobreexpresado exitosamente al ser fusionado a PTGFRN, se generaron varios exosomas diseñados. El Factor VIII (FVIII) es una enzima grande implicada en la cascada de coagulación. Un fragmento de FVIII al que le falta el dominio B (BDDFVIII) se fusionó al extremo N (lado de la parte externa) de PTGFRN y expresado en células HEK293SF. Los exosomas purificados se analizaron mediante PAGE (Figura 36A) y transferencia Western (Figura 36B). Una cadena ligera de FVIII generada por el procesamiento de un FVIII de longitud completa en el cultivo celular se detectó fácilmente en los exosomas modificados genéticamente pero no en los exosomas nativos usando anticuerpos contra FVIII (FIGURA 36B; núm. de catálogo #GMA-8025, Green Mountain Antibodies). Un FVIII de longitud completa tiene un peso molecular de 165kDa, que es considerablemente más grande que el peso molecular de PTGFRN (~120 kDa), que demuestra que las proteínas muy grandes, que incluyen las enzimas, pueden de forma exitosa ser expresadas como fusiones PTGFRN en la superficie de los exosomas.

[000231] Los compañeros de fusión de PTGFRN descritos anteriormente son todas las proteínas con una estructura tridimensionales ordenados. Los péptidos XTEN® (Amunix; Mountain View, CA) tienen secuencias largas, desordenadas, secuencias repetidas con una masa molecular aparente aumentada drásticamente en comparación con su secuencia primaria. Una construcción de fusión que codifica XTEN (una proteína que comprende 288 aminoácidos aleatorizados que incluyen 8 % Ala, 12 % Glu, 18 % Gly, 17 % Pro, 28 % Ser y 17% Thr), un fragmento de PTGFRN (SEQ ID NO: 33) y GFP se expresó de forma estable en células HEK293SF. Los exosomas purificados se aislaron y analizaron mediante PAGE (Figura 37A) y transferencia Western (Figura 37B). Tal como se muestra en la Figura 37B, el GFP de extremo C de la proteína de fusión se detectó mediante transferencia Western, lo cual demuestra la traducción dentro del marco de la proteína de fusión en los exosomas purificados. Estos resultados demuestran que las proteínas no estructuradas también pueden de forma estable ser expresadas como fusiones a PTGFRN. Además, estos resultados muestran que las proteínas heterólogas pueden ser simultáneamente fusionadas a los extremos N y C de PTGFRN y tener como resultado proteínas intactas demostradas en la

superficie de exosoma y lumen, respectivamente. Por lo tanto, PTGFRN es un andamiaje fuerte que es susceptible a las fusiones de proteínas que varían en tamaño de varios aminoácidos (por ejemplo, una etiqueta FLAG) a más de 150 kDa (BDDFVIII) de varias estructuras y clases en cualquiera o ambos de los extremos N o C.

4.9.13. Ejemplo 13: Las secuencias PTGFRN son mejores para expresar proteínas heterólogas en exosomas que otros sistemas de sobreexpresión exosomal

[000232] Los datos en el Ejemplo 3 y la Figura 15 demuestran que PTGFRN es superior a otros andamiajes de exosomas al expresar las proteínas heterólogas en una población a granel de exosomas. Estos resultados no pueden, sin embargo, diferenciar entre la expresión aumentada en un subconjunto de exosomas versus una expresión aumentada de forma uniforme a través de todos los exosomas en una población purificada. Para los fines de desarrollar un terapéutico de exosoma uniforme, se prefiere tener una población de exosomas homogéneos con expresión aumentada en vez de una población de exosomas heterogéneos que incluyen exosomas altamente sobreexpresadas y exosomas no modificados. Para tratar este problema, se han caracterizado exosomas individuales en poblaciones de exosomas en una base de partícula a partícula mediante citometría de nanoflujo usando el nanoanalizador de flujo Flow NanoAnalyzer (NanoFCM, Inc.; Xiamen, China). El nanoanalizador de flujo puede medir la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia de nanopartículas individuales tan pequeñas como 10 nm en diámetro. Los exosomas nativos y los exosomas modificados que codifican las fusiones de GFP luminales a CD9, CD81, o PTGFRN se aislaron de células HEK293SF transfectadas de forma estable y purificadas por ultracentrifugación de gradiente de densidad Optiprep® tal como se describe anteriormente. El análisis mediante nanoanalizador de flujo configurado en excitación 488/emisión 509 demostró que los exosomas CD9-GFP fueron ~48 % positivos, los exosomas CD81-GFP fueron ~80 % positivos, y los exosomas PTGFRN-GFP fueron ~97 % positivos para la expresión de GFP en el análisis de partícula a partícula (Figura 38, izquierda). Además, la intensidad promedio de fluorescencia (MFI) siguió una tendencia similar, con exosomas PTGFRN-GFP que son ~2 veces más brillantes que los exosomas CD81-GFP en general (Figura 38, derecha). Estos datos demuestran que los exosomas modificados para expresar la proteína de fusión PTGFRN-GFP son una población de exosoma homogéneo que expresa altamente la proteína de fusión, y el nivel de expresión general fue mucho mayor que los exosomas modificados

nativos u otros que expresan GFP fusionados a otros andamiajes de exosomas.

[000233] El extremo N de PTGFRN consiste en una secuencia de péptido de señal previsto (aminoácidos 1-21; SEQ ID NO: 8). Para determinar si esta secuencia puede mejorar la expresión de un transgén en exosomas purificados, el péptido señal PTGFRN se comparó con un péptido señal de una proteína heteróloga, DsbA11. Las células HEK293SF fueron transfectadas de forma estable con construcciones de expresión que codifican (i) PTGFRN de tipo salvaje de longitud completa fusionada a GFP; (ii) un corto fragmento de PTGFRN (454-PTGFRN; SEQ ID NO: 33) que contiene el péptido señal PTGFRN endógeno fusionado a GFP; o (iii) un fragmento corto de PTGFRN (454-PTGFRN; SEQ ID NO: 33) que tiene el péptido señal PTGFRN endógeno reemplazado con un péptido señal del gen bacteriano DsbA11 (Koerber et ál., Journal of molecular biology, 427.2 (2015): 576-586), fusionado a GFP Tal como se muestra en la Figura 39, las células que expresan la proteína de fusión GFP que contiene PTGFRN-GFP truncado o de longitud completa que contiene el péptido señal PTGFRN endógeno produjo exosomas que incluyen GFP a niveles similarmente elevados. Las células que expresan la proteína de fusión GFP que contiene PTGFRN truncado con el péptido señal DsbA11, sin embargo, produjo exosomas que expresan GFP a niveles mucho más bajos. Estos resultados demuestran que el péptido señal PTGFRN promueve la decoración de alta densidad de exosomas modificados genéticamente.

4.9.14. Ejemplo 14: Fragmentos de anticuerpo se pueden expresar funcionalmente en la superficie de los exosomas usando PTGFRN como un andamio.

[000234] Los datos experimentales descritos anteriormente demuestran que PTGFRN es un andamio fuerte susceptible de sobreexpresión de muchas clases de proteínas. Los anticuerpos y fragmento de unión al antígeno de anticuerpos son una clase importante de péptidos terapéuticos con aplicaciones diversas en el tratamiento de muchas enfermedades. Para determinar si un fragmento de unión al antígeno funcional se podía expresar en los exosomas usando PTGFRN como un andamio, las células HEK29SF fueron establemente transfectadas para sobreexpresar una proteína de fusión que consiste en una sola cadena Fab que reconoce la lectina CLEC9A (clon 10B4, Millipore Sigma, núm. de catálogo # 04-148; y tal como se describe en Caminschi et ál., Blood, 112: 8 (2008)), PTGFRN de longitud completa, GFP, y una etiqueta FLAG (Figura 40A). Exosomas purificados de Optiprep™

fueron ejecutados en un gel de proteína libre de manchas y transferidos con un anticuerpo contra la etiqueta FLAG que muestra la sobreexpresión considerable de la proteína de fusión de longitud completa (Figura 40B).

[000235] Los exosomas anti-CLEC9A purificados se evaluaron mediante BLI para unirse al CLEC9A-Fc inmovilizado (R&D Systems, núm. de catálogo # 6049-CL-050; y tal como se describe en Uto et ál., Nature Communications 7: 11273 (2016)). CLEC9A-Fc se unió a las sondas de Proteína A a una concentración final de 0.5 µg/ml en PBS + 0,1 % (v/v) Tween20, y se incubó con 1x1011 exosomas no modificados o exosomas modificados para expresar la proteína de fusión que consiste en una sola cadena Fab que reconoce la lectina CLEC9A, un PTGFRN de longitud completa, GFP, y una etiqueta FLAG ("αCLEC9A-PTGFRN") mostrada en la Figura 40A. Tal como se muestra en la Figura 41, solo los exosomas anti-CLEC9A-PTGFRN unidos a la sonda CLEC9A-Fc, que demuestran el reconocimiento funcional entre un marcador de superficie de célula y exosomas modificados genéticamente para sobreexpresar un fragmento de unión al antígeno.

4.9.15. Ejemplo 15: Células madre mesenquimales expresan PTGFRN

[000236] Los exosomas terapéuticos de varios tipos de células se han usado para investigación y fines clínicos. Las células madre de varias variedades, que incluyen células madre precursoras neurales y células madre mesenquimales han demostrado que tienen beneficio terapéutico, pero la mayoría de los estudios que usan estas células se basan en exosomas naturales no modificados. Sería deseable, por lo tanto, modificar estas líneas celulares para sobreexpresar los ligandos específicos u otras proteínas objetivo. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea fueron cultivadas en un sistema de biorreactor en 3D basado en microportador de 1,1 L. Después de cinco días de expansión celular, el medio de crecimiento se descartó, y las células se cultivaron durante otros tres días en medio libre de suero. El medio libre de suero se filtró a través de un filtro de 100 µm para quitar microportadores y se centrifugó a velocidad baja para quitar desechos de célula y contaminantes. El medio clarificado fue luego purificado por ultracentrifugación de gradiente de densidad Optiprep™ tal como se describen en el Ejemplo 1. Los exosomas purificados de células HEK293SF y MSC fueron analizados por transferencia Western para PTGFRN, y las proteínas de exosomas establecidas ALIX, TSG101, CD63, CD9, y CD81. Tal como se muestra en la Figura 42, todas estas proteínas se expresaron en ambas células HEK293SF y

MSC, lo que sugiere que las proteínas de exosoma, por ejemplo, PTGFRN, se pueden usar como un andamio para generar exosomas MSC modificados genéticamente en la superficie.

4.9.16. Ejemplo 16: PTGFRN se puede sobreexpresar en exosomas de células no humanas

[000237] Los resultados en los Ejemplos 9 y 15 demuestran que numerosas células derivadas de humanos expresan PTGFRN y las otras proteínas de exosomas novedosas identificadas en el Ejemplo 1. Para determinar si PTGFRN se puede usar como una proteína de andamiaje, las células de ovario de hámster chino (CHO) fueron establemente transfectadas con un plásmido que expresa PTGFRN de longitud completa fusionado a una etiqueta FLAG ("el plásmido PTGFRN-FLAG"). Los exosomas se purificaron de células HEK293SF de tipo salvaje, células HEK293SF transfectadas con el plásmido PTGFRN-FLAG, células CHO, y células CHO transfectadas con el plásmido PTGFRN-FLAG usando el método descrito en el Ejemplo 1. Tal como se muestra en las Figuras 43A-C, PTGFRN-FLAG se sobreexpresó exitosamente en las células HEK293SF y las células CHO tal como fueron detectadas por PAGE libre de manchas (Figura 43A) y transferencia Western con anticuerpos contra PTGFRN (Figura 43B) y FLAG (Figura 43C). Este resultado demuestra que las células no humanas (por ejemplo, células CHO) así como células humanas (por ejemplo, células HEK) pueden producir exosomas que sobreexpresan PTGFRN humano. Este resultado indica que PTGFRN es una proteína de andamiaje universal para generar exosomas modificados genéticamente de muchos tipos de células diferentes y especies.

4.9.17. Ejemplo 17: PTGFRN proporciona carga mejorada de carga luminal en comparación con proteínas de exosoma convencionales

[000238] Ejemplos previos demostraron que la sobreexpresión de PTGFRN tiene como resultado exosomas con mayor cantidad de proteínas y/o actividad en comparación con las proteínas de exosomas convencionales (por ejemplo, Ejemplo 13; Figura 15). Dado que PTGFRN es una proteína transmembrana y tiene su extremo N en la cara extravesicular y su extremo C en el lumen de exosoma, PTGFRN puede ser una proteína de andamiaje adecuada para cargar el lumen de los exosomas con proteínas de carga. Para investigar esta posibilidad, las células HEK293SF se diseñaron para expresar de forma estable un sistema indicador bipartita que usa la molécula pequeña rapamicina para facilitar las interacciones proteína-proteína. Cualquiera de CD9 (Figura 44A) o PTGFRN (Figura 44B) se fusionaron a

GFP, una etiqueta FLAG y FKBP. Las células también se modificaron genéticamente para expresar de forma estable mCherry fusionado a una etiqueta V5 y FRB. En la presencia de la molécula pequeña Rapamicina, las proteínas FRB y FKBP dimerizan para formar un complejo estable. Las células de cultivo en la presencia de Rapamicina por lo tanto pueden permitir la asociación entre la proteína de carga mCherry y ya sea CD9 o PTGFRN durante la biogénesis de exosoma. Los exosomas purificados de estas células se lavarán para quitar la rapamicina, lo que permite la liberación del mCherry como carga soluble en el lumen de exosoma. (Figuras 44A-B).

[000239] Las células indicadoras de carga CD9 fueron cultivadas en la presencia de Rapamicina durante 0, 1 o 2 días. Las células indicadoras de carga PTGFRN fueron cultivadas en la presencia de Rapamicina durante 5 días. Los exosomas fueron purificados de los cultivos celulares en la ausencia de Rapamicina que permite la liberación de la carga en el lumen de exosoma. Las muestras de exosoma purificadas fueron ejecutadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y analizadas para ver la presencia de proteína total y transferencia Western contra la proteína de andamiaje (anti-FLAG) o la carga mCherry (anti-V5). Las muestras de PTGFRN fueron cargadas en el gel de poliacrilamida con mucho menos material en comparación con las muestras de CD9, pero PTGFRN fue fácilmente detectable mediante transferencia Western de FLAG. La carga mCherry también se detectó en un nivel comparable entre las muestras de andamiaje de CD9 y PTGFRN (Figura 45A). Cuando las bandas de proteínas de carga y andamiaje se midieron mediante densitometría y se normalizaron a la cantidad de exosomas recolectados, el andamio de PTGFRN se expresó a un nivel más alto y fue capaz de cargar mucho más cargamento mCherry contenido en las proteínas de andamiaje CD9 (Figura 45B). Estos datos indican que PTGFRN se puede expresar como una proteína de fusión a un péptido de carga luminal a un alcance mayor que la proteína de exosoma convencional CD9, y que el uso de resultados PTGFRN en mayor cargamento de carga dirigida en comparación con la proteína de exosoma convencional. Estos datos indican que los sistemas complejos, de modificación genética multiparte se pueden usar en el contexto de un andamio PTGFRN y tienen como resultado el cargamento de carga fuerte en el lumen del exosoma.

4.9.18. Ejemplo 18: Generación de proteínas de exosomas modificados

[000240] Un polinucleótido que codifica una proteína de exosoma modificada se genera

usando un polinucleótido que codifica una proteína de exosoma entera o una proteína de exosoma truncada. Una proteína de exosoma truncada específica se selecciona mediante el análisis de varias proteínas de exosomas truncadas y la selección de una proteína truncada que tiene capacidades óptimas para incorporar en las membranas de exosomas e interactúa con un agente de unión. El direccionamiento de las proteínas truncadas a las membranas de exosomas se evalúa mediante citometría de nanoflujo.

[000241] Un polinucleótido que codifica una proteína de exosoma modificada se genera al agregar un polinucleótido que codifica una etiqueta de afinidad (glutatión-S-transferasa, S-péptido, etiqueta FLAG, GFP, etc.) al polinucleótido que codifica una proteína de exosoma entera o truncada (por ejemplo, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, y transportadores de ATP). El polinucleótido modificado expresa una proteína de fusión. El polinucleótido está además modificado para mejorar su direccionamiento en las membranas de exosoma y/o su afinidad a un agente de unión.

[000242] Un tipo diferente de polinucleótido que codifica una proteína de exosoma modificada se genera al agregar un polinucleótido que codifica un péptido terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido antimicrobiano, una variante o un fragmento de estos) al polinucleótido que codifica una proteína de exosoma entera o truncada (por ejemplo, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, y transportador de ATP). El polinucleótido modificado expresa una proteína de fusión presentada en la superficie de un exosoma. La proteína de fusión mantiene una actividad terapéutica del péptido terapéutico.

[000243] Un tipo diferente de polinucleótido que codifica una proteína de exosoma modificada se genera al agregar un polinucleótido que codifica un resto de direccionamiento (por ejemplo, un resto de direccionamiento específico para un órgano, tejido o célula específico) al polinucleótido que codifica una proteína de exosoma entera o truncada (por ejemplo, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, y transportador de ATP). El polinucleótido modificado expresa una proteína de fusión presentada en la superficie de un exosoma. La proteína de fusión permite al exosoma que sea dirigido a un órgano, tejido o célula específico.

[000244] La ubicación de las proteínas de exosoma modificadas en la superficie del exosoma también se evalúa mediante citometría de nano flujo.

4.9.19. Ejemplo 19: Generación de exosomas modificados genéticamente en la superficie

[000245] Una célula productora que genera exosomas modificados genéticamente en la superficie se elabora al introducir una secuencia exógena que codifica una proteína de exosoma o una variante o un fragmento de la proteína de exosoma. Un plásmido que codifica una proteína de exosoma se transfecta de forma temporal para inducir la expresión de alto nivel en la proteína de exosoma en la superficie de exosoma. Un plásmido que codifica una proteína de exosoma modificada se transfecta de forma temporal para producir exosomas que tienen la proteína de exosoma modificada en la superficie.

[000246] Un polinucleótido que codifica una proteína de exosoma, una variante o un fragmento de una proteína de exosoma, o una secuencia exógena que codifica una etiqueta de afinidad, un péptido terapéutico o un resto de direccionamiento es establemente transformado en una célula productora para producir exosomas modificados genéticamente en la superficie. La secuencia exógena que codifica una etiqueta de afinidad, un péptido terapéutico o un resto de direccionamiento se inserta en un sitio genómico que codifica una proteína de exosoma para generar una proteína de fusión que comprende: la etiqueta de afinidad unida a la proteína de exosoma. Un polinucleótido que codifica una proteína de exosoma modificada es activado en un sitio genómico que codifica una proteína de exosoma.

[000247] Una línea celular productora se genera al transfectar de forma estable al menos dos polinucleótidos, cada uno que codifica una proteína de exosoma, una variante o un fragmento de una proteína de exosoma, o un péptido exógeno (por ejemplo, etiqueta de afinidad, resto de direccionamiento, péptido terapéutico). Una línea productora diferente también se genera al insertar dos o más secuencias exógenas (por ejemplo; secuencias exógenas que codifican una etiqueta de afinidad, un marcador, un péptido de direccionamiento, un péptido terapéutico, etc.) en múltiples sitios genómicos, dentro o en una cercana proximidad a la secuencia genómica que codifica una proteína de exosoma, para generar un exosoma modificado genéticamente en la superficie que comprende múltiples proteínas de exosomas modificados. Cada una de la pluralidad de proteínas de exosomas modificadas se dirige a la superficie de los exosomas. Los exosomas tienen afinidades respecto a dos agentes de unión diferentes y se purifican mediante cualquiera o ambos de los agentes de unión.

4.9.20. Ejemplo 20: Aislamiento, purificación y subfraccionamiento de exosomas mediante purificación de afinidad

[000248] Los agentes de unión para purificación de afinidad de los exosomas se desarrollan mediante biocribado/evolución dirigida que se eluyen en condiciones leves.

[000249] El agente de unión está unido a un soporte sólido (por ejemplo, una perla de agarosa porosa) y se forman en un sistema de cromatografía convencional (por ejemplo, GE AKTA). Una muestra que contiene exosomas se aplica a la columna para purificación de afinidad.

INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

[000250] Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y otros documentos citados en esta solicitud se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia a todos los efectos tal como si se indicara la incorporación mediante referencia de cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento individualmente a todos los efectos.

EQUIVALENTES

[000251] La presente descripción proporciona, entre otros, composiciones de cannabinoides y composiciones de entorno. La presente descripción también proporciona método para tratar enfermedades neurodegenerativas al administrar el cannabinoide y las composiciones de entorno. Aunque se han ilustrado y descrito varias modalidades específicas, la memoria descriptiva anterior no tiene naturaleza restrictiva. Se comprenderá que se pueden realizar varios cambios sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Diversas variantes resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente memoria descriptiva.