



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월03일
(11) 등록번호 10-2761577
(24) 등록일자 2025년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) A61K 35/12 (2020.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2025.01) A61K 9/50 (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0012 (2013.01)
A61K 35/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7036187
(22) 출원일자(국제) 2018년05월08일
심사청구일자 2021년05월07일
(85) 번역문제출일자 2019년12월06일
(65) 공개번호 10-2020-0034668
(43) 공개일자 2020년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/031515
(87) 국제공개번호 WO 2018/208728
국제공개일자 2018년11월15일
(30) 우선권주장
62/502,998 2017년05월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02011058052 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
플래그쉽 파이어니어링 이노베이션스 브이, 인크.
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55
(72) 발명자
폰 말트잔, 제프리 에이.
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55
밀워드, 존 마일스
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 33 항

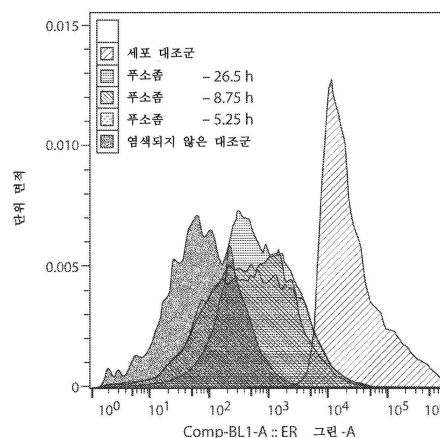
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 막 융합을 촉진시키기 위한 조성물 및 그의 용도

(57) 요약

일부 양태에서, 푸소젠(fusogen)을 포함하는, 막 봉밀된 조제물을 포함하는 푸소솜(fusosome) 조성물 및 방법이 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 푸소솜은 표적 세포에 융합하여, 이로써 복합 생물체를 표적 세포 세포질에 전달할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 9/127 (2025.01)
A61K 9/5068 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)

(72) 발명자

미, 마이클 트라비스

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

루벤스, 제이콥 로젠블룸

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

스테빈스, 나탄 윌슨

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

김슨, 물리 크리스찬

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

고든, 닐 프란시스

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

장, 보

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

트뤼도, 카일 마빈

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

하틀리, 브리검 제이

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

푸티리, 타마르 로즈

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

마다비아니, 키아나

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

도빈, 매튜 밀른즈

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 8쓰 플로어 캠프리지 파크웨이 55

(56) 선행기술조사문헌

W02015110957 A2
W02006028786 A2
W02006059141 A2
W02012149376 A2
W02016138525 A1

(30) 우선권주장

62/575,147 2017년10월20일 미국(US)
62/595,862 2017년12월07일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀(fusosome)을 포함하는 푸소좀 조성물이며,

상기 복수의 푸소좀의 푸소좀은

- (a) 지질 이중층,
- (b) 세포기질을 포함하며, 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는 내강,
- (c) 상기 지질 이중층에 배치된, 외인성 또는 과발현된 푸소젠(fusogen),
- (d) 적재물(cargo),
- (e) 표적 세포 상의 세포 표면 마커에 특이적인 표적화 모이어티

를 포함하고,

상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며,

상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 총 단백질의 1% 미만이고,

상기 복수의 푸소좀은, 세포내이입 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉한 경우의 상기 기준 표적 세포 집단 내 세포와 비교하여, 세포내이입 저해제의 존재 하에 표적 세포 집단과 접촉 시에 적어도 30% 초과량의 적재물을 상기 표적 세포 집단에 전달하는 것이고,

상기 외인성 또는 과발현된 푸소젠은 니파(Nipah) 바이러스 F와 G 단백질, 홍역 바이러스 F와 H 단백질, 투파이아(tupaia) 파라믹소바이러스(paramyxovirus) F와 H 단백질, 파라믹소바이러스 F와 G 단백질 또는 F와 H 단백질 또는 F와 HN 단백질, 헨드라(Hendra) 바이러스 F와 G 단백질, 헤니파바이러스(Henipavirus) F와 G 단백질, 모빌리바이러스(Morbilivirus) F와 H 단백질, 레스피로바이러스(respirovirus) F와 HN 단백질, 센다이(Sendai) 바이러스 F와 HN 단백질, 루블라바이러스(rubulavirus) F와 HN 단백질, 또는 아볼라바이러스(avulavirus) F와 HN 단백질, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인

푸소좀 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적재물이 디나민-독립적 경로, 리소좀 산성화-독립적 경로, 거대음작용(macropinocytosis)-독립적 경로 또는 액틴-독립적 경로를 통해 상기 표적 세포 집단의 세포에 진입하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 푸소젠에 포함되거나 또는 별개의 분자에 포함되는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 4

공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물이며,

상기 복수의 푸소좀의 푸소좀은

- (a) 지질 이중층,
- (b) 세포기질을 포함하며, 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는 내강,
- (c) 자연-발생 푸소젠의 일부가 아닌 서열을 갖는 표적화 모이어티를 포함하고, 상기 지질 이중층에 배치된, 외인성 또는 과발현된 재-표적화된 푸소젠이며,

상기 표적화 모이어티는 표적 세포 상의 세포 표면 마커에 특이적인 것인 재-표적화된 푸소좀,

(d) 적재물

을 포함하고,

상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며,

상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 상기 푸소좀 조성물 내 총 단백질의 1% 미만이고,

여기서

(i) 상기 복수의 푸소좀이 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단 또는 기준 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시에 상기 적재물은 비-표적 세포 또는 기준 세포보다 적어도 10-배 더 많은 표적 세포로 전달되거나, 또는

(ii) 상기 복수의 푸소좀의 푸소좀은 비-표적 세포 또는 기준 세포보다 표적 세포와 적어도 50%만큼 더 높은 속도로 융합하는 것이고,

상기 외인성 또는 과발현된 푸소좀은 니파 바이러스 F와 G 단백질, 홍역 바이러스 F와 H 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F와 H 단백질, 파라믹소바이러스 F와 G 단백질 또는 F와 H 단백질 또는 F와 HN 단백질, 헨드라 바이러스 F와 G 단백질, 헤니파바이러스 F와 G 단백질, 모빌리바이러스 F와 H 단백질, 레스피로바이러스 F와 HN 단백질, 쉐다이 바이러스 F와 HN 단백질, 루블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 아볼라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인

푸소좀 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포 표면 마커가 피부 세포, 심근세포, 간세포, 장(intestinal) 세포, 소장 세포, 췌장 세포, 뇌 세포, 전립선 세포, 폐 세포, 결장 세포 또는 골수 세포의 세포 표면 마커인 푸소좀 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서, 표적 세포 집단과 접촉 시에 엔도솜 또는 리소솜 이외의 표적 세포 위치에 적재물을 전달하는 푸소좀 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제4항에 있어서, 표적 세포 집단과 접촉 시에 세포기질인 표적 세포 위치에 적재물을 전달하는 푸소좀 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제4항에 있어서, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 미만의 적재물이 엔도솜 또는 리소솜에 전달되는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복수의 푸소좀의 푸소좀이 엑소솜, 미세소낭(microvesicle) 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복수의 푸소좀의 푸소좀이 적어도 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm 또는 1500 nm의 직경 평균 크기를 갖는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복수의 푸소좀의 푸소좀이 100 nm, 80 nm, 60 nm, 40 nm 또는 30 nm 미만의 직경 평균 크기를 갖는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 공급원 세포가 호중구, HEK293 세포, 과립구, 간엽 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 유도 만능(pluripotent) 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포, 뉴런 또는 망막 신경 세포로부터 선택되는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복수의 푸소좀에서의 푸소좀이 세포생물체(cytobiologic)를 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복수의 푸소좀에서의 푸소좀이 제핵(enucleated) 세포를 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 푸소젠이 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성인 푸소좀 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 푸소젠이 푸소좀 1개 당 적어도 10 복사체의 복사수(copy number)로 존재하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 적재물이 외인성 단백질 또는 외인성 핵산을 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 적재물이 세포기질 단백질 또는 막 단백질을 포함하거나 인코딩하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 적재물이 치료제를 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 적재물이 푸소좀 1개 당 적어도 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 또는 200 복사체의 복사수로 존재하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 21

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 푸소젠의 복사수 : 상기 적재물의 복사수의 비가 1000:1 내지 1:1, 500:1 내지 1:1, 250:1 내지 1:1, 150:1 내지 1:1, 100:1 내지 1:1, 75:1 내지 1:1, 50:1 내지 1:1, 25:1 내지 1:1, 20:1 내지 1:1, 15:1 내지 1:1, 10:1 내지 1:1, 5:1 내지 1:1, 2:1 내지 1:1, 또는 1:1 내지 1:2인 푸소좀 조성물.

청구항 22

제1항 또는 제4항에 있어서, 하기 중 하나 이상인 푸소좀 조성물:

- a) 상기 푸소좀 조성물이 100~10,000, 500~5,000, 1000~5000, 2000~4000, 2500~3500, 2900~2930, 2910~2915, 또는 2912.0의, CD63에 대한 푸소젠의 비를 가짐, 또는
- b) 상기 푸소좀 조성물이 5~35, 10~30, 15~25, 16~19, 18~19, 또는 18.6의, CD63에 대한 단백질 적재물의 비를 가짐, 또는

c) 상기 푸소좀 내 15%, 20%, 또는 25% 미만의 단백질이 엑소좀 단백질임.

청구항 23

제1항 또는 제4항에 있어서, 하기 중 하나 이상인 푸소좀 조성물:

- a) 상기 푸소좀이 상기 푸소좀 중 총 단백질의 1~30%, 5~20%, 10~15%, 12~15%, 13~14%, 또는 13.6%로 포함됨,
- b) 상기 푸소좀은 GAPDH에 대한 비가 20~120, 40~100, 50~90, 60~80, 65~75, 68~70, 또는 69임,
- c) 상기 푸소좀은 CNX에 대한 비가 200~900, 300~800, 400~700, 500~600, 520~590, 530~580, 540~570, 550~560, 또는 558.4임,
- d) 상기 푸소좀 내 단백질의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%가 리보솜 단백질이거나,

상기 푸소좀 내 단백질의 1%~20%, 3%~15%, 5%~12.5%, 7.5%~11%, 또는 8.5%~10.5%, 또는 9%~10%가 리보솜 단백질임.

청구항 24

제1항 또는 제4항의 푸소좀 조성물 및

약제학적으로 허용 가능한 담체

를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 적재물이 치료제를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 26

치료제를 대상체에게 전달하기 위한 제1항 또는 제4항의 푸소좀 조성물을 제조하는 방법이며,

상기 푸소좀 조성물의 적재물은 치료제이고,

상기 푸소좀 조성물은 상기 치료제가 전달되도록 하는 양 및/또는 시간으로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제1항 또는 제4항의 푸소좀 조성물을 대상체에게 전달하기 위한, 상기 푸소좀 조성물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

푸소좀 조성물을 제조하는 방법이며,

- a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 푸소좀 조성물을 제공하는 단계, 및
- b) 푸소좀을 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로서 제제화하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

푸소좀 조성물을 제조하는 방법이며,

- a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 푸소좀 조성물을 제공하는 단계, 및
- b) 복수의 푸소좀으로부터의 하나 이상의 푸소좀을 검정하여, 하기 인자 중 하나 이상의 존재 또는 수준을 결정하는 단계:

- (i) 면역원성 분자,
 - (ii) 병원체, 또는
 - (iii) 오염물, 및
- c) 상기 인자 중 하나 이상이 기준값보다 낮은 경우, 상기 복수의 푸소좀 또는 푸소좀 조성물을 방출용으로 승인하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물이며,
상기 복수의 푸소좀의 푸소좀은

- (a) 지질 이중층,
 - (b) 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강,
 - (c) 상기 지질 이중층에 배치된, 외인성 또는 과발현된 푸소젠, 및
 - (d) 적재물,
 - (e) 표적 세포 상의 세포 표면 분자에 특이적인 표적화 모이어티
- 를 포함하고,

상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며,

하기 중 하나 이상이며:

- i) 상기 푸소젠이 적어도 1,000 복사체의 복사수로 존재함,
- ii) 상기 푸소좀이 적어도 1,000 복사체의 복사수의 치료제를 포함함,
- iii) 상기 푸소좀이 지질을 포함하며, 여기서 CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포 내 상응하는 지질 수준의 75% 이내임,
- iv) 상기 푸소좀이 공급원 세포의 것과 유사한 단백질(proteomic) 조성을 포함함,
- v) 상기 푸소좀이 신호 전달을 할 수 있음,
- vi) 상기 푸소좀이 대상체에게 투여되면 조직을 표적화함, 또는
- vii) 상기 공급원 세포가 호중구, 과립구, 간엽 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포, 뉴런, 또는 망막 신경 세포로부터 선택됨,

상기 외인성 또는 과발현된 푸소젠은 니파 바이러스 F와 G 단백질, 홍역 바이러스 F와 H 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F와 H 단백질, 파라믹소바이러스 F와 G 단백질 또는 F와 H 단백질 또는 F와 HN 단백질, 헨드라 바이러스 F와 G 단백질, 헤니파바이러스 F와 G 단백질, 모빌리바이러스 F와 H 단백질, 레스피로바이러스 F와 HN 단백질, 센다이 바이러스 F와 HN 단백질, 루블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 아볼라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인

푸소좀 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 바이러스 캡시드 단백질, 또는 DNA 통합 폴리펩타이드를 포함하는 푸소좀 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 적재물이 바이러스 게놈을 포함하는 것인 푸소좀 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 핵산을 상기 표적 세포에 전달할 수 있는 푸소좀 조성물.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2017년 5월 8일에 출원된 미국 일련 번호 62/502,998, 2017년 10월 20일에 출원된 미국 일련 번호 62/575,147, 및 2017년 12월 7일에 출원된 미국 일련 번호 62/595,862에 대해 우선권을 주장하며, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0003] 복합 생물제(complex biologics)는 여러 가지 질병에 대한 유망한 치료적 후보이다. 그러나, 형질막이 세포와 세포의 공간 사이에서 장벽으로서 작용하기 때문에, 큰(large) 생물학적 작용제를 세포 내로 전달하는 것은 어렵다. 복합 생물제를 대상체의 세포 내로 전달하는 새로운 방법이 당업계에서 필요한 실정이다.

발명의 내용

[0004] 막 융합은 수정, 발달, 면역 반응 및 종양발생처럼 다양한 생물학적 과정에 필요하다. 본 개시내용은 복합 생물제 적재물(cargo)을 세포에 전달하는 융합-기반 방법을 제공한다.

[0005] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용은 지질 이중층, 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강(lumen), 및 푸소젠(fusogen)을 포함하는 푸소솜(fusosome)을 제공한다. 푸소솜은 예를 들어, 내강 또는 지질 이중층 내의 적재물을 표적 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 적재물은 예를 들어 치료 단백질, 핵산 및 저분자를 포함한다.

[0006] 일부 양태에서, 본 개시내용은 푸소솜을 제공하며, 상기 푸소솜은:

[0007] (a) 지질 이중층,

[0008] (b) 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강(예를 들어 세포기질(cytosol)을 포함함);

[0009] (c) 외인성 또는 과발현된 푸소젠으로서, 예를 들어, 상기 푸소젠은 상기 지질 이중층 내에 배치되는, 푸소젠을 포함하며,

[0010] 상기 푸소솜은 공급원 세포로부터 유래되고;

[0011] 상기 푸소솜은 부분적인 또는 완전한 핵 불활성화(예를 들어 핵 제거)를 가진다.

[0012] 일부 구현예에서, 하기 중 하나 이상이 존재한다:

[0013] i) 푸소솜은 세포생물제(cytobiologic)를 포함하거나 세포생물제에 의해 포함되며;

[0014] ii) 푸소솜은 제핵(enucleated) 세포를 포함하며;

[0015] iii) 푸소솜은 불활성화된 핵을 포함하며;

- [0017] iv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 비-표적 세포보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 또는 100-배만큼 더 높은 속도(rate)로 융합하며;
- [0018] v) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 다른 푸소좀보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배 또는 100-배만큼 더 높은 속도로 융합하며;
- [0019] vi) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 푸소좀 내의 작용제가 24, 48 또는 72시간 후 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 표적 세포에 전달되는 속도로 표적 세포와 융합하며;
- [0020] vii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 29의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체 이하의 복사수(copy number)로 존재하며;
- [0021] viii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 43 또는 156의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체 이하의 복사수의 치료제를 포함하며;
- [0022] ix) 푸소좀의 복사수 : 치료제의 복사수의 비는 1,000,000:1 내지 100,000:1, 100,000:1 내지 10,000:1, 10,000:1 내지 1,000:1, 1,000:1 내지 100:1, 100:1 내지 50:1, 50:1 내지 20:1, 20:1 내지 10:1, 10:1 내지 5:1, 5:1 내지 2:1, 2:1 내지 1:1, 1:1 내지 1:2, 1:2 내지 1:5, 1:5 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1:20 내지 1:50, 1:50 내지 1:100, 1:100 내지 1:1,000, 1:1,000 내지 1:10,000, 1:10,000 내지 1:100,000, 또는 1:100,000 내지 1:1,000,000이며;
- [0023] x) 푸소좀은 공급원 세포의 지질 조성물과 실질적으로 유사한 지질 조성물을 포함하거나, CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포 내 상응하는 지질 수준의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이내로 있으며;
- [0024] xi) 푸소좀은 예를 들어 실시예 42 또는 155의 검정법을 사용하여, 공급원 세포의 단백체(proteomic) 조성물과 유사한 단백체 조성물을 포함하며;
- [0025] xii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 49의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 단백질에 대한 지질의 비를 공급원 세포에서 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0026] xiii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 50의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 단백질의 비를 공급원 세포 내 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0027] xiv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 51 또는 159의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 지질의 비를 공급원 세포 내 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0028] xv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 75의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 반감기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내인 반감기를 대상체, 예를 들어 마우스에 가지며;
- [0029] xvi) 푸소좀은 예를 들어 실시예 64의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 음성 대조군, 예를 들어 글루코스의 부재 하의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과(예를 들어 약 11.6% 초과)만큼의 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG)를 막을 가로질러 수송하며;
- [0030] xvii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 66의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 마우스 배아 섬유아세포에서의 에스터라제 활성의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 에스터라제 활성을 내강에 포함하며;
- [0031] xviii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 68에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 시트레이트 신타제(synthase) 활성의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%

이내인 대사 활성 수준을 포함하며;

- [0032] xix) 푸소좁은 예를 들어 실시예 69에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 호흡 수준의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 호흡 수준(예를 들어 산소 소모율)을 포함하며;
- [0033] xx) 푸소좁은 예를 들어 실시예 70의 검정법을 사용하여, 최대 18,000, 17,000, 16,000, 15,000, 14,000, 13,000, 12,000, 11,000 또는 10,000 MFI의 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좁은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 다른 유사한 푸소좁의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좁은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 대식세포의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함하며;
- [0034] xxi) 푸소좁은 예를 들어 실시예 39의 검정법에 의해, 공급원 세포의 miRNA 함량 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 miRNA 함량 수준을 가지며;
- [0035] xxii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 47의 검정법에 의해, 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비보다 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 이내에서, 예를 들어 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비의 1%~2%, 2%~3%, 3%~4%, 4%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는 80%~90% 이내에서 가용성 : 불용성 단백질 비를 가지며;
- [0036] xxiii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 48의 검정법에서, 예를 들어 질량 분광법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 LPS 함량의 5%, 1%, 0.5%, 0.01%, 0.005%, 0.0001%, 0.00001% 이하보다 작은 LPS 수준을 가지며;
- [0037] xxiv) 푸소좁은 신호 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 실시예 63의 검정법을 사용하여, 음성 대조군, 예를 들어 인슐린의 부재 하에서의 다른 유사한 푸소좁보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과만큼, 인슐린에 반응하여, 예를 들어 세포의 신호, 예를 들어 AKT 인산화, 또는 인슐린에 반응하여 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG) 흡수를 전달할 수 있으며;
- [0038] xxv) 푸소좁은 대상체, 예를 들어 마우스에게 투여 시, 조직, 예를 들어 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이 또는 눈을 표적화하며, 예를 들어 실시예 87 또는 100의 검정법에 의해, 예를 들어 투여된 푸소좁 집단 내의 푸소좁 중 적어도 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%가 24, 48 또는 72시간 후 표적 조직에 존재하며;
- [0039] xxvi) 푸소좁은 예를 들어 실시예 71의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 골수 기질 세포(BMSC)에 의해 유도되는 근접분비(juxtacrine) 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 근접분비-신호전달 수준을 가지며;
- [0040] xxvii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 72의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 대식세포에 의해 유도되는 측분비(paracrine) 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 더 큰 측분비-신호전달 수준을 가지며;
- [0041] xxviii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 73의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포 내 중합된 액틴 수준과 비교하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내의 수준에서 액틴을 중합하며;
- [0042] xxix) 푸소좁은 예를 들어 실시예 74의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포의 막 전위의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내에서 막 전위를 갖거나, 푸소좁은 약 -20 내지 -150 mV, -20 내지 -50 mV, -50 내지 -100 mV, 또는 -100 내지 -150 mV의 막 전위를 가지며;
- [0043] xxx) 푸소좁은 예를 들어 실시예 57의 검정법을 사용하여, 예를 들어 공급원 세포 또는 상기 공급원 세포와 동일한 유형의 세포의 유출(extravasation) 속도의 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 속도에서 혈관으로부터 유출될 수 있고, 예를 들어 공급원 세포는 호중구, 림프구, B 세포, 대식세포 또는 NK 세포이며;
- [0044] xxxi) 푸소좁은 세포막, 예를 들어 내피 세포막 또는 혈액 뇌 장벽을 가로지를 수 있으며;

- [0045] xxxii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 62의 검정법을 사용하여, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 마우스 배아 섬유아세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 속도로 단백질을 분비할 수 있으며;
- [0046] xxxiii) 푸소좀은 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP; good manufacturing practice) 표준을 충족시키며;
- [0047] xxxiv) 푸소좀은 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었으며;
- [0048] xxxv) 푸소좀은 미리 결정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지는, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없으며;
- [0049] xxxvi) 푸소좀은 미리 결정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지는, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없으며;
- [0050] xxxvii) 푸소좀은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, 낮은 면역원성을 가지며;
- [0051] xxxviii) 공급원 세포는 호중구, 과립구, 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택되며; 또는
- [0052] xxxix) 공급원 세포는 293 세포, HEK 세포, 인간 내피 세포, 또는 인간 상피 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 줄기세포 이외의 것이다.
- [0053] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 푸소좀을 제공하며, 상기 푸소좀은:
- [0054] a) 지질 이중층, 및 수용액, 예를 들어 물과 혼화성인 내강으로서, 여기서, 상기 푸소좀은 공급원 세포로부터 유래되는, 지질 이중층 및 내강,
- [0055] b) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 푸소젠, 및
- [0056] c) 상기 내강에 배치된 세포소기관(organelle), 예를 들어 치료적 유효수의 세포소기관
- [0057] 을 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 하기 중 하나 이상이 존재한다:
- [0059] i) 공급원 세포는 내피 세포, 대식세포, 호중구, 과립구, 백혈구, 줄기세포(예를 들어 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포), 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택되며;
- [0060] ii) 세포소기관은 골지체, 리소좀, 소포체, 미토콘드리아, 액포, 엔도솜, 첨체(acrosome), 자가포식소체, 중심립, 글리코솜, 글리옥시솜, 하이드로게노솜(hydrogenosome), 멜라노솜, 미토솜(mitosome), 자포(cnidocyst), 퍼옥시솜, 프로테아솜, 소낭 및 스트레스 과립으로부터 선택되며;
- [0061] iii) 푸소좀은 5 μ m, 10 μ m, 20 μ m, 50 μ m 또는 100 μ m 초과 크기를 가지며;
- [0062] i) 푸소좀, 또는 복수의 푸소좀을 포함하는 조성물 또는 조제물은 예를 들어 실시예 33의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 1.08 g/ml 내지 1.12 g/ml 이외의 밀도를 가지며, 예를 들어 푸소좀은 1.25 g/ml $\pm$ 0.05의 밀도를 가지며;
- [0063] iv) 푸소좀은 순환계의 스캐빈저 시스템(scavenger system)에 의해 또는 간의 공동(sinus) 내의 쿠퍼(Kupffer) 세포에 의해 포착되지 않으며;
- [0064] v) 공급원 세포는 293 세포 이외의 것이며;
- [0065] vi) 공급원 세포는 형질변환되지 않거나 불멸화되지 않으며;
- [0066] vii) 공급원 세포는 아데노바이러스-매개 불멸화 이외의 방법을 사용하여 형질변환되거나 불멸화되고, 예를 들어 자발적 돌연변이 또는 텔로머라제 발현에 의해 불멸화되며;
- [0067] viii) 푸소젠은 VSVG, SNARE 단백질, 또는 분비성 과립 단백질 이외의 것이며;
- [0068] ix) 푸소좀은 Cre 또는 GFP, 예를 들어 EGFP를 포함하지 않으며;
- [0069] x) 푸소좀은 Cre 또는 GFP, 예를 들어 EGFP 이외의 외인성 단백질을 추가로 포함하며;
- [0070] xi) 푸소좀은 예를 들어 내강에 외인성 핵산(예를 들어 RNA, 예를 들어 mRNA, miRNA 또는 siRNA) 또는 외인성

단백질(예를 들어 항체, 예를 들어 항체)을 추가로 포함하며; 또는

xii) 푸소좀은 미토콘드리아를 포함하지 않는다.

일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 푸소좀을 제공하며, 상기 푸소좀은:

(a) 지질 이중층,

(b) 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강(예를 들어 세포기질을 포함함),

(c) 외인성 또는 과발현된 푸소젠으로서, 예를 들어, 상기 푸소젠은 상기 지질 이중층에 배치되는, 푸소젠, 및

(d) 작용성 핵

을 포함하고, 상기 푸소좀은 공급원 세포로부터 유래된다.

일부 구현예에서, 하기 중 하나 이상이 존재한다:

i) 공급원 세포는 수지상 세포 또는 종양 세포 이외의 것이며, 예를 들어 공급원 세포는 내피 세포, 대식세포, 호중구, 과립구, 백혈구, 줄기세포(예를 들어 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포), 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택되며;

ii) 푸소젠은 푸소젠성 당단백질 이외의 것이며;

iii) 푸소젠은 퍼틸린(fertilin)-베타 이외의 포유류 단백질이며;

iv) 푸소좀은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, 낮은 면역원성을 가지며;

v) 푸소좀은 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP) 표준을 충족시키며;

vi) 푸소좀은 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었으며;

vii) 푸소좀은 미리 결정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지는, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없으며; 또는

viii) 푸소좀은 미리 결정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지는, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없다.

일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 복수의 푸소좀을 포함하는 정제된 푸소좀 조성물을 제공하며, 여기서, 적어도 하나의 푸소좀은:

a) 지질 이중층 및 수성 내강으로서, 여기서, 상기 푸소좀은 공급원 세포로부터 유래되는, 지질 이중층 및 수성 내강, 및

b) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 푸소젠

을 포함하고,

상기 푸소좀은 4℃, 0℃, -4℃, -10℃, -12℃, -16℃, -20℃, -80℃ 또는 -160℃ 미만의 온도에서 존재한다.

일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 복수의 푸소좀을 포함하는 정제된 푸소좀 조성물을 제공하며, 여기서, 적어도 하나의 푸소좀은:

a) 지질 이중층 및 수성 내강, 및

b) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 단백질 푸소젠

을 포함하고,

상기 푸소좀은 4℃, 0℃, -4℃, -10℃, -12℃, -16℃, -20℃, -80℃ 또는 -160℃ 미만의 온도에서 존재한다.

일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 제공한다.

일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 제공하며, 여기서, 복수의 푸소좀은:

(a) 지질 이중층,

(b) 세포기질을 포함하는 내강으로서, 여기서, 상기 내강은 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는, 내강;

- [0101] (c) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 푸소젠,
- [0102] (d) 적재물(cargo)
- [0103] 을 포함하고;
- [0104] 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며;
- [0105] 상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 총 단백질의 1% 미만이고;
- [0106] 상기 복수의 푸소좀은 세포내이입(endocytosis)의 저해제의 존재 하에 표적 세포 집단과 접촉 시, 그리고 세포 내이입의 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉 시, 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단에서 세포 수의 적어도 30%에 상기 적재물을 전달한다.
- [0107] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 제공하고, 여기서, 복수의 푸소좀은:
- [0108] (a) 지질 이중층,
- [0109] (b) 세포기질을 포함하는 내강으로서, 여기서, 상기 내강은 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는, 내강;
- [0110] (c) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 재-표적화된 푸소젠;
- [0111] (d) 적재물
- [0112] 을 포함하고,
- [0113] 상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며;
- [0114] 상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 총 단백질의 1% 미만이며;
- [0115] 여기서:
- [0116] (i) 복수의 푸소좀이 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시, 적재물은 비-표적 세포보다 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배 또는 100-배 더 많은 표적 세포에 존재하거나,
- [0117] (ii) 복수의 푸소좀은 비-표적 세포보다 표적 세포와 적어도 50%만큼 더 높은 속도로 융합한다.
- [0118] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 제공하고, 여기서, 복수의 푸소좀은:
- [0119] (a) 지질 이중층,
- [0120] (b) 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강;
- [0121] (c) 외인성 또는 과발현된 푸소젠으로서, 여기서, 상기 푸소젠은 상기 지질 이중층에 배치되는, 푸소젠; 및
- [0122] (d) 적재물
- [0123] 을 포함하고,
- [0124] 상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며;
- [0125] 하기 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4 또는 5)이고:
- [0126] i) 상기 푸소젠은 적어도 1,000 복사체의 복사수로 존재하거나;
- [0127] ii) 상기 푸소좀은 적어도 1,000 복사체의 복사수의 치료제를 포함하거나;
- [0128] iii) 상기 푸소좀은 지질을 포함하며, 여기서, CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포에서 상응하는 지질 수준의 75% 이내이거나;
- [0129] iv) 상기 푸소좀은 공급원 세포와 유사한 단백질 조성물을 포함하거나;
- [0130] v) 상기 푸소좀은 신호 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 음성 대조군, 예를 들어 인슐린의 부재 하에서의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 10% 초과만큼, 인슐린에 반응하여 세포의 신호, 예를 들어 AKT 인산화, 또는 인슐린에 반응하여 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG) 흡수를 전달할 수 있거나;

- [0131] vi) 상기 푸소좀은 대상체, 예를 들어 마우스에게 투여 시, 조직, 예를 들어 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이 또는 눈을 표적화하며, 예를 들어 투여된 푸소좀 집단 내 적어도 0.1%, 또는 10%의 푸소좀이 24시간 후 표적 조직에 존재하거나;
- [0132] 상기 공급원 세포는 호중구, 과립구, 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 골수 아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택된다.
- [0133] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0134] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 푸소좀 조성물을 대상체(예를 들어 인간 대상체), 표적 조직, 또는 세포에 투여하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하거나 이러한 조성물을 표적 조직 또는 세포와 접촉시켜 이로써 푸소좀 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0135] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 치료제(예를 들어 폴리펩타이드, 핵산, 대사물, 세포소기관 또는 아세포 구조(subcellular structure))를 대상체, 표적 조직, 또는 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 복수의 푸소좀, 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하거나 이를 표적 조직 또는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 푸소좀 조성물은 치료제가 전달되는 양 및/또는 시간으로 투여된다.
- [0136] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 기능(function)을 대상체, 표적 조직, 또는 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 복수의 푸소좀, 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하거나 이를 표적 조직 또는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 푸소좀 조성물은 기능이 전달되는 양 및/또는 시간으로 투여된다.
- [0137] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 기능을 대상체, 표적 조직, 또는 세포에 표적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 복수의 푸소좀, 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하거나 이를 표적 조직 또는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 푸소좀 조성물은 기능이 표적화되는 양 및/또는 시간으로 투여된다.
- [0138] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 대상체, 표적 조직, 또는 세포에서 생물학적 기능을 조정하는, 예를 들어 증강시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하거나 이를 표적 조직 또는 세포와 접촉시켜 이로써 대상체에서 생물학적 기능을 조정하는 단계를 포함한다.
- [0139] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 또한, 기능을 대상체에게 전달하거나 표적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 기능을 포함하는 본원에 기재된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 푸소좀 조성물은 대상체에서 기능이 전달되거나 표적화되는 양 및/또는 시간으로 투여된다. 구현예에서, 대상체는 암, 염증 장애, 자가면역 질병, 만성 질병, 염증, 손상된 기관 기능(damaged organ function), 감염성 질병, 퇴행성 장애, 유전적 질병 또는 상해(injury)를 가진다.
- [0140] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 푸소좀 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0141] a) 푸소좀을 포함하는, 예를 들어 발현하는 공급원 세포를 제공하는 단계;
- [0142] b) 상기 공급원 세포로부터 푸소좀을 생성하는 단계로서, 여기서, 푸소좀은 지질 이중층, 내강 및 푸소좀을 포함하여 이로써 푸소좀을 제조하는, 단계; 및
- [0143] c) 상기 푸소좀을 예를 들어 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로서 제제화하는 단계를 포함한다.
- [0144] 를 포함한다.
- [0145] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이 존재한다:
- [0146] i) 공급원 세포는 293 세포, HEK 세포, 인간 내피 세포 또는 인간 상피 세포 이외의 것이며;

- [0147] ii) 푸소젠은 바이러스 단백질 이외의 것이며;
- [0148] iii) 푸소좀, 또는 복수의 푸소좀을 포함하는 조성물 또는 조제물은 예를 들어 1.08 g/ml 내지 1.12 g/ml 이외의 밀도를 가지며;
- [0149] iv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 33의 검정법에 의해 측정된 바와 같이 1.25 g/ml +/- 0.05의 밀도를 가지며;
- [0150] v) 푸소좀은 순환계의 스캐빈저 시스템에 의해 또는 간의 공동 내의 쿠퍼 세포에 의해 포착되지 않으며;
- [0151] vi) 푸소좀은 예를 들어 실시예 76의 검정법에 의해, 대상체에서 망상-내피 시스템(RES)에 의해 포착되지 않으며;
- [0152] vii) 복수의 푸소좀이 대상체에게 투여된 경우, 복수 중 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 미만은 예를 들어 실시예 76의 검정법에 의해, 24, 48 또는 72시간 후 RES에 의해 포착되거나 또는 포착되지 않으며;
- [0153] viii) 푸소좀은 5 um, 6 um, 7 um, 8 um, 10 um, 20 um, 50 um, 100 um, 150 um 또는 200 um 초과와 직경을 가지며;
- [0154] ix) 푸소좀은 세포생물제를 포함하며;
- [0155] x) 푸소좀은 제핵 세포를 포함하며; 또는
- [0156] xi) 푸소좀은 불활성화된 핵을 포함한다.
- [0157] 일부 양태에서, 본 개시내용은 푸소좀 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0158] a) 본원에 기재된 복수의 푸소좀, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및
- [0159] b) 상기 푸소좀을 예를 들어 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로서 제제화하는 단계를 포함한다.
- [0160] 일부 양태에서, 본 개시내용은 푸소좀 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0162] a) 본원에 기재된 복수의 푸소좀 또는 본원에 기재된 푸소좀 조성물을 제공하는, 예를 들어 생성하는 단계; 및
- [0163] b) 복수로부터 하나 이상의 푸소좀을 검정하여, 하나 이상(예를 들어 2, 3 이상)의 표준이 충족되는지 결정하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 표준(들)은 하기로부터 선택되고:
- [0164] i) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 비-표적 세포보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 또는 100-배만큼 더 높은 속도로 융합하며;
- [0165] ii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 다른 푸소좀보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 더 높은 속도로 융합하며;
- [0166] iii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 푸소좀 내의 작용제가 24, 48 또는 72시간 후 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 표적 세포에 전달되는 속도로 표적 세포와 융합하며;
- [0167] iv) 푸소젠은 예를 들어 실시예 29의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체 이하의 복사수로 존재하며;
- [0168] v) 푸소좀은 예를 들어 실시예 43 또는 156의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체 이하의 복사수의 치료제를 포함하며;
- [0169] vi) 푸소젠의 복사수 : 치료제의 복사수의 비는 1,000,000:1, 100,000:1, 10,000:1, 1,000:1, 100:1 내지 50:1, 1,000,000:1 내지 100,000:1, 100,000:1 내지 10,000:1, 10,000:1 내지 1,000:1, 1,000:1 내지 100:1, 100:1 내지 50:1, 50:1 내지 20:1, 20:1 내지 10:1, 10:1 내지 5:1, 5:1 내지 2:1, 1:1 내지 2:1, 2:1 내지 1:1, 1:1

내지 1:2, 1:2 내지 1:5, 1:5 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1:20 내지 1:50, 1:50 내지 1:100, 1:100 내지 1:1,000, 1:1,000 내지 1:10,000, 1:10,000 내지 1:100,000, 또는 1:100,000 내지 1:1,000,000, 또는 1:20 내지 1:50, 1:100, 1,000:1, 10,000:1, 100,000:1, 내지 1,000,000:1이며;

- [0170] vii) 푸소좁은 공급원 세포의 지질 조성물과 실질적으로 유사한 지질 조성물을 포함하거나, CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포 내 상응하는 지질 수준의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 75% 이내에 있으며;
- [0171] viii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 42 또는 155의 검정법을 사용하여, 공급원 세포의 단백질 조성물과 유사한 단백질 조성물을 포함하며;
- [0172] ix) 푸소좁은 예를 들어 실시예 49의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 단백질에 대한 지질의 비를 공급원 세포에서 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0173] x) 푸소좁은 예를 들어 실시예 50의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 단백질의 비를 공급원 세포 내 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0174] xi) 푸소좁은 예를 들어 실시예 51 또는 159의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 지질의 비를 공급원 세포 내 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이내로 포함하며;
- [0175] xii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 75의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 반감기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내인 반감기를 대상체, 예를 들어 마우스에 가지며;
- [0176] xiii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 64의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 음성 대조군, 예를 들어 글루코스의 부재 하의 다른 유사한 푸소좁보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과만큼의 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG)를 막을 가로질러 수송하며;
- [0177] xiv) 푸소좁은 예를 들어 실시예 66의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 마우스 배아 섬유아세포에서의 에스테라제 활성의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 에스테라제 활성을 내강에 포함하며;
- [0178] xv) 푸소좁은 예를 들어 실시예 68에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 대사 활성(예를 들어 시트레이트 신타제 활성)의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 대사 활성 수준을 포함하며;
- [0179] xvi) 푸소좁은 예를 들어 실시예 69에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 호흡 수준의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 호흡 수준(예를 들어 산소 소모율)을 포함하며;
- [0180] xvii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 70의 검정법을 사용하여, 최대 18,000, 17,000, 16,000, 15,000, 14,000, 13,000, 12,000, 11,000 또는 10,000 MFI의 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좁은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 다른 유사한 푸소좁의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좁은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 대식세포의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함하며;
- [0181] xviii) 푸소좁은 예를 들어 실시예 39의 검정법에 의해, 공급원 세포의 miRNA 함량 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 miRNA 함량 수준을 가지며;
- [0182] xix) 푸소좁은 예를 들어 실시예 47의 검정법에 의해, 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비보다 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 이내에서, 예를 들어 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비의 1%~2%, 2%~3%, 3%~4%, 4%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는 80%~90% 이내에서 가용성 : 불용성 단백질을 가지며;
- [0183] xx) 푸소좁은 예를 들어 실시예 48의 검정법에서, 예를 들어 질량 분광법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 LPS 함량의 또는 푸소좁의 지질 함량의 5%, 1%, 0.5%, 0.01%, 0.005%, 0.0001%, 0.00001% 이하보다 작은 LPS 수준을 가지며;

- [0184] xxi) 푸소좀은 신호 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 실시예 63의 검정법을 사용하여, 음성 대조군, 예를 들어 인슐린의 부재 하에서의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과만큼, 인슐린에 반응하여, 예를 들어 세포의 신호, 예를 들어 AKT 인산화, 또는 인슐린에 반응하여 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG) 흡수를 전달할 수 있으며;
- [0185] xxii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 71의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 골수 기질 세포 (BMSC)에 의해 유도되는 근접분비 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 근접분비-신호전달 수준을 가지며;
- [0186] xxiii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 72의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 대식세포에 의해 유도되는 측분비(paracrine) 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 더 큰 측분비-신호전달 수준을 가지며;
- [0187] xxiv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 73의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포 내 중합된 액틴 수준과 비교하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내의 수준에서 액틴을 중합하며;
- [0188] xxv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 74의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포의 막 전위의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내에서 막 전위를 갖거나, 푸소좀은 약 -20 내지 -150 mV, -20 내지 -50 mV, -50 내지 -100 mV, 또는 -100 내지 -150 mV의 막 전위를 가지며;
- [0189] xxvi) 푸소좀은 예를 들어 실시예 62의 검정법을 사용하여, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 마우스 배아 섬유 아세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 속도로 단백질을 분비할 수 있으며; 또는
- [0190] xxvii) 푸소좀은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, 낮은 면역원성을 가지고;
- [0191] c) (선택적으로), 표준 중 하나 이상이 충족된다면, 복수의 푸소좀 또는 푸소좀 조성물을 방출용으로 승인하는 단계를 포함한다.
- [0192] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 푸소좀 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0193] a) 본원에 기재된 복수의 푸소좀 또는 본원에 기재된 푸소좀 조성물을 제공하는, 예를 들어 생성하는 단계; 및
- [0194] b) 복수로부터 하나 이상의 푸소좀을 검정하여, 하기 인자 중 하나 이상의 존재 또는 수준을 결정하는 단계;
- [0195] i) 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 면역원성 분자, 예를 들어 면역원성 단백질;
- [0196] ii) 병원체, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스; 또는
- [0197] iii) 오염물; 및
- [0198] c) (선택적으로), 인자 중 하나 이상이 기준값보다 낮다면, 복수의 푸소좀 또는 푸소좀 조성물을 방출용으로 승인하는 단계를 포함한다.
- [0199] 일부 양태에서, 본 발명은 또한, 인간 대상체에게 푸소좀 조성물을 투여하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0200] a) 대상체 내 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소겐의 배치를 허용하는 조건 하에, 상기 대상체에게 제1 푸소겐을 투여하는 단계로서, 여기서, 하기 중 하나 이상인, 단계:
- [0201] i) 제1 푸소겐을 투여하는 단계는, 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소겐의 발현을 허용하는 조건 하에, 제1 푸소겐을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하거나,
- [0202] ii) 제1 푸소겐은 코일드-코일 모티프(coiled-coil motif)를 포함하지 않는, 단계, 및
- [0203] b) 상기 인간 대상체에게 제2 푸소겐을 포함하는 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 투여하는 단계로서, 여기서, 상기 제2 푸소겐은 상기 제1 푸소겐과 융화성인, 단계
- [0204] 를 포함하고, 이로써 대상체에게 푸소좀 조성물을 투여한다.
- [0205]

- [0206] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 대상체에게 치료제를 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0207] a) 대상체 내 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소젠의 배치를 허용하는 조건 하에, 상기 대상체에게 제1 푸소젠을 투여하는 단계로서, 여기서, 하기 중 하나 이상인, 단계:
- [0208] i) 제1 푸소젠을 투여하는 단계는, 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소젠의 발현을 허용하는 조건 하에, 제1 푸소젠을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하거나,
- [0209] ii) 제1 푸소젠은 코일드-코일 모티프를 포함하지 않는, 단계, 및
- [0210] b) 상기 인간 대상체에게 제2 푸소젠 및 치료제를 포함하는 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 투여하는 단계로서, 여기서, 상기 제2 푸소젠은 상기 제1 푸소젠과 융화성인, 단계
- [0211] 를 포함하고, 이로써 대상체에게 치료제를 전달한다.
- [0212] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 대상체에서 생물학적 기능을 조정하는, 예를 들어 증강시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0213] a) 대상체 내 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소젠의 배치를 허용하는 조건 하에, 상기 대상체에게 제1 푸소젠을 투여하는 단계로서, 여기서, 하기 중 하나 이상인, 단계:
- [0214] i) 제1 푸소젠을 투여하는 단계는, 하나 이상의 표적 세포에서 제1 푸소젠의 발현을 허용하는 조건 하에, 제1 푸소젠을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하거나,
- [0215] ii) 제1 푸소젠은 코일드-코일 모티프를 포함하지 않는, 단계, 및
- [0216] b) 상기 인간 대상체에게 제2 푸소젠을 포함하는 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물을 투여하는 단계로서, 여기서, 상기 제2 푸소젠은 상기 제1 푸소젠과 융화성인, 단계
- [0217] 를 포함하고, 이로써 대상체에서 생물학적 기능을 조정한다.
- [0218] 일 양태에서, 본 발명은 콘드리솜(chondrisome) 및 푸소젠을 포함하는 푸소좀을 포함한다.
- [0219] 일 양태에서, 본 발명은 복수의 푸소좀을 포함하는 조성물을 포함하며, 여기서, 적어도 하나의 푸소좀은 콘드리솜 및 푸소젠을 포함한다.
- [0220] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한, 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포의 푸소좀 융합)을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 푸소좀 조성물(예를 들어 본원에 기재된 푸소좀 조성물)을 받은 대상체로부터 생물학적 시료를 제공하는 단계, 및 검정법을 수행하여 생물학적 시료 내 표적 세포와 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀의 융합으로 인한 상기 생물학적 시료의 하나 이상의 특성을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 예를 들어 실시예 54 또는 124에 기재된 바와 같이, 표적 세포와의 융합을 측정하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 생물학적 시료의 하나 이상의 특성을 결정하는 단계는: 푸소젠의 존재, 적재물 또는 페이로드(payload)의 수준, 또는 적재물 또는 페이로드와 관련된 활성을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0221] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 함량(예를 들어 표적 세포의 푸소좀 융합)을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물을 받은 대상체로부터의 생물학적 시료를 제공하는 단계, 및 푸소젠, 예를 들어 본원에 기재된 푸소젠의 존재에 대해 생물학적 시료를 시험하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 검출되는 푸소젠의 수준은 푸소좀 조성물을 받지 않은 대상체로부터의 상응하는 생물학적 시료에서 관찰된 수준보다 크다(예를 들어 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 10,000%, 50,000% 또는 100,000% 더 큼). 일부 구현예에서, 대상체는 푸소좀 조성물의 투여 전과 동일한 대상체이고, 일부 구현예에서, 대상체는 상이한 대상체이다.
- [0222] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포의 푸소좀 융합)을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물을 받은 대상체로부터의 생물학적 시료를 제공하는 단계, 및 예를 들어 본원에 기재된 푸소좀에 의해 전달된 적재물 또는 페이로드의 존재에 대해 생물학적 시료를 시험하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 검출되는 적재물 또는 페이로드의 수준은 푸소좀 조성물을 받지 않은 대상체로부터의 상응하는 생물학적 시료에서 관찰된 수준보다 크다(예를 들어 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%,

800%, 900%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 10,000%, 50,000% 또는 100,000% 더 큼). 일부 구현예에서, 대상체는 푸소좀 조성물의 투여 전과 동일한 대상체이고, 일부 구현예에서, 대상체는 상이한 대상체이다.

[0223] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포에의 푸소좀 용합)을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물을 받은 대상체로부터의 생물학적 시료를 제공하는 단계, 및 푸소좀 조성물과 관련된 활성, 예를 들어 푸소좀 조성물에 의해 전달된 적재물 또는 페이로드와 관련된 활성의 변경에 대해 생물학적 시료를 시험하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 검출되는 활성의 수준은 푸소좀 조성물을 받지 않은 대상체(예를 들어 푸소좀 조성물의 투여 전과 동일한 대상체)로부터의 상응하는 생물학적 시료에서 관찰된 수준에 비해, 예를 들어 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 10,000%, 50,000% 또는 100,000%만큼 증가된다. 일부 경우, 검출되는 활성의 수준은 푸소좀 조성물을 받지 않은 대상체로부터의 상응하는 생물학적 시료에서 관찰된 수준에 비해, 예를 들어 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 10,000%, 50,000% 또는 100,000%만큼 저하된다. 일부 구현예에서, 대상체는 푸소좀 조성물의 투여 전과 동일한 대상체이고, 일부 구현예에서, 대상체는 상이한 대상체이다.

[0224] 일 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포에의 푸소좀 용합을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물을 받은 대상체로부터 생물학적 시료를 제공하는 단계, 및 상기 생물학적 시료 내에서 비용합된 푸소좀의 수준을 평가하는 단계를 포함한다.

[0225] 본원의 임의의 양태, 예를 들어 상기 푸소좀, 푸소좀 조성물 및 방법은 본원의 하나 이상의 구현예, 예를 들어 하기 구현예와 조합될 수 있다.

[0226] 일부 구현예에서, 푸소좀은 작용제, 예를 들어 단백질, 핵산(예를 들어 mRNA), 세포소기관 또는 대사물을 표적 세포의 세포 기질에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 작용제를 표적 세포의 세포기질에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제는 표적 세포에서 부재하거나, 돌연변이이거나, 또는 야생형보다 더 낮은 수준으로 존재하는 단백질(또는 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어 단백질을 인코딩하는 mRNA)이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 유전적 질병, 예를 들어 단일유전자 질병(monogenic disease), 예를 들어 단일유전자 세포내 단백질 질병을 갖는 대상체로부터의 것이다. 일부 구현예에서, 작용제는 전사 인자, 예를 들어 외인성 전사 인자 또는 내인성 전사 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 하나 이상의(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 50개의) 부가적인 전사 인자, 예를 들어 외인성 전사 인자, 내인성 전사 인자 또는 이들의 조합을 추가로 포함하거나, 또는 상기 방법은 이들 전사 인자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다.

[0227] 일부 구현예에서, 푸소좀은 복수의 작용제(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 50개의 작용제)를 포함하며(예를 들어 표적 세포에 전달할 수 있으며), 여기서, 복수의 작용제 중 각각의 작용제는 표적 세포에서 경로의 단계 상에 작용하고, 예를 들어 상기 경로는 생합성 경로, 대사 경로 또는 신호 전달 캐스케이드이다. 구현예에서, 복수의 작용제 중 각각의 작용제는 상기 경로를 상향조절하거나 상기 경로를 하향조절한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 상기 경로의 단계 상에서 작용하지 않으며, 예를 들어 제2 경로의 단계 상에서 작용하는 하나 이상의 부가적인 작용제를 추가로 포함하거나, 또는 상기 방법은 상기 하나 이상의 부가적인 작용제를 전달하는 단계를 추가로 포함한다(예를 들어 제2의 복수의 작용제를 포함함). 일부 구현예에서, 푸소좀은 복수의 작용제(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 50개의 작용제)를 포함하거나(예를 들어 표적 세포에 전달할 수 있거나), 또는 상기 방법은 상기 복수의 작용제를 전달하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 복수의 작용제 중 각각의 작용제는 단일 경로의 일부이고, 예를 들어 상기 경로는 생합성 경로, 대사 경로 또는 신호 전달 캐스케이드이다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 단일 경로의 일부가 아니며, 예를 들어 제2 경로의 일부인 하나 이상의 부가적인 작용제를 추가로 포함하거나, 또는 상기 방법은 상기 부가적인 작용제를 전달하는 단계를 추가로 포함한다(예를 들어 제2의 복수의 작용제를 포함함).

[0228] 일부 구현예에서, 표적 세포는 응집된 단백질 또는 잘못 접힌(misfolded) 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포에서 응집된 단백질 또는 잘못 접힌 단백질의 수준을 감소시킬 수 있거나(예를 들어 수준을 감소시킴), 또는 본원의 방법은 표적 세포에서 응집된 단백질 또는 잘못 접힌 단백질의 수준을 감소시키는 단계를 포함한다.

[0229] 일부 구현예에서, 작용제는 전사 인자, 효소(예를 들어 핵 효소 또는 세포기질 효소), DNA에 대한 서열 특이적 변형을 매개하는 시약(예를 들어 Cas9, ZFN 또는 TALEN), mRNA(예를 들어 세포내 단백질을 인코딩하는 mRNA),

세포소기관 또는 대사에서부터 선택된다.

- [0230] 일부 구현예에서, 푸소좀은 작용제, 예를 들어 단백질을 표적 세포의 세포막에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 작용제를 표적 세포의 세포막에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질을 전달하는 단계는, 표적 세포가 단백질을 생성하고 상기 단백질을 막에 위치시키도록 상기 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어 mRNA)을 상기 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 단백질을 포함하거나 상기 방법은 상기 단백질을 전달하는 단계를 추가로 포함하고, 푸소좀과 표적 세포의 융합은 단백질을 상기 표적 세포의 세포막에 이송한다. 일부 구현예에서, 작용제는 세포 표면 수용체에 결합하는 세포 표면 리간드 또는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포 표면 수용체에 결합하는 제2 세포 표면 리간드 또는 항체를 포함하거나 인코딩하는 제2 작용제를 추가로 포함하거나, 또는 상기 방법은 상기 제2 작용제를 전달하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로, 세포 표면 수용체(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50개 이상)에 결합하는 하나 이상의 부가적인 세포 표면 리간드 또는 항체를 추가로 포함하거나 인코딩한다. 일부 구현예에서, 제1 작용제 및 제2 작용제는 복합체를 형성하며, 여기서, 선택적으로 상기 복합체는 하나 이상의 부가적인 세포 표면 리간드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제는 세포 표면 수용체, 예를 들어 외인성 세포 표면 수용체를 포함하거나 인코딩한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 제2 세포 표면 수용체를 포함하거나 인코딩하는 제2 작용제를 추가로 포함하거나, 또는 상기 방법은 상기 제2 작용제를 전달하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 부가적인 세포 표면 수용체(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50개 이상의 세포 표면 수용체)를 추가로 포함하거나 인코딩한다.
- [0231] 일부 구현예에서, 제1 작용제 및 제2 작용제는 복합체를 형성하며, 여기서, 선택적으로 상기 복합체는 하나 이상의 부가적인 세포 표면 수용체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제는 항원 또는 항원 제시 단백질을 포함하거나 인코딩한다.
- [0232] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어, 표적 세포가 단백질을 생성하고 분비하도록 허용하는 조건 하에 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어 mRNA)을 상기 표적 세포에 전달함으로써, 분비된 작용제, 예를 들어 분비된 단백질을 표적 부위(예를 들어 세포의 영역)에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 본원에 기재된 바와 같은 분비된 작용제를 전달하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 분비된 단백질은 내인성 또는 외인성이다. 구현예에서, 분비된 단백질은 단백질 치료제, 예를 들어 항체 분자, 사이토카인 또는 효소를 포함한다. 구현예에서, 분비된 단백질은 자가분비 신호전달 분자 또는 측분비 신호전달 분자를 포함한다. 구현예에서, 분비된 작용제는 분비성 과립을 포함한다.
- [0233] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 전사 인자 또는 mRNA로부터 선택되는 작용제 또는 복수의 상기 작용제를 전달함으로써, 표적 세포(예를 들어 면역 세포)를 재프로그래밍할 수 있다(예를 들어 재프로그래밍함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표적 세포를 재프로그래밍하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 재프로그래밍은, 도파민작용성 뉴런의 하나 이상의 특징을 맡기 위해 비-도파민작용성(non-dopaminergic) 뉴런을 유도함으로써, 또는 예를 들어 비-피폐된(non-exhausted) T 세포, 살해 T 세포의 하나 이상의 특징을 맡기 위해 피폐된 T 세포를 유도함으로써, 췌장 베타 세포의 하나 이상의 특징을 맡기 위해 췌장 내분비 세포를 유도하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제는 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 항원을 포함하는 제1 작용제 및 항원 제시 단백질을 포함하는 제2 작용제를 포함한다.
- [0234] 일부 구현예에서, 푸소좀은 하나 이상의 세포 표면 수용체를 표적 세포(예를 들어 면역 세포)에 공여할 수 있다(예를 들어 공여함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 하나 이상의 세포 표면 수용체를 공여하는 단계를 포함한다.
- [0235] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 종양 세포를 변형시킬 수 있으며, 예를 들어 변형시킨다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표적 종양 세포를 변형시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 면역자극성 리간드, 항원 제시 단백질, 종양 억제자 단백질 또는 프로-세포자멸사(pro-apoptotic) 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포에서 면역억제성 리간드, 유사분열촉진 신호 또는 성장 인자의 수준을 감소시킬 수 있는 miRNA를 포함한다.
- [0236] 일부 구현예에서, 푸소좀은 면역조절성, 예를 들어 면역자극성인 작용제를 포함한다.
- [0237] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포가 항원을 제시하도록 유발할 수 있다(예를 들어 유발함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표적 세포 상에서 항원을 제시하는 단계를 포함한다.
- [0238] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 조직에서 재생을 촉진시킨다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표

적 조직에서 재생을 촉진시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 표적 세포는 심장 세포, 예를 들어 심근세포(예를 들어 휴지기 심근세포), 간아세포(hepatoblast)(예를 들어 담관 간아세포), 상피 세포, 미접촉(naive) T 세포, 대식세포(예를 들어 종양 침윤형 대식세포) 또는 섬유아세포(예를 들어 심장 섬유아세포)이다. 구현예에서, 공급원 세포는 T 세포(예를 들어 T_{reg}), 대식세포 또는 심장 근세포이다.

- [0239] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 유전자 치료법을 위해 예를 들어 표적 세포의 게놈을 안정하게 변형시키기 위해 핵산을 표적 세포에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 핵산을 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 효소 결핍을 가지며, 예를 들어 효소의 감소된 활성(예를 들어 활성 없음)을 초래하는 돌연변이를 효소에 포함한다.
- [0240] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포에서 DNA에 대한 서열 특이적 변형을 매개하는 시약(예를 들어 Cas9, ZFN 또는 TALEN)을 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 시약을 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 표적 세포는 근육 세포(예를 들어 골격근 세포), 신장 세포 또는 간 세포이다.
- [0241] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어, 표적 세포에서 유전자 발현을 일시적으로 변형시키기 위해 핵산을 상기 표적 세포에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함).
- [0242] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어, 단백질을 일시적으로 억제하기 위해 단백질을 상기 표적 세포에 전달할 수 있다(예를 들어 전달함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 단백질을 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 단백질은 막 단백질(예를 들어 막 수송체 단백질), 세포질 단백질(예를 들어 효소) 또는 분비된 단백질(예를 들어 면역억제성 단백질)이다.
- [0243] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포소기관을 표적 세포에 전달할 수 있으며(예를 들어 전달함), 예를 들어, 표적 세포는 결손(defective) 세포소기관 네트워크를 가진다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 세포소기관을 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 공급원 세포는 간세포, 골격근 세포 또는 뉴런이다.
- [0244] 일부 구현예에서, 푸소좀은 핵을 표적 세포에 전달할 수 있으며(예를 들어 전달함), 예를 들어, 표적 세포는 유전자 돌연변이를 가진다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 핵을 표적 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵은 자가(autologous)이고, 표적 세포에 비해 하나 이상의 유전적 변화를 포함하며, 예를 들어 핵은 DNA에 대한 서열 특이적 변형(예를 들어 Cas9, ZFN 또는 TALEN), 또는 인공 염색체, 게놈 내에 통합된 부가적인 유전적 서열, 결실 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 구현예에서, 자가 핵의 공급원은 줄기세포, 예를 들어 조혈모 줄기세포이다. 구현예에서, 표적 세포는 근육 세포(예를 들어 골격근 세포 또는 심근 세포), 간세포 또는 뉴런이다.
- [0245] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포내 분자 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 단백질 작용제를 표적 세포에 전달한다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 분자를 표적 세포의 세포내 영역에 전달하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 단백질 작용제는 저해제이다. 구현예에서, 단백질 작용제는 나노바디(nanobody), scFv, 카멜리드(camelid) 항체, 펩타이드, 마크로사이클(macrocyclic) 또는 저분자를 포함한다.
- [0246] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포가 단백질을, 예를 들어 치료 단백질을 분비하도록 유발할 수 있다(예를 들어 유발함). 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표적 세포가 단백질을 분비하도록 유발하는 단계를 포함한다.
- [0247] 일부 구현예에서, 푸소좀은 작용제, 예를 들어 단백질을 분비할 수 있다(예를 들어 분비함). 일부 구현예에서, 작용제, 예를 들어 분비된 작용제는 대상체에서 표적 부위에 전달된다. 일부 구현예에서, 작용제는 재조합적으로 제조될 수 없거나 재조합적으로 제조하기에 어려운 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질을 분비하는 푸소좀은 MSC 또는 연골세포로부터 선택되는 공급원 세포로부터의 것이다.
- [0248] 일부 구현예에서, 푸소좀은 이의 막 상에 하나 이상의 세포 표면 리간드(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 개 이상의 세포 표면 리간드)를 포함한다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 하나 이상의 세포 표면 리간드를 표적 세포에 제시하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 리간드를 갖는 푸소좀은 호중구(예를 들어 그리고 표적 세포는 종양-침윤형 림프구임), 수지상 세포(예를 들어 그리고 표적 세포는 미접촉 T 세포임) 또는 호중구(예를 들어 그리고 표적은 종양 세포 또는 바이러스-감염 세포)로부터 선택되는 공급원 세포로부터의 것이다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 막 복합체, 예를 들어 적어도 2, 3, 4 또는 5개의 단백질을 포함하는 복합체, 예를 들어 동종이량체, 이종이량체, 동종삼량체, 이종삼량체, 동종사량체, 이종사량체를 포함한다.

다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 항체, 예를 들어 독성 항체를 포함하고, 예를 들어 푸소좀은 예를 들어 표적 부위로 귀소함으로써 항체를 표적 부위에 전달할 수 있다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 NK 세포 또는 호중구이다.

- [0249] 일부 구현예에서, 본원의 방법은 표적 세포로부터 단백질의 분비 또는 표적 세포의 표면 상에서 리간드 제시를 유발하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포의 세포 사멸을 유발할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 NK 공급원 세포로부터의 것이다.
- [0250] 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 표적 세포는 (예를 들어 병원체의) 식작용을 할 수 있다. 유사하게는, 일부 구현예에서, 본원의 방법은 식작용을 유발하는 단계를 포함한다.
- [0251] 일부 구현예에서, 푸소좀은 이의 국소 환경을 감지하고 이에 반응한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 대사물, 인터루킨 또는 항원의 수준을 감지할 수 있다.
- [0252] 구현예에서, 푸소좀은 화학주성, 유출 또는 하나 이상의 대사 활성을 할 수 있다. 구현예에서, 대사 활성은 키뉴레닌(kynurenine), 포도당신생합성, 프로스타글란딘 지방산 산화, 아데노신 대사, 요소 회로 및 열발생(thermogenic) 호흡으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 호중구이고, 푸소좀은 상해 부위로 귀소할 수 있다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 대식세포이고, 푸소좀은 식작용을 할 수 있다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 갈색 지방 조직 세포이고, 푸소좀은 지방분해를 할 수 있다.
- [0253] 일부 구현예에서, 푸소좀은 복수의 작용제(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 50개의 작용제)를 포함한다(예를 들어 표적 세포에 전달할 수 있음). 구현예에서, 푸소좀은 저해성 핵산(예를 들어 siRNA 또는 miRNA) 및 mRNA를 포함한다.
- [0254] 일부 구현예에서, 푸소좀은 막 단백질 또는 상기 막 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다(예를 들어 표적 세포에 전달할 수 있음). 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포를 재프로그래밍하거나 전환분화(transdifferentiating)시킬 수 있으며, 예를 들어, 푸소좀은 표적 세포의 재프로그래밍 또는 전환분화를 유도하는 하나 이상의 작용제를 포함한다.
- [0255] 일부 구현예에서, 대상체는 재생이 필요하다. 일부 구현예에서, 대상체는 암, 자가면역 질병, 감염성 질병, 대사 질병, 신경퇴행성 질병 또는 유전적 질병(예를 들어 효소 결핍)을 앓고 있다.
- [0256] 일부 구현예(예를 들어 적재물의 비-세포내이입(non-endocytic) 전달을 검정하는 구현예)에서, 적재물 전달은 하기 단계 중 하나 이상(예를 들어 모두)을 사용하여 검정된다: (a) 30,000개의 HEK-293T 표적 세포를, 100 nM 바필로마이신(bafilomycin) A1을 포함하는 96-웰 플레이트의 제1 웰 내에 넣고, 유사한 수의 유사한 세포를 바필로마이신 A1이 결여된 96-웰 플레이트의 제2 웰 내에 넣는 단계, (b) 표적 세포를 DMEM 배지에서 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하는 단계, (c) 표적 세포를 10 ug의, 적재물을 포함하는 푸소좀과 접촉시키는 단계, (d) 표적 세포 및 푸소좀을 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 접촉시키는 단계, 및 (e) 적재물을 포함하는 제1 웰 및 제2 웰 내의 세포의 퍼센트를 결정하는 단계. 단계 (e)는 현미경을 사용하여, 예를 들어 면역형광을 사용하여 적재물을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (e)는 적재물을 간접적으로 검출하는 단계, 예를 들어 적재물의 다운스트림 효과, 예를 들어 리포터 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 단계 (a) 내지 (e) 중 하나 이상은 실시예 135에 기재된 바와 같이 수행된다.
- [0257] 일부 구현예에서, 세포내이입의 저해제(예를 들어 클로로퀸(chloroquine) 또는 바필로마이신 A1)은 엔도좀 산성화(endosomal acidification)를 저해한다. 일부 구현예에서, 적재물 전달은 리소좀 산성화(lysosomal acidification)에 독립적이다. 일부 구현예에서, 세포내이입의 저해제(예를 들어 디나소어(Dynasore))는 디나민(dynamin)을 저해한다. 일부 구현예에서, 적재물 전달은 디나민 활성화에 독립적이다.
- [0258] 일부 구현예(예를 들어 표적 세포 대 비-표적 세포로의 적재물의 특이적인 전달에 대한 구현예)에서, 적재물 전달은 하기 단계 중 하나 이상(예를 들어 모두)을 사용하여 검정된다: (a) 30,000개의, CD8a 및 CD8b를 과발현하는 HEK-293T 표적 세포를 96-웰 플레이트의 제1 웰 내에 넣고, 30,000개의, CD8a 및 CD8b를 과발현하지 않는 HEK-293T 표적 세포를 96-웰 플레이트의 제2 웰 내에 넣는 단계, (b) 상기 세포를 DMEM 배지에서 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하는 단계, (c) 표적 세포를 10 ug의, 적재물을 포함하는 푸소좀과 접촉시키는 단계, (d) 표적 세포 및 푸소좀을 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하는 단계, 및 (e) 적재물을 포함하는 제1 웰 및 제2 웰 내의 세포의 퍼센트를 결정하는 단계. 단계 (e)는 현미경을 사용하여, 예를 들어 면역형광을 사용하여 적재물을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (e)는 적재물을 간접적으로 검출하는 단계, 예를 들어

어 적재물의 다운스트림 효과, 예를 들어 리포터 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 단계 (a) 내지 (e) 중 하나 이상은 실시예 124에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0259] 일부 구현예에서:

[0260] ii) 공급원 세포는 293 세포, HEK 세포, 인간 내피 세포 또는 인간 상피 세포 이외의 것이며;

[0261] iii) 푸소젠은 바이러스 단백질 이외의 것이며;

[0262] iv) 푸소좀, 또는 복수의 푸소좀을 포함하는 조성물 또는 조제물은 1.08 g/ml 내지 1.12 g/ml 이외의 밀도를 가지며, 예를 들어

[0263] v) 푸소좀은 예를 들어 실시예 33의 검정법에 의해 측정된 바와 같이 1.25 g/ml +/- 0.05의 밀도를 가지며;

[0264] vi) 푸소좀은 순환계의 스캐빈저 시스템에 의해 또는 간의 공동 내의 쿠퍼 세포에 의해 포착되지 않으며;

[0265] vii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 76의 검정법에 의해, 대상체에서 망상-내피 시스템(RES)에 의해 포착되지 않으며;

[0266] viii) 복수의 푸소좀이 대상체에게 투여될 때, 이들 복수의 푸소좀 중 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 미만이 예를 들어 실시예 76의 검정법에 의해, 24, 48 또는 72시간 후 RES에 의해 포착되며;

[0267] ix) 푸소좀은 5 um, 6 um, 7 um, 8 um, 10 um, 20 um, 50 um, 100 um, 150 um 또는 200 um 초과와 직경을 가진다.

[0268] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포생물제를 포함하거나, 또는 세포생물제에 의해 포함된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 제핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 불활성화된 핵을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 기능성 핵을 포함하지 않는다.

[0269] 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 본원의 특성, 예를 들어 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4 또는 5)을 갖거나 또는 갖는 것으로 식별된다.

[0270] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 비-표적 세포보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배 또는 100-배만큼 더 높은 속도로 융합된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 다른 푸소좀보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%만큼 더 높은 속도로 융합한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 푸소좀 내의 작용제가 24, 48 또는 72시간 후 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 표적 세포에 전달되는 속도로 표적 세포와 융합한다. 구현예에서, 표적화된 융합의 양은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 약 30%~70%, 35%~65%, 40%~60%, 45%~55% 또는 45%~50%, 예를 들어 약 48.8%이다. 구현예에서, 표적화된 융합의 양은 예를 들어 실시예 55의 검정법에서, 약 20%~40%, 25%~35% 또는 30%~35%, 예를 들어 약 32.2%이다.

[0271] 일부 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 실시예 29의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 이하의 복사수로 존재한다. 일부 구현예에서, 푸소좀에 의해 포함된 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 푸소젠이 세포막에 배치된다. 구현예에서, 푸소좀은 또한, 푸소젠을 내부적으로, 예를 들어 세포질 또는 세포소기관에 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 실시예 162에 기재된 방법에 따라 및/또는 질량 분광분석 검정법에 의해 결정된 바와 같이, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 5%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20% 이상, 또는 약 1~30%, 5~20%, 10~15%, 12~15%, 13~14%, 또는 13.6%의 총 단백질을 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소젠은 약 13.6%의 총 단백질을 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 실시예 162에 기재된 방법에 따라 결정된 바와 같이, 하나 이상의 부가적인 관심 단백질보다 더 풍부하거나 덜 풍부하게 존재한다(또는 존재하는 것으로 식별됨). 일 구현예에서, 푸소젠은 약 140, 145, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157(예를 들어 156.9), 158, 159, 160, 165 또는 170의, EGFP에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 또 다른 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 2700, 2800, 2900, 2910(예를 들어 2912), 2920, 2930, 2940, 2950, 2960, 2970, 2980, 2990 또는 3000, 또는

약 1000~5000, 2000~4000, 2500~3500, 2900~2930, 2910~2915, 또는 2912.0의, CD63에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일 구현예에서, 푸소젠은 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660(예를 들어 664.9), 670, 680, 690 또는 700의, ARRDC1에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 또 다른 구현예에서, 푸소젠은 약 50, 55, 60, 65, 70(예를 들어 69), 75, 80 또는 85, 또는 약 1~30%, 5~20%, 10~15%, 12~15%, 13~14%, 또는 13.6%의, GAPDH에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 또 다른 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560(예를 들어 558.4), 570, 580, 590, 또는 600, 또는 약 300~800, 400~700, 500~600, 520~590, 530~580, 540~570, 550~560, 또는 558.4의, CNX에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨).

[0272] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 43 또는 156의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체 이하의 복사수의 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 43 또는 156의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 단백질 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 핵산 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 RNA 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 외인성 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 외인성 단백질 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 복사수의 외인성 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA) 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소젠의 복사수 : 치료제의 복사수의 비는 1,000,000:1 내지 100,000:1, 100,000:1 내지 10,000:1, 10,000:1 내지 1,000:1, 1,000:1 내지 100:1, 100:1 내지 50:1, 50:1 내지 20:1, 20:1 내지 10:1, 10:1 내지 5:1, 5:1 내지 2:1, 2:1 내지 1:1, 1:1 내지 1:2, 1:2 내지 1:5, 1:5 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1:20 내지 1:50, 1:50 내지 1:100, 1:100 내지 1:1,000, 1:1,000 내지 1:10,000, 1:10,000 내지 1:100,000, 또는 1:100,000 내지 1:1,000,000이다.

[0273] 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 치료제를 표적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 단백질 치료제를 표적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 핵산 치료제를 표적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 RNA 치료제를 표적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000 또는 1,000,000,000 복사체의 DNA 치료제를 표적 세포에 전달한다.

[0274] 일부 구현예에서, 푸소좀은 상기 푸소좀에 의해 포함된 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 적재물(예를 들어 치료제, 예를 들어 내인성 치료제 또는 외인성 치료제)을 표

적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 표적 세포(들)와 융합된 푸소좀은, 상기 표적 세포(들)와 융합된 푸소좀에 의해 포함된 평균적으로 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 적재물(예를 들어 치료제, 예를 들어 내인성 치료제 또는 외인성 치료제)을 표적 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 상기 푸소좀 조성물에 의해 포함된 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 적재물(예를 들어 치료제, 예를 들어 내인성 치료제 또는 외인성 치료제)을 표적 조직에 전달한다.

[0275] 일부 구현예에서, 푸소좀은 1 mg의 총 단백질 당 0.00000001 mg 푸소젠 내지 1 mg 푸소젠을 푸소좀에 포함하며, 예를 들어 1 mg의 총 단백질 당 0.00000001 ~ 0.0000001, 0.0000001 ~ 0.000001, 0.000001 ~ 0.00001, 0.00001 ~ 0.0001, 0.0001 ~ 0.001, 0.001 ~ 0.01, 0.01 ~ 0.1, 또는 0.1 ~ 1 mg 푸소젠을 푸소좀에 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 1 mg의 지질 당 0.00000001 mg 푸소젠 내지 5 mg 푸소젠을 푸소좀에 포함하며, 예를 들어 1 mg의 지질 당 0.00000001 ~ 0.0000001, 0.0000001 ~ 0.000001, 0.000001 ~ 0.00001, 0.00001 ~ 0.0001, 0.0001 ~ 0.001, 0.001 ~ 0.01, 0.01 ~ 0.1, 0.1 ~ 1, 또는 1~5 mg 푸소젠을 푸소좀에 포함한다.

[0276] 일부 구현예에서, 적재물은 단백질 적재물이다. 구현예에서, 적재물은 내인성 또는 합성 단백질 적재물이다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100개 이상의 단백질 적재물 분자를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 일 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 156에 기재된 방법에 따라 정량화된 바와 같이, 1개 푸소좀 당 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 166, 170, 180, 190 또는 200개의 단백질 작용제 분자를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 내인성 또는 합성 단백질 적재물은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 이상의 총 단백질을 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 13.6%의 총 단백질의 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} (예를 들어 6.37×10^{-3}), 7×10^{-3} , 또는 8×10^{-3} 의, VSV-G에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 10, 15, 16, 17, 18(예를 들어 18.6), 19, 20, 25, 또는 30, 또는 약 10~30, 15~25, 16~19, 18~19, 또는 18.6의, CD63에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 2, 3, 4(예를 들어 4.24), 5, 6, 또는 7의, ARRDC1에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4(예를 들어 0.44), 0.5, 0.6, 또는 0.7의, GAPDH에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 1, 2, 3(예를 들어 3.56), 4, 5, 또는 6의, CNX에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 합성 단백질 적재물은 약 10, 15, 16, 17, 18, 19(예를 들어 19.52), 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 30의, TSG101에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨).

[0277] 일부 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 적어도 0.5%, 1%, 5%, 10% 이상의 총 단백질을 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 1~30%, 5~20%, 10~15%, 12~15%, 13~14%, 또는 13.6%의 총 단백질을 푸소좀에 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소젠은 다른 관심 단백질보다 풍부하다. 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 145~170, 150~165, 155~160, 156.9의, 페이로드 단백질, 예를 들어 EGFP에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 1000~5000, 2000~4000, 2500~3500, 2900~2930, 2910~2915, 또는 2912.0의, CD63에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 300~1000, 400~900, 500~800, 600~700, 640~690, 650~680, 660~670, 또는 664.9의, ARRDC1에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 20~120, 40~100, 50~90, 60~80, 65~75, 68~70, 또는 69.0의, GAPDH에 대한 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소젠은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 200~900, 300~800, 400~700, 500~600, 520~590, 530~580, 540~570, 550~560, 또는 558.4의, CNX에 대한 비를 가진다. 구현예에서, 질량 분광분석 검정법은 실시예 162의 검정법이다.

[0278] 일부 구현예에서, 푸소좀과 공급원 세포 둘 모두에 존재하는(또는 푸소좀과 공급원 세포 사이에서 공유되는) 지질 화학종(species)의 수는 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 적어도 300, 400, 500, 550, 560, 또는 569이거나(또는 그런 것으로 식별됨), 또는 500~700, 550~600, 또는 560~580이다. 구현예에서, 공급원 세포에서 상응하는 지질 수준의 적어도 25% 수준(둘 모두는 시료 내의 총 지질 수준에 대해 정규화됨)에서 푸소좀에 존재하는 지질 화학종의 수는 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 적어도 300, 400, 500, 530, 540,

또는 548이거나(또는 그런 것으로 식별됨), 또는 400~700, 500~600, 520~570, 530~560, 또는 540~550이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포 내의 총 지질 화학종에 대한, 푸소좀과 공급원 세포 둘 모두에 존재하는(예를 들어 푸소좀과 공급원 세포 사이에서 공유되는) 지질 화학종의 분획은 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 약 0.4~1.0, 0.5~0.9, 0.6~0.8, 또는 0.7, 또는 적어도 0.4, 0.5, 0.6, 또는 0.7이다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 질량 분광분석 검정법원 실시예 154의 검정법이다.

[0279] 일부 구현예에서, 푸소좀과 공급원 세포 둘 모두에 존재하는(예를 들어 푸소좀과 공급원 세포 사이에서 공유되는) 단백질 화학종의 수는 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 적어도 500, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1487, 1500, 또는 1600이거나(또는 그런 것으로 식별됨), 또는 1200~1700, 1300~1600, 1400~1500, 1450~1500, 또는 1480~1490이다(또는 그런 것으로 식별됨). 구현예에서, 공급원 세포에서 상응하는 단백질 수준의 적어도 25% 수준(둘 모두는 시료 내의 총 단백질 수준에 대해 정규화됨)에서 푸소좀에 존재하는 단백질 화학종의 수는 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 적어도 500, 600, 700, 800, 900, 950, 957, 1000, 또는 1200이다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 공급원 세포 내의 총 단백질 화학종에 대하여 푸소좀과 공급원 세포 둘 모두에 존재하는(예를 들어 푸소좀과 공급원 세포 사이에서 공유되는) 단백질 화학종의 분획은 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 약 0.1~0.6, 0.2~0.5, 0.3~0.4, 또는 0.333, 또는 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.333, 또는 0.4이다(또는 그런 것으로 식별됨). 구현예에서, 질량 분광분석 검정법은 실시예 155의 검정법이다.

[0280] 일부 구현예에서, CD63은 예를 들어 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 157의 검정법에 의해, 푸소좀 내의 총 단백질의 양의 0.048%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 미만으로 존재한다(또는 존재하는 것으로 식별됨).

[0281] 일부 구현예에서, 푸소좀은 필터, 예를 들어 약 1~10, 2~8, 3~7, 4~6, 또는 5 μm 의 필터를 통한 압출에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 약 1~5, 2~5, 3~5, 4~5, 또는 5 μm 의 평균 직경을 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 μm 의 평균 직경을 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨).

[0282] 일부 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포와 비교하여 하기 지질 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 모두)에 대해 농화된다(또는 이에 대해 농화되는 것으로 식별됨): 콜레스테릴 에스테르, 자유(free) 콜레스테롤, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜세린, 포스파티데이트, 에테르-연결된 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 및 스펅고미엘린. 일부 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포와 비교하여 하기 지질 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 모두)에 대해 결실된다(또는 이에 대해 결실되는 것으로 식별됨): 세라마이드, 카디오리핀(cardiolipin), 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜글리세롤, 리소-포스파티딜이노시톨, 에테르-연결된 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 트리아실글리세롤. 일부 구현예에서, 푸소좀은 상기 언급된 농화된 지질 중 하나 이상에 대해 농화되고(또는 이에 대해 농화되는 것으로 식별됨), 상기 언급된 결실된 지질 중 하나 이상에 대해 결실된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포 내의 상응하는 수준보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 5-배, 또는 10-배 더 큰, 총 지질의 퍼센트로서 농화된 지질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포 내의 상응하는 수준의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10%보다 작은 수준에서, 총 지질의 퍼센트로서 결실된 지질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 지질 농화는 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 164의 검정법에 의해 측정된다.

[0283] 일부 구현예에서, CE 지질 수준은 엑소좀에서보다 푸소좀에서 약 2-배 더 크며, 및/또는 부모 세포에서보다(시료 내 총 지질에 비해) 푸소좀에서 약 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 세라마이드 지질 수준은 푸소좀에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 2, 3, 4, 또는 5-배 더 크다(또는 더 큰 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 콜레스테롤 수준은 푸소좀에서보다 엑소좀에서 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 크며, 및/또는 부모 세포에서보다(시료 내 총 지질에 비해) 푸소좀에서 약 2-배 더 높다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, CL 지질 수준은 푸소좀에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 적어도 약 5, 10, 20, 30, 또는 40-배 더 크다(또는 더 큰 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, DAG 지질 수준은 푸소좀에서보다 엑소좀에서 약 2 또는 3-배 더 크며, 및/또는 푸소좀에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 1.5 또는 2-배 더 높다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PC 지질 수준은 엑소좀과 푸소좀 사이에서 약 동일하며, 및/또는 푸소좀에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 또는 1.8-배 더 높다(또는 그런 것으로 식별됨). 일

부 구현예에서, PC 0- 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 약 동일하며, 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 2-배 더 높다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PE 지질 수준은 엑소솜에서보다 푸소솜에서 약 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 또는 1.8-배 더 높으며, 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 또는 1.8-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PE 0- 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PG 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PI 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 3, 4, 5, 6, 또는 7-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PS 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨)(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, SM 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 2, 2.5, 또는 3-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, TAG 지질 수준은 엑소솜과 푸소솜 사이에서 대략 동일하며, 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90, 100-배 이상 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨).

[0284] 일부 구현예에서, 푸소솜은 엑소솜과 비교하여 하기 지질 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 모두)에 대해 농화된다(또는 농화되는 것으로 식별됨): 콜레스테릴 에스테르, 세라마이드, 디아실글리세롤, 리소-포스파티데이트, 포스파티딜에탄올아민, 및 트리아실글리세롤. 일부 구현예에서, 푸소솜은 엑소솜과 비교하여(시료 내 총 지질에 비해) 하기 지질 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 모두)에 대해 농화된다(또는 농화되는 것으로 식별됨): 자유 콜레스테롤, 헥소실 세라마이드, 리소-포스파티딜콜린, 에테르-연결된 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민 및 리소-포스파티딜세린. 일부 구현예에서, 푸소솜은 상기 언급된 농화된 지질 중 하나 이상에 대해 농화되고 상기 언급된 결실된 지질 중 하나 이상에 대해 결실된다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소솜은 엑소솜에서 상응하는 수준보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 5-배, 또는 10-배 더 큰, 총 지질의 퍼센트로서 농화된 지질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소솜은 엑소솜에서 상응하는 수준의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10%보다 작은 수준에서, 총 지질의 퍼센트로서 결실된 지질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 지질 농화는 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 164의 검정법에 의해 측정된다.

[0285] 일부 구현예에서, 세라마이드 지질 수준은 엑소솜에서보다 푸소솜에서 약 2-배 더 높으며 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, HexCer 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높으며 및/또는 부모 세포 및 푸소솜에서(시료 내 총 지질에 비해) 대략 동일하다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPA 지질 수준은 엑소솜에서보다 푸소솜에서 약 3 또는 4-배 더 높으며 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 또는 1.8-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPC 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서 약 2-배 더 높으며 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPC 0- 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서 약 3 또는 4-배 더 높으며 및/또는 부모 세포와 푸소솜 사이에서(시료내 총 지질에 비해) 대략 동일하다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPE 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높으며 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPE 0- 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서 약 2 또는 3-배 더 높으며 및/또는 부모 세포와 푸소솜 사이에서(시료내 총 지질에 비해) 대략 동일하다(또는 그런 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, LPS 지질 수준은 푸소솜에서보다 엑소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 3-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PA 지질 수준은 엑소솜에서보다 푸소솜에서 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2-배 더 높으며 및/또는 부모 세포에서보다 푸소솜에서(시료내 총 지질에 비해) 약 2-배 더 높다(또는 더 높은 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, PG 지질 수준은 푸소솜과 엑소솜 사이에서 대략 동일하며 및/또는 푸소솜에서보다 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 약 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15-배 더 높다(또는 그런 것으로 식별됨).

[0286] 일부 구현예에서, 푸소솜은 공급원 세포의 지질 조성물과 실질적으로 유사한 지질 조성물을 포함하거나, 또는

여기서, CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포에서 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%의 상응하는 지질 수준 내에 있다. 구현예에서, 푸소좀의 지질 조성물은, 이들이 유래되는 세포와 유사하다. 구현예에서, 푸소좀 및 부모 세포는, 부모 세포의 임의의 복제물 시료에서 식별된 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90% 이상의 지질 화학종이 예를 들어 실시예 154에 따라 결정된 바와 같이 푸소좀의 임의의 복제물 시료에 존재한다면 (또는 존재하는 것으로 식별된다면), 유사한 지질 조성물을 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 식별된 지질의 구현예에서, 푸소좀에서의 평균 수준은 부모 세포에서(시료 내 총 지질에 비해) 상응하는 평균 지질 화학종 수준의 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 또는 40%보다 크다. 일 구현예에서, 푸소좀의 지질 조성물은 부모 세포에 비해(시료 내 총 지질에 비해) 특이적인 지질에 대해 농화되며 및/또는 결실된다.

[0287] 일부 구현예에서, 푸소좀의 지질 조성물은 예를 들어 실시예 164에 기재된 방법에 따라 결정된 바와 같이, 부모 세포에 비해(시료 내 총 지질에 비해) 특이적인 지질에 대해 농화되며 및/또는 결실된다(또는 그런 것으로 식별됨).

[0288] 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 비보다 큰, 총 지질에 대한 포스파티딜세린의 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 비에 비해 약 110%, 115%, 120%, 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 130%, 135%, 140% 이상의, 총 지질에 대한 포스파티딜세린의 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포에 비해, 콜레스테롤 에스테르, 자유 콜레스테롤, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜세린, 포스파티데이트, 에테르-연결된 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 및/또는 스핑고미엘린에 대해 농화된다(또는 농화되는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포에 비해, 세라마이드, 카디오리핀, 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜글리세롤, 리소-포스파티딜이노시톨, 에테르-연결된 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 및/또는 트리아실글리세롤에 대해 결실된다(또는 결실되는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀에 비해, 콜레스테롤 에스테르, 세라마이드, 디아실글리세롤, 리소-포스파티데이트, 포스파티딜에탄올아민, 및/또는 트리아실글리세롤에 대해 농화된다(또는 농화되는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀에 비해, 자유 콜레스테롤, 핵소실 세라마이드, 리소-포스파티딜콜린, 에테르-연결된 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민, 및/또는 리소-포스파티딜세린에 대해 결실된다(또는 결실되는 것으로 식별됨).

[0289] 일부 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포에서의 카디오리핀: 세라마이드의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 세라마이드의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 디아실글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 디아실글리세롤의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 핵소실세라마이드의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 핵소실세라마이드의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소포스파티데이트의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소포스파티데이트의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소-포스파티딜콜린의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소-포스파티딜콜린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소-포스파티딜에탄올아민의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소-포스파티딜에탄올아민의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소-포스파티딜글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소-포스파티딜글리세롤의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소-포스파티딜이노시톨의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소-포스파티딜이노시톨의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 리소-포스파티딜세린의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 리소-포스파티딜세린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티데이트의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티데이트의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티딜콜린의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티딜콜린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티딜에탄올아민의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티딜에탄올아민의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티딜글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티딜글리세롤의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티딜이노시톨의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티딜이노시톨의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 포스파티딜세린의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 포스파티딜세린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 콜레스테롤 에스테르의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 콜레스테롤 에스테르의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 스핑고미엘린의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 스핑고미엘린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 카디오리핀: 트리아실글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 카디오리핀: 트리아실글리세롤의 비

[illegible]

[illegible]

를 에스테르: 리소-포스파티딜세린의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티데이트의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티데이트의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티딜글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티딜글리세롤의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티딜이노시톨의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 콜레스테롤 에스테르: 포스파티딜이노시톨의 비를 갖거나; 공급원 세포에서의 콜레스테롤 에스테르: 트리아실글리세롤의 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내의 콜레스테롤 에스테르: 트리아실글리세롤의 비를 갖는다.

[0290] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 42 또는 155의 검정법을 사용하여 공급원 세포와 유사한 단백질 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀의 단백질 조성물은 이들이 유래된 부모 세포와 유사하다. 일부 구현예에서, 복수의 단백질 범주 각각의 분획 함량은, 예를 들어 실시예 155에 기재된 바와 같이, 각각의 범주로부터의 강도 신호의 합계를 시료 내 모든 식별된 단백질의 강도 신호의 합계로 나누어서 결정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 165에 기재된 방법에 따라 결정된 바와 같이, 부모 세포 및/또는 엑소좀에 비해 다양한 양의 구획-특이적인 단백질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포 및 엑소좀과 비교하여 소포체 단백질이 결실되어 있다(또는 결실된 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀과 비교하여 엑소좀 단백질에 대해 결실되어 있다(또는 결실된 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀 단백질인 바와 같이 푸소좀에서 15%, 20%, 또는 25% 미만의 단백질을 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 미토콘드리아 단백질에 대해 결실되어 있다(또는 결실된 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 핵 단백질에 대해 농화되어 있다(또는 농화된 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포 및 엑소좀과 비교하여 리보솜 단백질에 대해 농화된(또는 농화되는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀 내 적어도 0.025%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 단백질은 리보솜 단백질이거나, 푸소좀 내 약 0.025~0.2%, 0.05~0.15%, 0.06~1.4%, 0.07~1.3%, 0.08~1.2%, 0.09~1.1%, 1~20%, 3~15%, 5~12.5%, 7.5~11%, 또는 8.5~10.5%, 또는 9~10%의 단백질은 리보솜 단백질이다.

[0291] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 49의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 공급원 세포에서 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내에서 단백질에 대한 지질의 비를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 유핵 세포에 대해 단백질에 대한 지질 질량과 대략 동일한, 단백질에 대한 지질 질량의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포보다 더 큰 지질:단백질 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 지질:단백질 비의 약 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 131%, 132%, 132.5%, 133%, 134%, 135%, 140%, 145%, 또는 150%의 지질:단백질 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 150의 검정법에서, 약 100~180, 110~170, 120~160, 130~150, 135~145, 140~142, 또는 141 $\mu\text{mol/g}$ 의 인지질:단백질 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 150의 검정법에서, 공급원 세포에서의 상응하는 비의 약 60~90%, 70~80%, 또는 75%인 인지질:단백질 비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨).

[0292] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 50의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 공급원 세포에서의 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내인, 핵산(예를 들어 DNA 또는 RNA)에 대한 단백질의 비를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 유사한, DNA 질량에 대한 단백질 질량의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.2%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 또는 110%인 단백질:DNA의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 50의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 공급원 세포에서의 상응하는 비보다 더 큰, 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 큰, DNA에 대한 단백질의 비를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 151의 검정법에 의해, 약 20~35, 25~30, 26~29, 27~28, 또는 27.8 g/g인 단백질:DNA의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 151의 검정법에 의해, 공급원 세포에서의 상응하는 비의 약 1%, 2%, 5%, 10%, 또는 20% 이내인 단백질:DNA의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨).

[0293] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 51 또는 159의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 공급원 세포에서의 상응하는 비의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내인, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 지질의 비를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 152의 검정법에 의해, 약 2.0~6.0,

3.0~5.0, 3.5~4.5, 3.8~4.0, 또는 3.92 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 의 지질:DNA의 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 51 또는 159의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 공급원 세포에서의 상응하는 비보다 더 큰, 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 큰, 핵산(예를 들어 DNA)에 대한 지질의 비를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀 부모 세포보다 더 큰 지질:DNA 비를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여, 약 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150% 이상의 지질:DNA 비를 포함한다.

[0294]

일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 75의 검정법에 의해, 기준 세포 조성물, 예를 들어 공급원 세포의 반감기의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내인, 대상체, 예를 들어 마우스에서의 반감기를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 134의 검정법에서, 예를 들어 실시예 75의 검정법에 의해, 예를 들어 인간 대상체 또는 마우스에서, 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 또는 24시간인, 대상체, 예를 들어 마우스에서의 반감기를 가진다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 134의 검정법에서, 대상체에서 적어도 1, 2, 4, 6, 12, 또는 24시간의 반감기를 가진다. 일부 구현예에서, 치료제는 푸소좀 조성물의 반감기보다 예를 들어 적어도 10%, 20%, 50%, 2배, 5배, 또는 10배만큼 더 긴, 대상체에서의 반감기를 가진다. 예를 들어, 푸소좀은 치료제를 표적 세포에 전달할 수 있고, 치료제는 푸소좀이 더 이상 존재하지 않거나 검출될 수 없는 후에 존재할 수 있다.

[0295]

일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 64의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 음성 대조군, 예를 들어 글루코스의 부재 하의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과만큼의 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG)를 막을 가로질러 수송한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 126의 검정법에서, 플로레틴(phloretin)으로 처리된 다른 유사한 푸소좀보다 더 큰 수준으로 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG)를 막을 가로질러 수송한다(또는 수송하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 플로레틴으로 처리되지 않은 푸소좀은 예를 들어 실시예 126의 검정법에서, 플로레틴으로 처리된 다른 유사한 푸소좀보다 적어도 1%, 2%, 3%, 5%, 또는 10% 더 높은(및 선택적으로 15%까지 더 높은) 수준으로 글루코스를 수송한다(또는 수송하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 66의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 마우스 배아 섬유아세포에서의 에스테라제 활성의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인, 내강에서의 에스테라제 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 127의 검정법에 의해, 염색되지 않은 대조군보다 적어도 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배, 2000배, 또는 5000배 더 높은, 내강에서의 에스테라제 활성을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 127의 검정법에 의해, 공급원 세포보다 약 10~100배 더 낮은, 내강에서의 에스테라제 활성을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 128의 검정법에 의해, 약 $1\text{E}5$ ~ $1\text{E}6$, $6\text{E}5$ ~ $8\text{E}5$, $6.5\text{E}5$ ~ $7\text{E}5$, 또는 $6.83\text{E}5$ 엑소좀 당량의 아세틸콜린에스테라제 활성을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 68에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 대사 활성 수준의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인 대사 활성 수준(예를 들어 시트레이트 신타제 활성)을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 68에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 대사 활성 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%인 대사 활성 수준(예를 들어 시트레이트 신타제 활성)을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 129의 검정법에 의해, 약 $1\text{E}-2$ ~ $2\text{E}-2$, $1.3\text{E}-2$ ~ $1.8\text{E}-2$, $1.4\text{E}-2$ ~ $1.7\text{E}-2$, $1.5\text{E}-2$ ~ $1.6\text{E}-2$, 또는 $1.57\text{E}-2$ $\mu\text{mol}/\text{ug}$ 푸소좀/min인 시트레이트 신타제 활성을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 69에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 호흡 수준의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내인, 호흡 수준(예를 들어 산소 소모율), 예를 들어 기저(basal), 언커플링(uncoupled), 또는 최대(maximal) 호흡 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 69에 기재된 바와 같이, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포에서의 호흡 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%인, 호흡 수준(예를 들어 산소 소모율), 예를 들어 기저, 언커플링, 또는 최대 호흡 수준을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 130의 검정법에 의해, 약 8~15, 9~14, 10~13, 11~12, 또는 11.3 $\text{pmol}/\text{min}/20\text{ }\mu\text{g}$ 푸소좀의 기저 호흡율을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 130의 검정법에 의해, 약 8~13, 9~12, 10~11, 10~10.2, 또는 10.1 $\text{pmol}/\text{min}/20\text{ }\mu\text{g}$ 푸소좀의 언커플링 호흡율을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 130의 검정법에 의해, 약 15~25, 16~24, 17~23, 18~22, 19~21, 또는 20 $\text{pmol}/\text{min}/20\text{ }\mu\text{g}$ 푸소좀의 최대 호흡율을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨).

식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 130의 검정법에 의해, 예를 들어 약 1%, 2%, 5%, 또는 10%, 예를 들어 약 15%까지의, 안커플링 호흡율보다 더 높은 기저 호흡율을 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 130의 검정법에 의해, 예를 들어 약 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼, 기저 호흡율보다 더 높은 최대 호흡율을 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 70의 검정법을 사용하여, 최대 18,000, 17,000, 16,000, 15,000, 14,000, 13,000, 12,000, 11,000 또는 10,000 MFI의 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좀은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 다른 유사한 푸소좀의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함하거나, 푸소좀은 실시예 70의 검정법에서 메나디온으로 처리된 대식세포의 아넥신-V 염색 수준보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 낮은 아넥신-V 염색 수준을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 131의 검정법에서, 안티마이신 A로 처리된 다른 유사한 푸소좀의 아넥신 V-염색 수준보다 적어도 약 1%, 2%, 5%, 또는 10% 더 낮은 아넥신 V-염색 수준을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 131의 검정법에서, 안티마이신 A로 처리된 다른 유사한 푸소좀의 아넥신 V-염색 수준의 약 1%, 2%, 5%, 또는 10% 이내인 아넥신 V-염색 수준을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨).

[0296] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 39의 검정법에 의해, 공급원 세포의 miRNA 함량 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 miRNA 함량 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 39의 검정법에 의해, 공급원 세포의 miRNA 함량 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의(예를 들어 공급원 세포의 miRNA 함량 수준의 100%까지의) miRNA 함량 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 108의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 총 RNA 함량 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 이상의(예를 들어 공급원 세포의 총 RNA 함량 수준의 100%까지의) 총 RNA 함량 수준을 가진다.

[0297] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 47의 검정법에 의해, 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비보다 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 큰 가용성 : 불용성 단백질 비, 예를 들어 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 비의 1%~2%, 2%~3%, 3%~4%, 4%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는 80%~90% 이내인 가용성 : 불용성 단백질 비를 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 47의 검정법에 의해, 약 0.3~0.8, 0.4~0.7, 또는 0.5~0.6, 예를 들어 약 0.563의 가용성 : 불용성 단백질 비를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 집단은 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 또는 0.5보다 약 0.3~0.8, 0.4~0.7, 0.5~0.6, 또는 0.563 이상 더 큰 가용성 : 불용성 단백질 질량비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀 집단은 공급원 세포의 가용성 : 불용성 단백질 질량비보다 더 큰, 예를 들어 적어도 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 또는 20-배 더 높은 가용성 : 불용성 단백질 질량비를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 구현예에서, 가용성 : 불용성 단백질 질량비는 실시예 123의 검정법에 의해 결정된다. 구현예에서, 가용성 : 불용성 단백질 질량비는 부모 세포에서보다 푸소좀 집단에서 더 낮다(또는 더 낮은 것으로 식별됨). 구현예에서, 부모 세포에 대한 푸소좀의 비가 약 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 또는 8%인 경우(또는 그런 것으로 식별되는 경우), 푸소좀 집단의 가용성 : 불용성 비는 부모 세포의 가용성 : 불용성 비와 대략 동일하다(또는 대략 동일한 것으로 식별됨).

[0298] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 질량 분광분석법에 의해, 예를 들어 실시예 48의 검정법에서 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 LPS 함량의 5%, 1%, 0.5%, 0.01%, 0.005%, 0.0001%, 0.00001% 이하 더 작은 LPS 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 신호 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 실시예 63의 검정법을 사용하여, 음성 대조군, 예를 들어 인슐린의 부재 하에서의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 초과만큼, 인슐린에 반응하여 예를 들어 세포의 신호, 예를 들어 AKT 인산화, 또는 인슐린에 반응하여 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG) 흡수를 전달할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 대상체, 예를 들어 마우스에게 투여 시, 조직, 예를 들어 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이 또는 눈을 표적화하며, 예를 들어 실시예 87 또는 100의 검정법에 의해, 예를 들어 투여된 푸소좀 집단 내의 푸소좀 중 적어도 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가 24, 48 또는 72시간 후 표적 조직에 존재한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 71의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 골수 기질 세포(BMSC)에 의해 유도되는 근접 분비 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 근접분비-신호전달 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 71의 검정법에 의해, 기

준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 골수 기질 세포(BMSC)에 의해 유도되는 근접분비 신호전달 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의(예를 들어 100%까지의) 근접분비-신호전달 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 72의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 대식세포에 의해 유도되는 측분비 신호전달 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 더 큰 측분비-신호전달 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 72의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 대식세포에 의해 유도되는 측분비 신호전달 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의(예를 들어 100%까지의) 더 큰 측분비-신호전달 수준을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 73의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포 내 중합된 액틴 수준과 비교하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이내의 수준에서 액틴을 중합한다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 147의 검정법에 의해, 시간에 걸쳐, 예를 들어 적어도 3, 5, 또는 24시간에 걸쳐 일정한 수준에서 액틴을 중합한다(또는 중합하는 액틴으로서 식별됨). 구현예에서, 액틴 중합 수준은 예를 들어 실시예 147의 검정법에 의해, 5-시간 기간에 걸쳐 1%, 2%, 5%, 10%, 또는 20% 미만만큼 변한다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 74의 검정법에 의해, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 C2C12 세포의 막 전위의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이내에서 막 전위를 갖거나, 푸소좁은 약 -20 내지 -150 mV, -20 내지 -50 mV, -50 내지 -100 mV, 또는 -100 내지 -150 mV의 막 전위를 갖거나, 푸소좁은 -1 mV, -5 mV, -10 mV, -20 mV, -30 mV, -40 mV, -50 mV, -60 mV, -70 mV, -80 mV, -90 mV, -100 mV 미만의 막 전위를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 132의 검정법에서, 약 -25 내지 -35, -27 내지 -32, -28 내지 -31, -29 내지 -30, 또는 -29.6 밀리볼트의 막 전위를 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 57의 검정법을 사용하여, 예를 들어 공급원 세포의 유출 속도의 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 속도에서 혈관으로부터 유출될 수 있고, 예를 들어 공급원 세포는 호중구, 림프구, B 세포, 대식세포 또는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 58의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 대식세포와 비교하여 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의(예를 들어 100%까지의) 화학주성을 할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 60의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 대식세포와 비교하여 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의(예를 들어 100%까지의) 식작용을 할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 세포막, 예를 들어 내피 세포막 또는 혈액 내 장벽을 가로지를 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 62의 검정법을 사용하여, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 마우스 배아 섬유아세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 큰 속도로 단백질을 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 62의 검정법을 사용하여, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 마우스 배아 섬유아세포와 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의(예를 들어 100%까지의) 속도로 단백질을 분비할 수 있다.

[0299] 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 19의 검정법을 사용하여, 전사를 할 수 없거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 전사 활성의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 것보다 작은 전사 활성을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 20의 검정법을 사용하여, 핵 DNA 복제를 할 수 없거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 핵 DNA 복제의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 핵 DNA 복제를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 예를 들어 실시예 37의 검정법을 사용하여, 염색질이 결여되어 있거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 염색질 함량의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 염색질 함량을 가진다.

[0300] 일부 구현예에서, 푸소좁의 특징은 기준 세포와의 비교에 의해 기재된다. 구현예에서, 기준 세포는 공급원 세포이다. 구현예에서, 기준 세포는 HeLa, HEK293, HFF-1, MRC-5, WI-38, IMR 90, IMR 91, PER.C6, HT-1080, 또는 BJ 세포이다. 일부 구현예에서, 푸소좁 집단의 특징은 기준 세포 집단, 예를 들어 공급원 세포 집단, 또는 HeLa, HEK293, HFF-1, MRC-5, WI-38, IMR 90, IMR 91, PER.C6, HT-1080, 또는 BJ 세포의 집단과의 비교에 의해 기재된다.

[0301] 일부 구현예에서, 푸소좁은 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP) 표준을 충족시킨다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었으며, 일부 구현예에서, 푸소좁은 미리 결정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지는, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 푸소좁은 미리 결정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지는, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 푸소좁

은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 낮은 면역원성을 가진다.

[0302] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물의 면역원성은 혈청 불활성화 검정법(예를 들어 항체-매개 중화 또는 보체-매개 분해를 검출하는 검정법)에 의해 검정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 혈청에 의해 불활성화되지 않거나, 미리 결정된 값보다 낮은 수준에서 불활성화된다. 일부 구현예에서, 푸소좀-미접촉 대상체(예를 들어 인간 또는 마우스)의 혈청은 시험 푸소좀 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 푸소좀의 하나 이상의 투여를 받은, 예를 들어 푸소좀의 적어도 2회 투여를 받은 대상체의 혈청은 시험 푸소좀 조성물과 접촉된다. 구현예에서, 그 후에 혈청-노출 푸소좀은 적재물을 표적 세포에 전달하는 능력에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 혈청-인큐베이션 푸소좀의 처리 후 적재물을 검출 가능하게 포함하는 세포의 퍼센트는, 혈청과 접촉되지 않은 양성 대조군 푸소좀의 처리 후 적재물을 검출 가능하게 포함하는 세포의 퍼센트의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%이다. 일부 구현예에서, 혈청 불활성화는 실시예 168의 검정법을 사용하여 측정된다.

[0303] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물의 면역원성은 푸소좀에 반응한 보체 활성화를 검출함으로써 검정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 보체를 활성화시키지 않거나, 보체를 예정된 값보다 낮은 수준에서 활성화시킨다. 일부 구현예에서, 푸소좀-미접촉 대상체(예를 들어 인간 또는 마우스)의 혈청은 시험 푸소좀 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 푸소좀의 하나 이상의 투여를 받은, 예를 들어 푸소좀의 적어도 2회 투여를 받은 대상체의 혈청은 시험 푸소좀 조성물과 접촉된다. 구현예에서, 그 후에 혈청 및 푸소좀을 포함하는 조성물은 예를 들어 ELISA에 의해, 활성화된 보체 인자(예를 들어 C3a)에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변형(예를 들어 기준 세포와 비교하여 보체 조절 단백질의 상승된 수준)을 포함하는 푸소좀은, 변형이 결여된 다른 유사한 푸소좀과 비교하여 감소된 보체 활성화, 예를 들어 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%만큼 감소된 보체 활성화를 겪는다. 일부 구현예에서, 보체 활성화는 실시예 169의 검정법을 사용하여 측정된다.

[0304] 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 집단은 혈청에 의해 실질적으로 불활성화되지 않을 것이다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 집단은 예를 들어 실시예 167 또는 168에 기재된 방법에 따라 정량화된 바와 같이 혈청 불활성화에 대해 저항성(resistant)이다. 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 집단은 혈청에 의해 실질적으로 불활성화되지 않거나, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 따라 푸소좀 또는 푸소좀 집단을 대상체에게 여러 번 투여한 후 혈청 불활성화에 대해 저항성이다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 167 또는 168에 기재된 방법에 따라 정량화된 바와 같이, 예를 들어 변형된 푸소좀의 여러 번의 투여 후, 예를 들어 상응하는 비변형된 푸소좀과 비교하여, 감소된 혈청 불활성화를 갖도록 변형된다.

[0305] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 169에 기재된 방법에 따라 측정된 바와 같이, 보체 활성을 실질적으로 유도하지 않는다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 상응하는 비변형된 푸소좀과 비교하여, 감소된 보체 활성을 유도하도록 변형된다. 구현예에서, 보체 활성화는 보체 단백질(예를 들어 DAF, 붕괴-가속 인자(DAF; decay-accelerating factor, CD55)에 결합하는 단백질, 예를 들어 인자 H(FH)-유사 단백질-1(FHL-1), C4b-결합 단백질(C4BP), 보체 수용체 1(CD35), 막 보조인자 단백질(MCP, CD46), 프로펙틴(Profectin)(CD59), 전형적인 및 대안적인 보체 경로 CD/C5 컨버타제 효소를 저해하는 단백질, 또는 MAC 조립을 조절하는 단백질)의 발현 또는 활성을 세포에서 결정함으로써 측정된다.

[0306] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 내피 세포, 섬유아세포, 혈액 세포(예를 들어 대식세포, 호중구, 과립구, 백혈구), 줄기세포(예를 들어 간엽 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 골수 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 예를 들어 대상체의 세포로부터 유래된 유도 만능 줄기세포), 배아 줄기세포(예를 들어 난황 주머니, 태반, 제대혈, 태아 피부, 성인 피부, 혈액, 골수, 지방 조직, 적혈구생성 조직, 조혈모 조직으로부터의 줄기세포), 근아세포, 실질 세포(예를 들어 간세포), 폐포 세포, 뉴런(예를 들어 망막 신경 세포) 전구 세포(예를 들어 망막 전구 세포, 골수아세포, 골수 전구 세포, 흥선 세포, 감수분열 모세포(meocyte), 거대핵모세포, 쫓겨대핵모세포, 멜라닌모세포, 림프아세포, 골수 전구 세포, 정적아구(normoblast), 또는 혈관모세포(angioblast)), 전구 세포(예를 들어 심장 전구 세포, 위성 세포(satellite cell), 방사 신경교 세포(radial glial cell), 골수 기질 세포, 체장 전구 세포, 내피 전구 세포, 아세포(blast cell)), 또는 불멸화된 세포(예를 들어 HeLa, HEK293, HFF-1, MRC-5, WI-38, IMR 90, IMR 91, PER.C6, HT-1080, 또는 BJ 세포)이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 293 세포, HEK 세포, 인간 내피 세포, 또는 인간 상피 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 또는 줄기세포 이외의 세포이다.

[0307] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 ARRDC1 또는 이의 활성 단편 또는 변이체를 발현한다(예를 들어 과발현함). 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 1~3, 1~10, 1~100,

3~10, 4~9, 5~8, 6~7, 15~100, 60~200, 80~180, 100~160, 120~140, 3~100, 4~100, 5~100, 6~100, 15~100, 80~100, 3~200, 4~200, 5~200, 6~200, 15~200, 80~200, 100~200, 120~200, 300~1000, 400~900, 500~800, 600~700, 640~690, 650~680, 660~670, 100~10,000, 또는 약 664.9의 ARRDC1에 대한 푸소젠의 비를 가진다. 일부 구현예에서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRDC1의 수준은 적어도 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%; 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%; 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%이거나; 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRDC1의 수준은 예를 들어 질량 분광분석에 의해, 예를 들어 실시예 166에 기재된 방법에 따라 측정된 바와 같이, 약 0.05~1.5%, 0.1~0.3%, 0.05~0.2%, 0.1~0.2%, 0.25~7.5%, 0.5~1.5%, 0.25~1%, 0.5~1%, 0.05~1.5%, 10~30%, 5~20%, 또는 10~20%이다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 162의 검정법을 사용하여, 약 100~1,000, 100~400, 100~500, 200~400, 200~500, 200~1,000, 300~400, 1,000~10,000, 2,000~5,000, 3,000~4,000, 3,050~3,100, 3,060~3,070, 또는 약 3,064, 10,000~100,000, 10,000~200,000, 10,000~500,000, 20,000~500,000, 30,000~400,000의, tsg101에 대한 푸소젠의 비를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 예를 들어 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 163의 검정법을 사용하여, 약 1~3, 1~30, 1~20, 1~25, 1.5~30, 10~30, 15~25, 18~21, 19~20, 10~300, 10~200, 15~300, 15~200, 100~300, 100~200, 150~300, 또는 약 19.5의, tsg101에 대한 적재물의 비를 가진다. 일부 구현예에서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준은 적어도 약 0.0001%, 0.0002%, 0.0003%, 0.0004%, 0.0005%, 0.0006%, 0.0007%, 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.004%, 0.005%, 0.006%, 0.007%; 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%이거나; 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준은 예를 들어 질량 분광분석, 예를 들어 실시예 166에 기재된 방법에 따라 측정된 바와 같이, 약 0.0001~0.001, 0.0001~0.002, 0.0001~0.01, 0.0001~0.1, 0.001~0.01, 0.002~0.006, 0.003~0.005, 0.001~0.1, 0.01~0.1, 0.02~0.06, 0.03~0.05, 또는 0.004이다.

[0308] 일부 구현예에서, 푸소좀은 적재물, 예를 들어 치료제, 예를 들어 내인성 치료제 또는 외인성 치료제를 포함한 다. 일부 구현예에서, 치료제는 단백질, 예를 들어 효소, 막관통 단백질, 수용체, 항체; 핵산, 예를 들어 DNA, 염색체(예를 들어 인간 인공 염색체), RNA, mRNA, siRNA, miRNA, 또는 저분자 중 하나 이상으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 치료제는 미토콘드리아 이외의 세포소기관, 예를 들어 핵, 골지체, 리소좀, 소포체, 액포, 엔도솜, 침체, 자가포식소체, 중심립, 글리코솜, 글리옥시솜, 하이드로게노솜, 멜라노솜, 미토솜, 자포, 퍼옥시솜, 프로테아솜, 소낭 및 스트레스 과립으로부터 선택되는 세포소기관이다. 일부 구현예에서, 세포소기관은 미토콘드리아이다.

[0309] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포내이입에 의해 표적 세포에 진입하며, 예를 들어, 세포내이입 경로를 통해 전달되는 치료제의 수준은 예를 들어 실시예 91의 검정법을 사용하여, 0.01~0.6, 0.01~0.1, 0.1~0.3 또는 0.3~0.6 이거나, 유사한 푸소좀과 접촉된 클로로퀸 처리 기준 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 크다. 일부 구현예에서, 표적 세포에 진입하는 푸소좀 조성물 내 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 푸소좀은 비-세포내이입 경로를 통해 진입하며, 예를 들어 푸소좀은 세포 표면과의 융합을 통해 표적 세포에 진입한다. 일부 구현예에서, 주어진 푸소좀에 대해 비-세포내이입 경로를 통해 전달되는 치료제의 수준은 예를 들어 실시예 90의 검정법을 사용하여, 0.1~0.95, 0.1~0.2, 0.2~0.3, 0.3~0.4, 0.4~0.5, 0.5~0.6, 0.6~0.7, 0.7~0.8, 0.8~0.9, 0.9~0.95이거나, 또는 클로로퀸 처리 기준 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 크다.

[0310] 일부 구현예에서, 표적 세포에 진입하는 푸소좀 조성물 내 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 푸소좀은 세포질에 진입한다(예를 들어 엔도솜 또는 리소솜에 진입하지 않음). 일부 구현예에서, 표적 세포에 진입하는 푸소좀 조성물 내 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 푸소좀은 엔도솜 또는 리소솜에 진입한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 비-세포내이입 경로에 의해 표적 세포에 진입하며, 예를 들어, 전달되는 치료제의 수준은 예를 들어 실시예 91의 검정법을 사용하여, 클로로퀸 처리 기준 세포의 수준의 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%이다. 일 구현예에서, 푸소좀은 작용제를 디나민-매개 경로를 통해 표적 세포에 전달한다. 일 구현예에서, 디나민-매개 경로를 통해 전달되는 작용제의 수준은 예를 들어 실시예 92의 검정법에서 측정된 바와 같이, 0.01~0.6의 범위이거나, 유사한 푸소좀과 접촉된 디나소어 처리 표적 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 크다. 일 구현예에서, 푸소좀은 작용제를 거대음작용을 통해 표적 세포에 전달한다. 일 구현예에서, 거대음작용을 통해 전달되는 작용제의 수준은 예를 들어 실시예 92의 검정법에서 측정된 바와 같이, 0.01~0.6의 범위이거나, 유사한 푸소좀과 접촉된 디나소어 처리 표적 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 크다. 일 구현예에서, 푸소좀은 작용제를 액틴-매개 경로를 통해 표적

세포에 전달한다. 일 구현예에서, 액틴-매개 경로를 통해 전달되는 작용제의 수준은 예를 들어 실시예 92의 검정법에서 측정된 바와 같이, 0.01~0.6의 범위이거나, 유사한 푸소좀과 접촉된 라트쿨린 B 처리 표적 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 크다.

[0311] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 33의 검정법에 의해, <1, 1~1.1, 1.05~1.15, 1.1~1.2, 1.15~1.25, 1.2~1.3, 1.25~1.35, 또는 >1.35 g/ml의 밀도를 가진다.

[0312] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 단백질 질량에 의해 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 미만의 공급원 세포를 포함하거나, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 미만의 세포가 기능성 핵을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물 내 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 푸소좀은 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아를 포함한다.

[0313] 일부 구현예에서, 푸소좀은 외인성 치료제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 외인성 치료제는 단백질, 예를 들어 효소, 막관통 단백질, 수용체, 항체; 핵산, 예를 들어 DNA, 염색체(예를 들어 인간 인공 염색체), RNA, mRNA, siRNA, miRNA, 또는 저분자 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0314] 구현예에서, 푸소좀은 세포내이입 또는 비-세포내이입 경로를 통해 세포에 진입한다.

[0315] 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 냉장되거나 냉동된다. 구현예에서, 푸소좀은 기능성 핵을 포함하지 않거나, 푸소좀 조성물은 기능성 핵 없이 푸소좀을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 단백질 질량에 의해 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 미만의 공급원 세포를 포함하거나, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 미만의 세포가 기능성 핵을 가진다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 적어도 1, 2, 3, 6, 또는 12시간; 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 1, 2, 3, 또는 4주; 1, 2, 3, 또는 6개월; 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5년 동안 상기 온도에서 유지되어 왔다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 하기 중 하나 이상에 의해, 상기 온도에서 유지되기 전의 집단의 활성의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 활성을 가진다:

[0316] i) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 비-표적 세포보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 또는 100-배만큼 더 높은 속도로 융합하며;

[0317] ii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 다른 푸소좀보다 표적 세포와 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 더 높은 속도로 융합하며;

[0318] iii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 54의 검정법에서, 푸소좀 내의 작용제가 24, 48 또는 72시간 후 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 표적 세포에 전달되는 속도로 표적 세포와 융합하며; 또는

[0319] iv) 푸소좀은 예를 들어 실시예 29의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도, 또는 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000 또는 1,000,000 복사체 이하의 복사수로 존재한다.

[0320] 구현예에서, 푸소좀 조성물은 4℃ 미만의 온도에서 적어도 1, 2, 3, 6, 또는 12시간; 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 1, 2, 3, 또는 4주; 1, 2, 3, 또는 6개월; 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5년 동안 안정하다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 -20℃ 미만의 온도에서 적어도 1, 2, 3, 6, 또는 12시간; 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 1, 2, 3, 또는 4주; 1, 2, 3, 또는 6개월; 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5년 동안 안정하다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 -80℃ 미만의 온도에서 적어도 1, 2, 3, 6, 또는 12시간; 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 1, 2, 3, 또는 4주; 1, 2, 3, 또는 6개월; 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5년 안정하다.

[0321] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:

[0322] i) 공급원 세포는 293 세포 이외의 것이며;

[0323] ii) 공급원 세포는 형질변환되지 않거나 불멸화되지 않으며;

[0324] iii) 공급원 세포는 아데노바이러스-매개 불멸화 이외의 방법을 사용하여 형질변환되거나 불멸화되며, 예를 들어 자발적 돌연변이 또는 텔로머라제 발현에 의해 불멸화되며;

[0325] iv) 푸소좀은 VSVG, SNARE 단백질, 또는 분비성 과립 단백질 이외의 것이며;

[0326] v) 치료제는 Cre 또는 EGFP 이외의 것이며;

- [0327] vi) 치료제는 핵산(예를 들어 RNA, 예를 들어 mRNA, miRNA, 또는 siRNA), 또는 예를 들어 내강 내에서 외인성 단백질(예를 들어 항체, 예를 들어 항체)이며; 또는
- [0328] vii) 푸소좀은 미토콘드리아를 포함하지 않는다.
- [0329] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0330] i) 공급원 세포는 293 또는 HEK 세포 이외의 것이며;
- [0331] ii) 공급원 세포는 형질변환되지 않거나 불멸화되지 않으며;
- [0332] iii) 공급원 세포는 아데노바이러스-매개 불멸화 이외의 방법을 사용하여 형질변환되거나 불멸화되며, 예를 들어 자발적 돌연변이 또는 텔로머라제 발현에 의해 불멸화되며;
- [0333] iv) 푸소젠은 바이러스 푸소젠이 아니며; 또는
- [0334] v) 푸소좀은 40 내지 150 nm 이외의 크기, 예를 들어 150 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 또는 500 nm 초과 크기 가진다.
- [0335] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0336] i) 치료제는 공급원 세포에 의해 발현되는 가용성 단백질이며;
- [0337] ii) 푸소젠은 TAT, TAT-HA2, HA-2, gp41, 알츠하이머 베타-아밀로이드 펩타이드, 센다이 바이러스 단백질, 또는 양친매성 net-음성 펩타이드(amphipathic net-negative peptide)(WAE 11) 이외의 것이며;
- [0338] iii) 푸소젠은 포유류 푸소젠이며;
- [0339] iv) 푸소좀은 이의 내강에 효소, 항체, 또는 항-바이러스 폴리펩타이드로부터 선택되는 폴리펩타이드를 포함하며;
- [0340] v) 푸소좀은 외인성 치료 막관통 단백질을 포함하지 않으며; 또는
- [0341] vi) 푸소좀은 CD63 또는 GLUT4를 포함하지 않거나, 푸소좀은 예를 들어 실시예 157에 기재된 방법에 따라 결정된 바와 같이, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 또는 10% 이하의(예를 들어 약 0.048% 이하의) CD63을 포함한다.
- [0342] 구현예에서, 푸소좀은:
- [0343] i) 바이러스를 포함하지 않거나, 감염성이 아니거나, 숙주 세포에서 전파되지 않으며;
- [0344] ii) 바이러스 백터가 아니며;
- [0345] iii) VLP(바이러스 유사 입자)가 아니며;
- [0346] iv) 바이러스 구조 단백질, 예를 들어 gag로부터 유래되는 단백질, 예를 들어 바이러스 캡시드 단백질, 예를 들어 바이러스 캡슐 단백질, 예를 들어 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하지 않거나, 바이러스 캡시드 단백질의 양은 예를 들어 질량 분광분석법, 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법을 사용하여, 총 단백질의 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2%, 또는 0.1% 미만이며;
- [0347] v) 바이러스 매트릭스 단백질을 포함하지 않으며;
- [0348] vi) 바이러스 비-구조 단백질; 예를 들어 pol 또는 이의 단편 또는 변이체, 바이러스 리버스 트랜스크립타제 단백질, 바이러스 인테그라제 단백질, 또는 바이러스 프로테아제 단백질을 포함하지 않으며;
- [0349] vii) 바이러스 핵산; 예를 들어 바이러스 RNA 또는 바이러스 DNA를 포함하지 않으며;
- [0350] viii) 바이러스 구조 단백질의 1개 소당 당 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 미만의 복사체를 포함하며; 또는
- [0351] ix) 푸소좀은 비로좀(virosome)이 아니다.
- [0352] 일부 구현예에서, 푸소좀은 약 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 미만의 바이러스 캡시드 단백질(예를 들어 약 0.05%

바이러스 캡시드 단백질을 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 바이러스 캡시드 단백질은 토끼 내인성 렌티바이러스(RELIK) 캡시드와 사이클로필린 A(Cyclophilin A)의 복합체이다. 구현예에서, 바이러스 캡시드 단백질: 총 단백질 비는 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 또는 0.1이다(또는 그런 것으로 식별됨).

- [0353] 일부 구현예에서, 푸소좀은 gag 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하지 않거나(또는 포함하지 않는 것으로 식별됨), gag 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체의 양은 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법에 의해, 총 단백질의 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2%, 또는 0.1% 미만이다.
- [0354] 구현예에서, 푸소좀의 복사수 : 푸소좀 상 바이러스 구조 단백질의 복사수의 비는 적어도 1,000,000:1, 100,000:1, 10,000:1, 1,000:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 또는 1:1이거나; 100:1 내지 50:1, 50:1 내지 20:1, 20:1 내지 10:1, 10:1 내지 5:1 또는 1:1이다. 구현예에서, 푸소좀의 복사수 : 푸소좀 상 바이러스 매트릭스 단백질의 복사수의 비는 적어도 1,000,000:1, 100,000:1, 10,000:1, 1,000:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 또는 1:1이다.
- [0355] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0356] i) 푸소좀은 수(water)-비혼화성 액적을 포함하지 않으며;
- [0357] ii) 푸소좀은 수성 내강 및 친수성 외부(exterior)를 포함하며;
- [0358] iii) 푸소좀은 단백질 푸소좀이 아니며; 또는
- [0359] iv) 세포소기관은 미토콘드리아, 골지체, 리소좀, 소포체, 액포, 엔도좀, 침체, 자가포식소체, 중심립, 글리코좀, 글리옥시좀, 하이드로게노좀, 멜라노좀, 미토좀, 자포, 퍼옥시좀, 프로테아좀, 소낭 및 스트레스 과립으로부터 선택된다.
- [0360] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0361] i) 푸소좀은 포유류 푸소좀 또는 바이러스 푸소좀이며;
- [0362] ii) 푸소좀은 푸소좀에 치료 또는 진단 성분을 로딩함으로써 제조되지 않았으며;
- [0363] iii) 공급원 세포에 치료 또는 진단 성분이 로딩되지 않았으며;
- [0364] iv) 푸소좀은 독소루비신, 텍사메타손, 사이클로렉스트린; 폴리에틸렌 글리콜, 마이크로 RNA, 예를 들어 miR125, VEGF 수용체, ICAM-1, E-셀렉틴, 철 옥사이드, 형광 단백질, 예를 들어 GFP 또는 RFP, 나노입자 또는 RNase를 포함하지 않거나, 상기 중 임의의 것의 외인성 형태를 포함하지 않으며; 또는
- [0365] v) 푸소좀은 하나 이상의 번역-후 변형, 예를 들어 글리코실화를 갖는 외인성 치료제를 추가로 포함한다.
- [0366] 구현예에서, 푸소좀은 단일층(unilamellar) 또는 다층(multilamellar)이다.
- [0367] 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 30의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 크기의 약 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이내인 크기를 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 크기를 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 30의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 크기의 약 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 미만인 크기를 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 크기를 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포보다 작은 크기를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 약 50%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 또는 90% 이내인 크기를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 크기 분포에서, 예를 들어 약 90%의 시료 내에서, 약 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% 이하의 부모 세포의 가변성을 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 크기 분포에서, 예를 들어 약 90%의 시료 내에서, 약 40%, 45%, 50%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 65%, 또는 70% 미만의 부모 세포의 가변성을 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 일부 구현예에서, 푸소좀은 직경에서 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 또는 70 nm 초과와 평균 크기를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 직경에서 약 100, 110, 120, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 140, 또는 150 nm의 평균 크기를 가진다(또는 가진 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 30의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 크기의 약 0.01%~0.05%, 0.05%~0.1%, 0.1%~0.5%, 0.5%~1%, 1%~2%, 2%~3%, 3%~4%, 4%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는

80%~90% 이내인 크기를 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 크기를 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 30의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포의 크기의 약 0.01%~0.05%, 0.05%~0.1%, 0.1%~0.5%, 0.5%~1%, 1%~2%, 2%~3%, 3%~4%, 4%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는 80%~90% 미만의 크기를 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 크기를 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 119, 120, 또는 121의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 500 nm 미만의(예를 들어 약 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 450 nm 미만의) 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 119, 120, 또는 121의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 약 80~180, 90~170, 100~160, 110~150, 120~140, 또는 130 nm의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 119, 120, 또는 121의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 약 11,000 nm 내지 21,000 nm의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 119, 120, 또는 121의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 약 10~22,000, 12~20,000, 14~18,720 nm, 20~16,000 nm의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 119, 120, 또는 121의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, $0.01\sim0.1\ \mu\text{m}^3$, $0.02\sim1\ \mu\text{m}^3$, $0.03\sim1\ \mu\text{m}^3$, $0.04\sim1\ \mu\text{m}^3$, $0.05\sim0.09\ \mu\text{m}^3$, $0.06\sim0.08\ \mu\text{m}^3$, $0.07\ \mu\text{m}^3$ 의 용적을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 용적을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 32의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 또는 250 nm의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 32의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 또는 250 nm(예를 들어 $\pm 20\%$)의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 32의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 500 nm, 750 nm, 1,000 nm, 1,500 nm, 2,000 nm, 2,500 nm, 3,000 nm, 5,000 nm, 10,000 nm, 또는 20,000 nm의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 실시예 32의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 500 nm, 750 nm, 1,000 nm, 1,500 nm, 2,000 nm, 2,500 nm, 3,000 nm, 5,000 nm, 10,000 nm, 또는 20,000 nm(예를 들어 $\pm 20\%$)의 직경을 갖거나, 푸소좀 집단은 이러한 평균 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀 집단은 예를 들어 실시예 120의 검정법에 의해, 하기 중 하나 이상을 가진다(또는 갖는 것으로 식별됨): 약 40~90 nm, 45~60 nm, 50~55 nm 또는 53 nm의 10% 변위치 직경; 약 70~100 nm, 80~95 nm, 85~90 nm, 또는 88 nm의 25% 변위치 직경; 약 200~250 nm, 210~240 nm, 220~230 nm, 또는 226 nm의 75% 변위치 직경; 또는 약 4000~5000 nm, 4300~4600 nm, 4400~4500 nm, 4450 nm의 90% 변위치 직경.

- [0368] 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 실시예 149의 검정법에서, 약 35~40, 36~39, 37~38, 또는 37.2 ng/mL의 GAPDH 농도를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀 조성물의 GAPDH 농도는 예를 들어 실시예 149의 검정법에서, 공급원 세포의 GAPDH 농도의 약 1%, 2%, 5%, 10%, 또는 20% 이내이다(또는 그런 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀 조성물의 GAPDH 농도는 예를 들어 실시예 149의 검정법에서, 공급원 세포의 GAPDH 농도보다 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 또는 20% 더 낮다(또는 더 낮은 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀 조성물은 총 단백질 1 그램 당 약 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 또는 70 μg 미만의 GAPDH를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀 조성물은 총 단백질 1 그램 당 약 500, 250, 100, 또는 50 μg 미만의 GAPDH를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨). 구현예에서, 부모 세포는 푸소좀 조성물보다 총 단백질 당 적어도 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 30%, 50% 이상의 GAPDH를 포함한다(또는 포함하는 것으로 식별됨).
- [0369] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0370] i) 푸소좀은 엑소좀이 아니며;
- [0371] ii) 푸소좀은 미세소낭이며;
- [0372] iii) 푸소좀은 비-포유류 푸소젠이며;
- [0373] iv) 푸소좀은 푸소젠을 혼입하도록 조작되었으며;
- [0374] v) 푸소좀은 외인성 푸소젠을 포함하며;
- [0375] vi) 푸소좀은 적어도 80 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm, 또는 1500 nm의 크기를 갖거나, 푸소좀 집단은 적어도 80 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm, 또는 1500 nm의 평

균 크기를 가지며;

- [0376] vii) 푸소좀은 하나 이상의 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아, 골지체, 리소좀, 소포체, 액포, 엔도솜, 침체, 자가포식소체, 중심립, 글리코솜, 글리옥시솜, 하이드로게노솜, 멜라노솜, 미토솜, 자포, 퍼옥시솜, 프로테아솜, 소낭 및 스트레스 과립을 포함하며;
- [0377] viii) 푸소좀은 세포골격 또는 이의 구성성분, 예를 들어 액틴, Arp2/3, 포르민, 코로닌(coronin), 디스트로핀(dystrophin), 케라틴, 미오신 또는 튜불린을 포함하며;
- [0378] ix) 푸소솜, 또는 복수의 푸소솜을 포함하는 조성물 또는 조제물은 예를 들어 문헌[Thery et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3:Unit 3.22]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 수크로스 구배 원심분리 검정법에서, 1.08~1.22 g/ml의 부유 밀도를 갖지 않거나, 적어도 1.18~1.25 g/ml, 또는 1.05~1.12 g/ml의 밀도를 가지며;
- [0379] x) 지질 이중층은 공급원 세포와 비교하여 세라마이드, 스핑고미엘린 또는 이들의 조합에 대해 농화되거나, 지질 이중층은 당지질, 자유 지방산, 포스파티딜세린 또는 이들의 조합에 대해 농화되지 않으며(예를 들어 결실되며);
- [0380] xi) 푸소솜은 예를 들어 실시예 52 또는 160의 검정법에서 측정 시, 포스파티딜 세린(PS) 또는 CD40 리간드, 또는 PS와 CD40 리간드 둘 모두를 포함하며;
- [0381] xii) 푸소솜은 예를 들어 문헌[Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442]의 검정법에 의해, 공급원 세포와 비교하여 PS에 대해 농화되며, 예를 들어 푸소솜 집단에서 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가 PS에 대해 양성이며;
- [0382] xiii) 푸소솜은 아세틸콜린에스터라제(AChE)가 실질적으로 없거나, 또는 예를 들어 실시예 67의 검정법에 의해, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 또는 1000 미만의 AChE 활성 단위/ug 단백질을 함유하며;
- [0383] xiv) 푸소솜은 예를 들어 실시예 44 또는 157의 검정법에 의해, 테트라스판닌(Tetraspanin) 과(과) 단백질(예를 들어 CD63, CD9, 또는 CD81), ESCRT-관련 단백질(예를 들어 TSG101, CHMP4A-B, 또는 VPS4B), Alix, TSG101, MHCI, MHCII, GP96, 액티닌-4, 미토파린(mitofilin), 신테닌-1, TSG101, ADAM10, EHD4, 신테닌-1, TSG101, EHD1, 플로틸린(flotillin)-1, 열-충격 70-kDa 단백질(HSC70/HSP73, HSP70/HSP72) 또는 이들의 임의의 조합이 실질적으로 없거나, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 5%, 또는 10% 미만의 임의의 개별 엑소솜 마커 단백질 및/또는 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만의, 상기 임의의 단백질의 총 엑소솜 마커 단백질을 함유하거나, 공급원 세포와 비교하여 이들 단백질 중 임의의 하나 이상에 대해 탈-농화되거나, 이들 단백질 중 임의의 하나 이상에 대해 농화되지 않으며;
- [0384] xv) 푸소솜은 예를 들어 실시예 45의 검정법을 사용하여, 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5, 또는 1 ng GAPDH/ug 총 단백질보다 낮거나 공급원 세포 내 GAPDH 수준보다 낮은, 예를 들어 공급원 세포 내 총 단백질 당 GAPDH 수준 ng/ug보다 낮은, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 글리세르알데하이드 3-포스페이트 탈하이드로게나제(GAPDH) 수준을 가지며;
- [0385] xvi) 푸소솜은 하나 이상의 소포체 단백질(예를 들어 칼넥신(calnexin)), 하나 이상의 프로테아솜 단백질, 또는 하나 이상의 미토콘드리아 단백질 또는 이들의 임의의 조합에 대해 농화되며, 예를 들어 칼넥신의 양은 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5, 또는 1 ng 칼넥신/ug 총 단백질보다 작거나, 푸소솜은 예를 들어 실시예 46 또는 158의 검정법을 사용하여, 공급원 세포와 비교하여 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 총 단백질 당 더 적은 칼넥신 ng/ug을 포함하거나, 푸소솜 내 칼넥신의 평균 분획 함량은 약 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 2.1×10^{-4} , 2.2×10^{-4} , 2.3×10^{-4} ; 2.4×10^{-4} , 2.43×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 2.6×10^{-4} , 2.7×10^{-4} , 2.8×10^{-4} , 2.9×10^{-4} , 3×10^{-4} , 3.5×10^{-4} , 또는 4×10^{-4} 미만이거나, 푸소솜은 부모 세포의 총 단백질 당 칼넥신의 양보다 약 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 95%, 99% 이상만큼 더 낮은, 총 단백질 당 칼넥신의 양을 포함하며;
- [0386] xvii) 푸소솜은 예를 들어 실시예 39 또는 40의 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이 외인성 작용제(예를 들어 외인성 단백질, mRNA, 또는 siRNA)를 포함하며; 또는

- [0387] xviii) 푸소솜은 예를 들어 문헌[Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442]에 기재된 바와 같이 원 자힘 현미경에 의해 운모(mica) 표면 상에 적어도 30분 동안 고정될 수 있다.
- [0388] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0389] i) 푸소솜은 엑소솜이며;
- [0390] ii) 푸소솜은 미세소낭이 아니며;
- [0391] iii) 푸소솜은 80 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm, 또는 1500 nm보다 작은 크기를 갖 거나, 푸소솜 집단은 80 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm, 또는 1500 nm보다 작은 평 균 크기를 가지며;
- [0392] iv) 푸소솜은 세포소기관을 포함하지 않으며;
- [0393] v) 푸소솜은 세포골격 또는 이의 구성성분, 예를 들어 액틴, Arp2/3, 포르민, 코로닌, 디스트로핀, 케라틴, 미 오신, 또는 튜불린을 포함하지 않으며;
- [0394] vi) 푸소솜, 또는 복수의 푸소솜을 포함하는 조성물 또는 조제물은 예를 들어 문헌[Thery et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3:Unit 3.22]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 수크로스 구배 원심분리 검정법에 서, 1.08~1.22 g/ml의 부유 밀도를 가지며;
- [0395] vii) 지질 이중층은 공급원 세포와 비교하여 세라마이드, 스핑고미엘린 또는 이들의 조합에 대해 농화되지 않거 나(예를 들어 결실되거나), 지질 이중층은 당지질, 자유 지방산, 포스파티딜세린 또는 이들의 조합에 대해 농화 되며;
- [0396] viii) 푸소솜은 예를 들어 실시예 52 또는 160의 검정법에서 측정 시, 포스파티딜 세린(PS) 또는 CD40 리간드, 또는 PS와 CD40 리간드 둘 모두를 포함하지 않거나, 공급원 세포에 비해 결실되며;
- [0397] ix) 푸소솜은 예를 들어 문헌[Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442]의 검정법에 의해, 공급 원 세포와 비교하여 PS에 대해 농화되지 않으며(예를 들어 결실되며), 예를 들어 푸소솜 집단에서 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만이 PS에 대해 양성이며;
- [0398] x) 푸소솜은 아세틸콜린에스터라제(AChE)를 포함하며, 예를 들어 실시예 67의 검정법에 의해, 적어도 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 또는 1000 AChE 활성 단위/ug 단백질을 포함하며;
- [0399] xi) 푸소솜은 예를 들어 실시예 44 또는 157의 검정법에 의해, 테트라스패닌 과 단백질(예를 들어 CD63, CD9, 또는 CD81), ESCRT-관련 단백질(예를 들어 TSG101, CHMP4A-B, 또는 VPS4B), Alix, TSG101, MHC I, MHC II, GP96, 액티닌-4, 미토필린, 신테닌-1, TSG101, ADAM10, EHD4, 신테닌-1, TSG101, EHD1, 플로틸린-1, 열-충격 70-kDa 단백질(HSC70/HSP73, HSP70/HSP72) 또는 이들의 임의의 조합을 포함하며, 예를 들어 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 5%, 또는 10% 초과와 임의의 개별 엑소솜 마커 단백질 및/또는 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만의, 상기 임의의 단백질의 총 엑소솜 마커 단백질을 함유하거나, 공 급원 세포와 비교하여 이들 단백질 중 임의의 하나 이상에 대해 농화되며;
- [0400] xii) 푸소솜은 예를 들어 실시예 45의 검정법을 사용하여, 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5, 또는 1 ng GAPDH/ug 총 단백질보다 높거나 공급원 세포 내 GAPDH 수준보다 낮은, 예를 들어 공급원 세포 내 총 단백질 당 GAPDH 수 준 ng/ug보다 적어도 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 큰 글리세르 알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH) 수준을 가지며;
- [0401] xiii) 푸소솜은 하나 이상의 소포체 단백질(예를 들어 칼넥신), 하나 이상의 프로테아좀 단백질, 또는 하나 이 상의 미토콘드리아 단백질 또는 이들의 임의의 조합에 대해 농화되지 않으며(예를 들어 이에 대해 결실되며), 예를 들어 칼넥신의 양은 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5, 또는 1 ng 칼넥신/ug 총 단백질보다 작거나, 푸소솜 은 예를 들어 실시예 46 또는 158의 검정법을 사용하여, 공급원 세포와 비교하여 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 총 단백질 당 더 적은 칼넥신 ng/ug을 포함하거나, 푸소솜

내 칼넥신의 평균 분획 함량은 약 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 2.1×10^{-4} , 2.2×10^{-4} , 2.3×10^{-4} , 2.4×10^{-4} , 2.43×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 2.6×10^{-4} , 2.7×10^{-4} , 2.8×10^{-4} , 2.9×10^{-4} , 3×10^{-4} , 3.5×10^{-4} , 또는 4×10^{-4} 미만이거나, 푸소좀은 부모 세포의 총 단백질 당 칼넥신의 양보다 약 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 95%, 99% 이상만큼 더 낮은, 총 단백질 당 칼넥신의 양을 포함하며; 또는

- [0402] xiv) 푸소좀은 예를 들어 문헌[Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442]에 기재된 바와 같이 원자힘 현미경에 의해 운모 표면 상에 적어도 30분 동안 고정될 수 있다.
- [0403] 구현예에서, 푸소좀 내 칼넥신의 평균 분획 함량은 약 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 2.1×10^{-4} , 2.2×10^{-4} , 2.3×10^{-4} , 2.4×10^{-4} , 2.43×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 2.6×10^{-4} , 2.7×10^{-4} , 2.8×10^{-4} , 2.9×10^{-4} , 3×10^{-4} , 3.5×10^{-4} , 또는 4×10^{-4} 미만이다 (또는 미만인 것으로 식별됨). 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포의 총 단백질 당 칼넥신의 양보다 약 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 95%, 99% 이상만큼 더 낮은, 총 단백질 당 칼넥신의 양을 포함한다.
- [0404] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0405] i) 푸소좀은 VLP를 포함하지 않으며;
- [0406] ii) 푸소좀은 바이러스를 포함하지 않으며;
- [0407] iii) 푸소좀은 복제-적격 바이러스를 포함하지 않으며;
- [0408] iv) 푸소좀은 바이러스 단백질, 예를 들어 바이러스 구조 단백질, 예를 들어 캡시드 단백질 또는 바이러스 매트릭스 단백질을 포함하지 않으며;
- [0409] v) 푸소좀은 외피(외피d) 바이러스로부터의 캡시드 단백질을 포함하지 않으며;
- [0410] vi) 푸소좀은 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하지 않으며; 또는
- [0411] vii) 푸소좀은 바이러스 푸소좀이 아니다.
- [0412] 구현예에서, 푸소좀은 세포기질을 포함한다.
- [0413] 구현예에서, 하기 중 하나 이상이다:
- [0414] i) 푸소좀 또는 공급원 세포는 예를 들어 실시예 102의 검정법에 의해, 대상체 내에 이식 시, 기형종을 형성하지 않으며;
- [0415] ii) 푸소좀은 예를 들어 실시예 58의 검정법을 사용하여, 기준 세포, 예를 들어 대식세포와 비교하여 예를 들어 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 이내에서 화학주성을 할 수 있으며;
- [0416] iii) 푸소좀은 예를 들어 상해 부위에서 귀소를 할 수 있으며, 여기서, 푸소좀 또는 세포생물체는 예를 들어 실시예 59의 검정법을 사용하여 인간 세포로부터의 것이며, 예를 들어 공급원 세포는 호중구이며; 또는
- [0417] iv) 푸소좀은 식작용을 할 수 있으며, 예를 들어, 푸소좀에 의한 식작용은 실시예 60의 검정법을 사용하여 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간 이내에 검출 가능하며, 예를 들어 공급원 세포는 대식세포이다.
- [0418] 구현예에서, 푸소좀 또는 푸소좀 조성물은 대상체, 예를 들어 인간 대상체 내로 투여 후, 5일 이하, 예를 들어 4일 이하, 3일 이하, 2일 이하, 1일 이하, 예를 들어 약 12~72시간 동안 임의의 특징 중 1, 2, 3, 4, 5, 6 이상을 보유한다.
- [0419] 구현예에서, 푸소좀은 하기 특징 중 하나 이상을 가진다:
- [0420] a) 공급원 세포로부터의 하나 이상의 내인성 단백질, 예를 들어 막 단백질 또는 세포기질 단백질을 포함한다;
- [0421] b) 적어도 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 또는 5000개의 상이한 단백질을 포함한다;
- [0422] c) 적어도 1, 2, 5, 10, 20, 50, 또는 100개의 상이한 당단백질을 포함한다;
- [0423] d) 푸소좀 내 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90 질량%의 단백질이 천연-발생 단백질이다;

- [0424] e) 적어도 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 또는 5000개의 상이한 RNA를 포함한다; 또는
- [0425] f) 예를 들어 CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG로부터 선택되는 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 또는 20개의 상이한 지질을 포함한다.
- [0426] 구현예에서, 푸소좀은 하기 특성 중 1, 2, 3, 4, 5 이상을 갖도록 조작되었거나, 푸소좀은 천연 발생 세포가 아니고 하기 특성을 갖거나, 핵은 천연적으로 하기 특성을 갖지 않는다:
- [0427] a) 부분적인 핵 불활성화는 핵 기능에서 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소, 예를 들어 전사 또는 DNA 복제 또는 둘 모두에서의 감소를 초래하며, 예를 들어, 전사는 실시예 19의 검정법에 의해 측정되고 DNA 복제는 실시예 20의 검정법에 의해 측정된다;
- [0428] b) 푸소좀은 예를 들어 실시예 19의 검정법을 사용하여, 전사를 할 수 없거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 전사 활성의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 전사 활성을 가진다;
- [0429] c) 푸소좀은 예를 들어 실시예 20의 검정법을 사용하여, 핵 DNA 복제를 할 수 없거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 핵 DNA 복제의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 핵 DNA 복제를 가진다;
- [0430] d) 푸소좀은 예를 들어 실시예 37의 검정법을 사용하여, 염색질이 결여되어 있거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포의 염색질 함량의 1%, 2.5% 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 염색질 함량을 가진다;
- [0431] e) 푸소좀은 예를 들어 실시예 36의 검정법을 사용하여, 핵막이 결여되어 있거나, 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 저캣(Jurkat) 세포의 핵막의 양보다 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 더 적게 가진다;
- [0432] f) 푸소좀은 예를 들어 실시예 36의 검정법을 사용하여, 기능성 핵공 복합체가 결여되어 있거나, 예를 들어 적어도 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%만큼 감소된 핵 유입 또는 유출 활성을 갖거나, 푸소좀은 핵공 단백질, 예를 들어 NUP98 또는 임포틴 7(Importin 7) 중 하나 이상이 결여되어 있다;
- [0433] g) 푸소좀은 예를 들어 실시예 37의 검정법에 의해, 히스톤을 포함하지 않거나, 공급원 세포의 히스톤 수준의 (예를 들어 H1, H2a, H2b, H3, 또는 H4의) 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%보다 작은 히스톤 수준을 가진다;
- [0434] h) 푸소좀은 20, 10, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 염색체를 포함한다;
- [0435] i) 핵 기능이 제거되어 있다;
- [0436] j) 푸소좀은 제핵 포유류 세포이다;
- [0437] k) 핵은 기계적 힘에 의해, 방사선에 의해 또는 화학적 삭마(chemical ablation)에 의해 제거되거나 불활성화되며, 예를 들어 압출된다;
- [0438] l) 푸소좀은 예를 들어 간기 또는 체세포분열 동안 완전히 또는 부분적으로 제거되는 DNA를 갖는 포유류 세포로부터의 것이다.
- [0439] 구현예에서, 푸소좀은 mtDNA 또는 벡터 DNA를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 DNA를 포함하지 않는다.
- [0440] 구현예에서, 공급원 세포는 일차(primary) 세포, 불멸화된 세포 또는 세포주(예를 들어 골수아세포 세포주, 예를 들어 C2C12)이다. 구현예에서, 푸소좀은 변형된 게놈을 갖는, (예를 들어 MHC 단백질 또는 MHC 복합체를 제거하기 위해 예를 들어 게놈 편집에 의해) 예를 들어 감소된 면역원성을 갖는 공급원 세포로부터의 것이다. 구현예에서, 공급원 세포는 항염증 신호로 처리된 세포 배양물로부터의 것이다. 구현예에서, 공급원 세포는 면역억제제로 처리된 세포 배양물로부터의 것이다. 구현예에서, 공급원 세포는 예를 들어 본원에 기재된 검정법을 사용하여, 실질적으로 비-면역원성이다. 구현예에서, 공급원 세포는 외인성 작용제, 예를 들어 치료제를 포함한다. 구현예에서, 공급원 세포는 재조합 세포이다.
- [0441] 구현예에서, 푸소좀은 외인성 작용제, 예를 들어 치료제, 예를 들어 단백질 또는 핵산(예를 들어 DNA, 염색체 (예를 들어 인간 인공 염색체), RNA, 예를 들어 mRNA 또는 miRNA)을 추가로 포함한다. 구현예에서, 외인성 작용

제는 예를 들어 푸소솜에 의해 포함된, 적어도, 또는 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 이하의 복사체로 존재하거나, 1개 푸소솜 당 적어도, 또는 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000 또는 1,000,000 이하의 복사체의 평균 수준으로 존재한다. 구현예에서, 푸소솜은 예를 들어 포유류 세포에 siRNA 또는 유전자 편집 효소를 처리함으로써 인해, 하나 이상의 내인성 분자, 예를 들어 단백질 또는 핵산의 변경된, 예를 들어 증가된 또는 저하된 수준을 가진다. 구현예에서, 내인성 분자는 예를 들어 적어도, 또는 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000, 100,000,000, 500,000,000 또는 1,000,000,000 이하의 복사체(예를 들어 푸소솜에 의해 포함된 복사체)의 평균 수준으로 존재하거나, 1개 푸소솜 당 적어도, 또는 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 500,000 또는 1,000,000 복사체 이하의 평균 수준으로 존재한다. 구현예에서, 내인성 분자(예를 들어 RNA 또는 단백질)는 공급원 세포에서의 이의 농도보다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 10^3 , 5.0×10^3 , 10^4 , 5.0×10^4 , 10^5 , 5.0×10^5 , 10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 5.0×10^7 , 또는 1.0×10^8 , 더 큰 농도로 존재한다.

[0442] 구현예에서, 활성제는 단백질, 단백질 복합체(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20, 또는 50 단백질, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20, 또는 50 상이한 단백질을 포함함) 폴리펩타이드, 핵산(예를 들어 DNA, 염색체, 또는 RNA, 예를 들어 mRNA, siRNA, 또는 miRNA) 또는 저분자로부터 선택된다. 구현예에서, 외인성 작용제는 부위-특이적 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9 분자, TALEN, 또는 ZFN을 포함한다.

[0443] 구현예에서, 푸소젠은 바이러스 푸소젠, 예를 들어 HA, HIV-1 ENV, HHV-4, gp120, 또는 VSV-G이다. 구현예에서, 푸소젠은 포유류 푸소젠이며, 예를 들어 SNARE, 신시틴, 마이오마커(myomarker), 마이오믹서(myomixer), 마이오머저(myomerger) 또는 FGFR1이다. 구현예에서, 푸소젠은 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성이다. 구현예에서, 푸소젠은 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성이 아니다. 구현예에서, 푸소솜은 표적 세포의 표면에서 상기 표적 세포에 융합한다. 구현예에서, 푸소젠은 리소솜-독립적 방식으로 융합을 촉진한다. 구현예에서, 푸소젠은 단백질 푸소젠이다. 구현예에서, 푸소젠은 지질 푸소젠, 예를 들어 올레산, 글리세롤 모노-올레레이트, 글리세라이드, 디아실글리세롤 또는 변형된 불포화된 지방산이다. 구현예에서, 푸소젠은 화학적 푸소젠, 예를 들어 PEG이다. 구현예에서, 푸소젠은 저분자 푸소젠, 예를 들어 할로탄(halothane), NSAID, 예컨대 멜록시캄(meloxicam), 피록시캄(piroxicam), 테녹시캄(tenoxicam) 및 클로르프로마진(chlorpromazine)이다. 구현예에서, 푸소젠은 재조합이다. 구현예에서, 푸소젠은 생화학적으로 혼입되며, 예를 들어 푸소젠은 정제된 단백질로서 제공되고, 푸소젠과 지질 이중층의 결합을 허용하는 조건 하에 상기 지질 이중층과 접촉된다. 구현예에서, 푸소젠은 생합성적으로 혼입되며, 예를 들어 푸소젠과 지질 이중층의 결합을 허용하는 조건 하에 공급원 세포에서 발현된다.

[0444] 구현예에서, 푸소솜은 표적 세포에 결합한다. 구현예에서, 표적 세포는 HeLa 세포 이외의 것이거나, 표적 세포는 형질변환되지 않거나 불멸화되지 않는다.

[0445] 일부 구현예에서, 푸소솜 조성물을 수반하여, 복수의 푸소솜은 동일하다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜은 상이하다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜은 하나 이상의 공급원 세포로부터의 것이다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 푸소솜은 푸소솜 조성물 내 푸소솜의 평균 직경의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내인 직경을 가진다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 푸소솜은 푸소솜 조성물 내 푸소솜의 평균 용적의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이내인 용적을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소솜 조성물은 예를 들어 실시예 31을 기초로, 크기 분포에서 10%, 50%, 또는 90%의 공급원 세포 집단 가변성 이내의 크기 분포에서 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 미만의 가변성을 가진다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 푸소솜은 푸소솜 조성물 내 푸소솜 내 평균 푸소젠 복사수의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이내인 푸소젠 복사수를 가진다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소솜 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 푸소솜은 푸소솜 조성물 내 푸소솜 내 평균 치료제 복사수의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이내인 치료제 복사수를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소솜 조성물은 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} 이상의 푸소솜을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소솜 조성물은 적어도 1 ul, 2 ul, 5 ul, 10 ul, 20 ul, 50 ul, 100 ul, 200 ul, 500 ul, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 또는 10 ml의 용적 내에 있다.

- [0446] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 표적 세포 집단과 비교하여, 표적 세포 집단 내 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포수에 적재물을 전달한다.
- [0447] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 표적 세포 집단 또는 비-표적 세포 집단과 비교하여, 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 적재물을 표적 세포 집단에 전달한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 표적 세포 집단 또는 비-표적 세포 집단과 비교하여, 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과와 적재물을 표적 세포 집단에 전달한다.
- [0448] 일부 구현예에서, 10% 미만의 적재물이 세포내이입에 의해 세포에 진입된다.
- [0449] 일부 구현예에서, 세포내이입의 저해제는 리소좀 산성화의 저해제, 예를 들어 바필로마이신 A1이다. 일부 구현예에서, 세포내이입의 저해제는 디나민 저해제, 예를 들어 디나소어이다.
- [0450] 일부 구현예에서, 표적 세포 집단은 생리학적 pH(예를 들어 7.3~7.5, 예를 들어 7.38~7.42)에 존재한다.
- [0451] 일부 구현예에서, 전달되는 적재물은 세포내이입 저해 검정법, 예를 들어 실시예 90, 92, 또는 135의 검정법을 사용하여 결정된다.
- [0452] 일부 구현예에서, 적재물은 디나민-독립적 경로 또는 리소좀 산성화-독립적 경로, 거대음작용(macropinocytosis)-독립적 경로(예를 들어, 세포내이입의 저해제는 예를 들어 25 μ M 농도에서, 거대음작용의 저해제, 예를 들어 5-(N-에틸-N-이소프로필)아밀로라이드(EIPA)임), 또는 액틴-독립적 경로(예를 들어, 세포내이입의 저해제는 예를 들어 6 μ M 농도에서, 액틴 중합의 저해제이며, 예를 들어 라트룬쿨린 B(Latrunculin B) 임)를 통해 세포에 진입한다.
- [0453] 일부 구현예에서, 상기 복수의 푸소좀은 표적화 모이어티를 추가로 포함한다. 구현예에서, 표적화 모이어티는 푸소젠에 의해 포함되거나 또는 별개의 분자에 의해 포함된다.
- [0454] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀이 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시, 적재물은 비-표적 세포보다 적어도 10-배 더 많은 표적 세포에 존재한다.
- [0455] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀이 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시, 적재물은 비-표적 세포보다 표적 세포에서 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 또는 50-배 더 높게 존재하며 및/또는 적재물은 기준 세포보다 표적 세포에서 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 또는 50-배 더 높게 존재한다.
- [0456] 일부 구현예에서, 상기 복수의 푸소좀은 비-표적 세포보다 표적 세포와 적어도 50%만큼 더 높은 속도로 융합한다.
- [0457] 일부 구현예에서, 적재물의 존재는 예를 들어 실시예 124의 검정법을 사용하여 현미경에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 융합은 예를 들어 실시예 54의 검정법을 사용하여 현미경에 의해 측정된다.
- [0458] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 표적 세포 상의 세포 표면 마커에 특이적이다. 구현예에서, 세포 표면 마커는 피부 세포, 심근세포, 간세포, 장세포(예를 들어 소장 세포), 췌장 세포, 뇌세포, 전립선 세포, 폐 세포, 결장 세포 또는 골수 세포의 세포 표면 마커이다.
- [0459] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 람도비리대 푸소젠(예를 들어 VSV-G), 필로비리대 푸소젠, 아레나비리대 푸소젠, 토가비리대 푸소젠, 플라비비리대 푸소젠, 부니아비리대 푸소젠, 또는 하파드나비리대 푸소젠(예를 들어 Hep B), 또는 이들의 유도체를 포함한다.
- [0460] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀은, 세포내이입의 저해제의 존재 하에 표적 세포 집단과 접촉 시, 그리고 세포내이입의 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉 시, 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단 내의 적어도 30%의 세포수에 적재물을 전달한다.
- [0461] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀은, 세포내이입의 저해제의 존재 하에 표적 세포 집단과 접촉 시, 그리고 세포내이입의 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉 시, 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단 내의 적어도 30%의 세포수에 적재물을 전달한다.
- [0462] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포 집단과 접촉 시, 엔도솜 또는 리소솜 이외의 표적 세포 위치에, 예를 들어 세포기질에 적재물을 전달한다. 구현예에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 미만의 적재물이 엔도솜 또는 리소솜에 전달된다.

- [0463] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 질량 분광분석을 사용하여, 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법을 사용하여 결정된다.
- [0464] 일부 구현예에서, 상기 복수의 푸소좀은 엑소좀, 미세소낭 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0465] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀은 적어도 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm, 또는 1500 nm의 평균 크기를 가진다. 다른 구현예에서, 복수의 푸소좀은 100 nm, 80 nm, 60 nm, 40 nm, 또는 30 nm 미만의 평균 크기를 가진다.
- [0466] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 호중구, HEK293 세포, 과립구, 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택된다.
- [0467] 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀 중 푸소좀은 세포생물체를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀 중 푸소좀은 제핵 세포를 포함한다.
- [0468] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 포유류 푸소젠을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 바이러스 푸소젠을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 단백질 푸소젠이다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 니파 바이러스 단백질 F, 홍역 바이러스 F 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F 단백질, 파라믹소바이러스 F 단백질, 헨드라 바이러스 F 단백질, 헤니파바이러스 F 단백질, 모빌리바이러스 F 단백질, 레스피로바이러스 F 단백질, 센다이 바이러스 F 단백질, 루블라바이러스 F 단백질, 또는 아블라바이러스 F 단백질, 또는 이들의 유도체로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0469] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성이다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성이 아니다.
- [0470] 일부 구현예에서, 푸소젠은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 5, 또는 10 복사체의 복사수로 존재한다.
- [0471] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 니파 바이러스 단백질 G, 홍역 단백질 H, 투파이아 파라믹소바이러스 H 단백질, 파라믹소바이러스 G 단백질, 파라믹소바이러스 H 단백질, 파라믹소바이러스 HN 단백질, 모빌리바이러스 H 단백질, 레스피로바이러스 HN 단백질, 센다이 HN 단백질, 루블라바이러스 HN 단백질, 아블라바이러스 HN 단백질, 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)은 니파 바이러스 F와 G 단백질, 홍역 바이러스 F와 H 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F와 H 단백질, 파라믹소바이러스 F와 G 단백질 또는 F와 H 단백질 또는 F와 HN 단백질, 헨드라 바이러스 F와 G 단백질, 헤니파바이러스 F와 G 단백질, 모빌리바이러스 F와 H 단백질, 레스피로바이러스 F와 HN 단백질, 센다이 바이러스 F와 HN 단백질, 루블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 아블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0472] 일부 구현예에서, 적재물은 외인성 단백질 또는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 적재물은 세포기질 단백질을 포함하거나 인코딩한다. 일부 구현예에서, 적재물은 막 단백질을 포함하거나 인코딩한다. 일부 구현예에서, 적재물은 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 적재물은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 또는 200 복사체(예를 들어 1개 푸소좀 당 약 1,000까지의 복사체)의 복사수로 존재한다. 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)의 복사수 : 적재물의 복사수의 비는 1000:1 내지 1:1, 또는 500:1 내지 1:1, 또는 250:1 내지 1:1, 또는 150:1 내지 1:1, 또는 100:1 내지 1:1, 또는 75:1 내지 1:1, 또는 50:1 내지 1:1, 또는 25:1 내지 1:1, 또는 20:1 내지 1:1, 또는 15:1 내지 1:1, 또는 10:1 내지 1:1, 또는 5:1 내지 1:1, 또는 2:1 내지 1:1, 또는 1:1 내지 1:2이다.
- [0473] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물:
- [0474] a) 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP) 표준을 충족시키거나;
- [0475] b) 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었거나;
- [0476] c) 예정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지며, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없거나;
- [0477] d) 예정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지며, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없다.
- [0478] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 4, 0, -4, -10, -12, -16, -20, -80, 또는 -160℃ 미만의 온도에서 존재한다.

다.

- [0479] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 바이러스 캡시드 단백질 또는 DNA 통합 폴리캡타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 적재물은 바이러스 게놈을 포함한다.
- [0480] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 유전자 치료법을 위해 예를 들어 표적 세포의 게놈을 안정하게 변형시키기 위해 핵산을 표적 세포에 전달할 수 있다.
- [0481] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하지 않거나, 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질의 양은 예를 들어 질량 분광분석법에 의해, 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법을 사용하여, 총 단백질의 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2%, 또는 0.1% 미만이다.
- [0482] 구현예에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 가진다:
- [0483] a) 약제학적 조성물은 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP) 표준을 충족시킨다;
- [0484] b) 약제학적 조성물은 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었다;
- [0485] c) 약제학적 조성물은 예정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지며, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없다;
- [0486] d) 약제학적 조성물은 예정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지며, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없다; 또는
- [0487] e) 약제학적 조성물은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 낮은 면역원성을 가진다.
- [0488] 구현예에서, 약제학적 조성물의 적재물은 치료제를 포함한다.
- [0489] 구현예에서, 생물학적 기능은 하기의 기능으로부터 선택된다:
- [0490] a) 효소를 조정하는, 예를 들어 저해하거나 자극하는 기능;
- [0491] b) 예를 들어 인자의 합성을 저해하거나 자극함으로써 또는 분해를 저해하거나 자극함으로써, 대상체에서 분자(예를 들어 단백질, 핵산, 또는 대사물, 약물 또는 독소)의 수준을 조정하는, 예를 들어 증가시키거나 저하시키는 기능;
- [0492] c) 표적 세포 또는 조직의 생존력을 조정하는, 예를 들어 증가시키거나 저하시키는 기능; 또는
- [0493] d) 단백질 사태를 조정하는, 예를 들어 단백질의 인산화를 증가시키거나 저하시키는, 또는 단백질 형태(conformation)를 조정하는 기능;
- [0494] e) 상해의 치유를 촉진하는 기능;
- [0495] f) 2개의 세포 사이의 상호작용을 조정하는, 예를 들어 증가시키거나 저하시키는 기능;
- [0496] g) 세포 분화를 조정하는, 예를 들어 촉진하거나 저해하는 기능;
- [0497] h) 대상체에서 인자(예를 들어 단백질, 핵산, 대사물, 약물 또는 독소)의 분포를 변경시키는 기능;
- [0498] i) 면역 반응을 조정하는, 예를 들어 증가시키거나 저하시키는 기능; 또는
- [0499] j) 표적 조직으로의 세포의 동원을 조정하는, 예를 들어 증가시키거나 저하시키는 기능.
- [0500] 본원의 치료 방법의 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀은 국소 효과를 가진다. 일부 구현예에서, 복수의 푸소좀은 원위부 효과(distal effect)를 가진다.
- [0501] 일부 구현예에서, 대상체는 암, 염증 장애, 자가면역 질병, 만성 질병, 염증, 손상된 기관 기능, 감염성 질병, 대사 질병, 퇴행성 장애, 유전적 질병(예를 들어 유전적 결핍, 열성 유전적 장애 또는 우성 유전적 장애), 또는 상해를 가진다. 일부 구현예에서, 대상체는 감염성 질병을 가지고, 푸소좀은 감염성 질병에 대한 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 유전적 결핍을 가지고, 푸소좀은 대상체가 이에 대해 결핍된 단백질, 또는 이러한 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어 mRNA), 또는 이러한 단백질을 인코딩하는 DNA, 또는 이러한 단백질을 인코딩하는 염색체, 또는 이러한 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 핵을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 우성 유전적 장애를 가지고, 푸소좀은 우성 돌연변이체 대립유전자의 핵산 저해제(예를 들어 siRNA 또는 miRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 우성 유전적 장애를 가지며, 및/또는 푸소좀은 우성 돌연변이체 대립유전자의 핵산 저해제(예를 들어 siRNA 또는 miRNA)를 포함하며, 및/또는 푸소좀은 또한, 핵산 저해제에 의

해 표적화되지 않는 돌연변이화된 유전자의 비-돌연변이화된 대립유전자를 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 백신화가 필요하다. 일부 구현예에서, 대상체는 예를 들어 상해를 입은 부위의 재생이 필요하다.

[0502] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 대상체에게 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5회 투여된다.

[0503] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 대상체에게 전신(예를 들어 경구, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내) 또는 국소 투여된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은, 상기 푸소좀 조성물이 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위 장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이 또는 눈으로부터 선택되는 표적 조직에 도달하도록 대상체에게 투여된다. 일부 구현예(예를 들어, 대상체가 자가면역 질병을 가짐)에서, 푸소좀 조성물은 면역억제제, 예를 들어 글루코코티코이드, 세포정지제, 항체, 또는 이뮤노필린 조절제(immunophilin modulator)와 함께 공동-투여된다. 일부 구현예(예를 들어, 대상체가 암 또는 감염성 질병을 가짐)에서, 푸소좀 조성물은 면역자극제, 예를 들어 보조제, 인터루킨, 사이토카인, 또는 케모카인과 함께 공동-투여된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물의 투여는 대상체 내 표적 세포에서 유전자의 상향조절 또는 하향조절을 초래하며, 예를 들어, 푸소좀은 전사 활성화자 또는 억제자, 번역 활성화자 또는 억제자, 또는 후성적(epigenetic) 활성화자 또는 억제자를 포함한다.

[0504] 본원에서 제조 방법의 일부 구현예에서, 푸소좀을 발현하는 공급원 세포를 제공하는 단계는, 공급원 세포에서 외인성 푸소좀을 발현시키는 단계 또는 공급원 세포에서 내인성 푸소좀의 발현을 상향조절하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 공급원 세포의 핵을 불활성화시키는 단계를 포함한다.

[0505] 구현예에서, 푸소좀 조성물은 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} 개의 푸소좀을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 적어도 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1 L, 2 L, 5 L, 10 L, 20 L, 또는 50 L를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 화학적 제핵, 기계적 힘의 사용, 예를 들어 필터 또는 원심분리의 사용, 세포골격의 적어도 부분적인 붕괴 또는 이들의 조합에 의해 포유류 세포를 제핵화시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 공급원 세포에서 푸소좀 또는 다른 막 단백질을 발현시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 소낭화(vesiculation), 저장성(hypotonic) 처리, 압출 또는 원심분리 중 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 세포에서 외인성 작용제를 유전적으로 발현시키는 단계 또는 세포 또는 푸소좀 내로 외인성 작용제를 로딩하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 핵을 불활성화시키기 전에, 예를 들어 세포(예를 들어 공급원 세포)를 제핵화시키기 전에, 상기 세포(예를 들어 공급원 세포)를 폴리펩타이드 작용제를 인코딩하는 DNA와 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 핵을 불활성화시키기 전에 또는 후에, 예를 들어 세포를 제핵화시키기 전에 또는 후에, 상기 세포를 폴리펩타이드 작용제를 인코딩하는 RNA와 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 치료제(예를 들어 핵산 또는 단백질)를 예를 들어 전기천공에 의해 푸소좀 내로 도입하는 단계를 포함한다.

[0506] 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 면역원성을 감소시키기 위해 변형된(예를 들어 MHC 단백질 또는 MHC 복합체를 제거하기 위해 예를 들어 게놈 편집에 의해) 게놈을 갖는 포유류 세포로부터의 것이다. 구현예에서, 공급원 세포는 항염증 신호로 처리된 세포 배양물로부터의 것이다. 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 핵을 불활성화시키기 전에 또는 후에, 예를 들어 세포를 제핵화시키기 전에 또는 후에, 단계 a)의 공급원 세포를 면역억제제 또는 항염증 신호와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0507] 일부 구현예에서, 검출 가능한 수준, 예를 들어 기준값보다 높은 값이 결정된다면, 복수의 푸소좀 또는 푸소좀 조성물을 함유하는 시료는 폐기된다.

[0508] 일부 구현예에서, 제1 푸소좀은 리포펩타이드(lipopeptide)가 아니다.

[0509] 대상체에서 수여자 세포의 형성을 초래하는 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포의 푸소좀 용해)을 평가하는 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 시료를 수합하는 단계를 추가로 포함한다. 구현예에서, 생물학적 시료는 하나 이상의 수여자 세포를 포함한다.

[0510] 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포의 푸소좀 용해)을 평가하는 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 생물학적 시료 내 비융합된 푸소좀으로부터 생물학적 시료 내 수여자 세포를 예를 들어 원심분리에 의해 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 생물학적 시료 내 비융합된 푸소좀에 비해 수여자 세포를 예를 들어 원심분리에 의해 농화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 생물학적 시료 내 비-표적 세포에 비해 표적 세포를 예를 들어 FACS에 의해 농화시키는 단계를 추가로

포함한다.

- [0511] 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포에의 푸소좀 융합)을 평가하는 방법의 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물에 관한 활성은 대상물의 존재 또는 수준, 생물마커의 존재 또는 수준(예를 들어 단백질 수준 또는 번역-후 변형, 예를 들어 인산화 또는 절단)으로부터 선택된다.
- [0512] 대상체에서 표적 세포의 푸소좀 함량(예를 들어 표적 세포에의 푸소좀 융합)을 평가하는 방법의 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물에 관한 활성은 면역원성이다. 구현예에서, 표적 세포는 CD3+ 세포이고, 생물학적 시료는 대상체로부터 수합된 혈액 시료이다. 구현예에서, 혈액 세포는 예를 들어 완충된 암모늄 클로라이드 용액을 사용하여, 혈액 시료로부터 농화된다. 구현예에서, 농화된 혈액 세포는 항-CD3 항체(예를 들어 묶인 항-CD3-FITC 항체)와 함께 인큐베이션되고, CD3+ 세포는 예를 들어 형광 활성화된 세포 소팅에 의해 선별된다. 구현예에서, 세포, 예를 들어 소팅된 세포, 예를 들어 CD3+ 세포는 세포 표면 상에서의 항체의 존재에 대해, 예를 들어 항-IgM 항체를 이용한 염색에 의해 분석된다. 일부 구현예에서, 항체가 기준 수준보다 높은 수준에서 존재한다면, 대상체는 수여자 세포에 대한 면역 반응을 갖는 것으로 식별된다.
- [0513] 구현예에서, 면역원성은 세포 용해 검정법에 의해 검정된다. 구현예에서, 생물학적 시료로부터의 수여자 세포는 다른 세포를 용해시킬 수 있는 면역 효과기 세포와 공동-인큐베이션된다. 구현예에서, 면역 효과기 세포는 상기 대상체, 또는 푸소좀 조성물이 투여되지 않은 대상체로부터의 것이다. 예를 들어, 구현예에서, 면역원성은 PBMC 세포 용해 검정법에 의해 검정된다. 구현예에서, 생물학적 시료로부터의 수여자 세포는 상기 대상체로부터의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 푸소좀 조성물이 투여되지 않은 대상체로부터의 대조군 PBMC와 함께 공동-인큐베이션되고, 그 후에 PBMC로부터의 수여자 세포의 용해에 대해 평가된다. 구현예에서, 면역원성은 자연 살해(NK) 세포 용해 검정법에 의해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 상기 대상체로부터의 NK 세포 또는 푸소좀 조성물이 투여되지 않은 대상체로부터의 대조군 NK 세포와 함께 공동-인큐베이션되고, 그 후에 NK 세포에 의한 수여자 세포의 용해에 대해 평가된다. 구현예에서, 면역원성은 CD8+ T-세포 용해 검정법에 의해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 상기 대상체로부터의 CD8+ T-세포 또는 푸소좀 조성물이 투여되지 않은 대상체로부터의 대조군 CD8+ T-세포와 함께 공동-인큐베이션되고, 그 후에 CD8+ T-세포에 의한 표적 세포의 용해에 대해 평가된다. 일부 구현예에서, 세포 용해가 기준 수준보다 높은 수준에서 발생한다면, 대상체는 수여자 세포에 대한 면역 반응을 갖는 것으로 식별된다.
- [0514] 일부 구현예에서, 면역원성은 수여자 세포의 식작용에 의해, 예를 들어 대식세포에 의해 검정된다. 구현예에서, 수여자 세포는 식작용에 대해 대식세포에 의해 표적화되지 않는다. 구현예에서, 생물학적 시료는 대상체로부터 수합된 혈액 시료이다. 구현예에서, 혈액 세포는 예를 들어 완충된 암모늄 클로라이드 용액을 사용하여, 혈액 시료로부터 농화된다. 구현예에서, 농화된 혈액 세포는 항-CD3 항체(예를 들어 묶인 항-CD3-FITC 항체)와 함께 인큐베이션되고, CD3+ 세포는 예를 들어 형광 활성화된 세포 소팅에 의해 선별된다. 구현예에서, 형광-표지된 CD3+ 세포는 대식세포와 함께 인큐베이션되고, 그 후에, 대식세포 내에서의 세포내 형광에 대해 예를 들어 유세포분석에 의해 시험된다. 일부 구현예에서, 대식세포 식작용이 기준 수준보다 높은 수준에서 발생한다면, 대상체는 수여자 세포에 대한 면역 반응을 갖는 것으로 식별된다.
- [0515] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 예를 들어 실시예 54 또는 124에 기재된 바와 같이, 표적 세포의 푸소좀 함량, 예를 들어 푸소좀과 표적 세포의 융합을 측정하거나 결정하는(예를 들어 융합이 발생하였는지의 여부를 결정하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, 검출 가능한 마커가 푸소좀에 존재할 수 있다(예를 들어 푸소좀에서 적재물 또는 페이로드 분자에 공액됨). 적재물 또는 페이로드가 단백질을 포함하는 구현예에서, 상기 적재물 또는 페이로드는 직접적으로, 예를 들어 결합 모이어티(예를 들어 항체 또는 이의 항원-결합 단편)를 사용하여 검출될 수 있다. 소정의 구현예에서, 단백질 페이로드는 검출 가능한 모이어티, 예를 들어 항체 분자에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 모이어티와 결합된다(예를 들어 이에 공액됨). 적재물 또는 페이로드가 핵산(예를 들어 DNA 또는 mRNA)을 포함하는 구현예에서, 상기 적재물 또는 페이로드는 핵산에 혼성화할 수 있는 핵산 프로브를 사용하여, 또는 핵산에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 모이어티(예를 들어 항체 또는 이의 항원-결합 단편)를 사용하여 검출될 수 있다. 구현예에서, 표적 세포로의 푸소좀의 융합은 검출 가능한 마커를 검출함으로써 결정된다. 구현예에서, 표적 세포로의 푸소좀의 융합은 적재물 또는 페이로드(예를 들어 핵산 적재물 또는 페이로드에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드 또는 비코딩(noncoding) RNA)의 발현을 측정함으로써 결정된다. 구현예에서, 표적 세포로의 푸소좀의 융합은 적재물 또는 페이로드 활성의 다운스트림 마커를 측정함으로써 결정된다. 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 수여자 세포는 표적 세포 또는 수여자 세포의 푸소좀 함량, 예를 들어 푸소좀과 표적 세포의 융합을 측정하거나 결정하기 전에 대상체로부터 단리된다. 구현예에서, 표적 세포 또는 수여자 세포는 또한, 페이로드가 엔도솜 또는 리소솜에 존재하는지의 여부를 결정하기

위해 엔도솜 또는 리소솜 염료 또는 항체로 염색된다. 일부 구현예에서, 페이로드는 엔도솜 또는 리소솜과 함께 공동위치화(colocalize)되지 않거나, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 또는 1% 미만의 페이로드가 엔도솜 또는 리소솜과 함께 공동위치화된다. 구현예에서, 수여자 세포는 또한, 페이로드가 표적 구획, 예컨대 세포질, 핵, 미토콘드리아, 또는 형질막과 함께 공동위치화되는지의 여부를 결정하기 위해 세포질, 핵, 미토콘드리아, 또는 형질막 염료 또는 항체로 염색되며; 이러한 구현예에서, 페이로드는 핵, 미토콘드리아, 또는 형질막과 함께 위치화될 것이다.

[0516] 구현예에서, 본원에서 푸소솜을 제조하는 방법은 ARRDC1 또는 이의 활성 단편 또는 변이체를 공급원 세포에서 발현시키는(예를 들어 과발현시키는) 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 푸소솜을 ARRDC1-발현 공급원 세포로부터 푸소솜을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 1 mL 당 적어도 1.2×10^{11} , 1.4×10^{11} , 1.6×10^{11} , 1.8×10^{11} , 2.0×10^{11} , 2.2×10^{11} , 2.4×10^{11} , 2.6×10^{11} , 또는 2.8×10^{11} 입자, 예를 들어 1 mL 당 약 3×10^{11} 까지의 입자를 산출한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은, ARRDC1 또는 이의 활성 단편 또는 변이체를 발현하지 않거나 과발현하지 않는 다른 유사한 공급원 세포를 이용하여 수행된 동일한 방법보다 1 mL 당 약 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 많은 입자를 산출한다. 일부 구현예에서, 공급원 세포로부터 생성된 푸소솜은, 예를 들어 현미경 검정법, 예를 들어 실시예 170의 검정법을 사용하여, 표적 세포와 접촉 시, ARRDC1 또는 이의 활성 단편 또는 변이체를 발현하지 않거나 과발현하지 않는 유사한 공급원 세포로부터 생성된 푸소솜과 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 또는 20배 많은 세포에서 검출 가능한 적재물 전달을 생성하는 ARRDC1 또는 이의 활성 단편 또는 변이체를 발현시키는(예를 들어 과발현시키는) 단계를 포함한다.

[0517] 열거된 구현예

[0518] 1. 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소솜(fusosome)을 포함하는 푸소솜 조성물로서, 여기서, 상기 복수의 푸소솜은:

[0519] (a) 지질 이중층;

[0520] (b) 세포기질을 포함하는 내강으로서, 여기서, 상기 내강은 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는, 내강;

[0521] (c) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 푸소젠;

[0522] (d) 적재물

[0523] 을 포함하고, 상기 푸소솜은 핵을 포함하지 않으며;

[0524] 상기 푸소솜 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 총 단백질의 1% 미만이고;

[0525] 상기 복수의 푸소솜은 세포내이입의 저해제의 존재 하에 표적 세포 집단과 접촉 시, 그리고 세포내이입의 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉 시, 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단 내의 적어도 30%의 세포수에 상기 적재물을 전달하는, 푸소솜 조성물.

[0526] 2. 구현예 1에 있어서, 기준 표적 세포 집단 또는 비-표적 세포 집단과 비교하여 표적 세포 집단 내의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%의 세포수에 상기 적재물을 전달하거나; 또는 기준 표적 세포 집단 또는 비-표적 세포 집단과 비교하여 표적 세포 집단에 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%의 적재물에 상기 적재물을 전달하는, 푸소솜 조성물.

[0527] 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 10% 미만의 적재물이 세포내이입에 의해 상기 세포에 진입하는, 푸소솜 조성물.

[0528] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 세포내이입의 저해제가 리소솜 산성화의 저해제, 예를 들어 바필로마이신 A1인, 푸소솜 조성물.

[0529] 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 한 구현예에 있어서, 전달되는 상기 적재물이 세포내이입 저해 검정법, 예를 들어 실시예 90 또는 135의 검정법을 사용하여 결정되는, 푸소솜 조성물.

[0530] 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 적재물이 디나민-독립적 경로 또는 리소솜 산성화-독립적 경로, 거대음작용(macropinocytosis)-독립적 경로(예를 들어, 세포내이입의 저해제는 예를 들어 25 μ M 농도에서, 거대음작용의 저해제, 예를 들어 5-(N-에틸-N-이소프로필)아밀로라이드(EIPA)임), 또는 액틴-독립적

경로(예를 들어, 세포내이입의 저해제는 예를 들어 6 μM 농도에서, 액틴 중합의 저해제이며, 예를 들어 라트룬쿨린 B(Latrunculin B)임)를 통해 상기 세포에 진입하는, 푸소좀 조성물.

- [0531] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소좀이 표적화 모이어티를 추가로 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0532] 8. 구현예 7에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 푸소젠에 의해 포함되거나 또는 별개의 분자에 의해 포함되는, 푸소좀 조성물.
- [0533] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소좀이 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시:
- [0534] (i) 상기 적재물이 비-표적 세포보다 적어도 10-배 더 많은 표적 세포에 존재하거나,
- [0535] (ii) 상기 적재물이 비-표적 세포 및/또는 기준 세포보다 표적 세포에서 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 또는 50-배 더 높게 존재하는, 푸소좀 조성물.
- [0536] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소좀이 비-표적 세포보다 표적 세포와 적어도 50%만큼 더 높은 속도로 융합하는, 푸소좀 조성물.
- [0537] 11. 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물로서, 여기서, 상기 복수의 푸소좀은:
- [0538] (a) 지질 이중층;
- [0539] (b) 세포기질을 포함하는 내강으로서, 여기서, 상기 내강은 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸여 있는, 내강;
- [0540] (c) 상기 지질 이중층에 배치된 외인성 또는 과발현된 재-표적화된 푸소젠;
- [0541] (d) 적재물
- [0542] 을 포함하고, 상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며;
- [0543] 상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양은 총 단백질의 1% 미만이고;
- [0544] 여기서:
- [0545] (i) 상기 복수의 푸소좀은 표적 세포 및 비-표적 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉 시, 상기 적재물이 비-표적 세포보다 적어도 10-배 더 많은 표적 세포에 존재하거나, 또는 적어도 10-배 더 많은 상기 적재물이 기준 세포 집단과 비교하여 세포 집단에 전달되거나,
- [0546] (ii) 상기 복수의 푸소좀은 비-표적 세포보다 표적 세포와 적어도 50%만큼 더 높은 속도로 융합하거나, 적어도 50% 초과와 적재물이 기준 세포 집단과 비교하여 세포 집단에 전달되는, 푸소좀 조성물.
- [0547] 12. 구현예 11에 있어서, 상기 적재물의 존재가 예를 들어 실시예 124의 검정법을 사용하여 현미경에 의해 측정되는, 푸소좀 조성물.
- [0548] 13. 구현예 11에 있어서, 융합이 예를 들어 실시예 54의 검정법을 사용하여 현미경에 의해 측정되는, 푸소좀 조성물.
- [0549] 14. 구현예 7 내지 13 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 표적 세포 상의 세포 표면 마커에 특이적인, 푸소좀 조성물.
- [0550] 15. 구현예 14에 있어서, 상기 세포 표면 마커가 피부 세포, 심근 세포, 간 세포, 장(intestinal) 세포(예를 들어 소장 세포), 췌장 세포, 뇌 세포, 전립선 세포, 폐 세포, 결장 세포 또는 골수 세포의 세포 표면 마커인, 푸소좀 조성물.
- [0551] 16. 구현예 11 내지 15 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)이 람도비리대(rhabdoviridae) 푸소젠(예를 들어 VSV-G), 필로비리대(filoviridae) 푸소젠, 아레나비리대(arenaviridae) 푸소젠, 토가비리대(togaviridae) 푸소젠, 플라비비리대(flaviviridae) 푸소젠, 부니아비리대(bunyaviridae) 푸소젠 또는 하파드나비리대(hapadnaviridae) 푸소젠(예를 들어 Hep B) 또는 이들의 유도체를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0552] 17. 구현예 7 내지 16 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소좀이, 세포내이입의 저해제의 존재 하

에 표적 세포 집단과 접촉 시, 그리고 세포내이입의 저해제로 처리되지 않은 기준 표적 세포 집단과 접촉 시:

- [0553] (i) 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단 내의 적어도 30%의 세포수에 상기 적재물을 전달하거나;
- [0554] (ii) 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단에 적어도 30%의 적재물을 전달하거나;
- [0555] (iii) 상기 기준 표적 세포 집단과 비교하여 상기 표적 세포 집단에 적어도 30% 초과와 적재물을 전달하는, 푸소좀 조성물.
- [0556] 18. 구현예 1 내지 17 중 어느 한 구현예에 있어서, 표적 세포 집단과 접촉 시, 엔도솜 또는 리소솜 이외의 표적 세포 위치에, 예를 들어 세포기질에 상기 적재물을 전달하는, 푸소좀 조성물.
- [0557] 19. 구현예 18에 있어서, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 미만의 적재물이 엔도솜 또는 리소솜에 전달되는, 푸소좀 조성물.
- [0558] 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소좀 조성물 내 바이러스 캡시드 단백질의 양이 질량 분광분석을 사용하여, 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법을 사용하여 결정되며; 및/또는
- [0559] 상기 푸소좀 조성물이 바이러스 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하지 않거나, 상기 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질이 양이 예를 들어 질량 분광분석에 의해 예를 들어 실시예 53 또는 161의 검정법을 사용하여 총 단백질의 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2% 또는 0.1% 미만인, 푸소좀 조성물.
- [0560] 21. 구현예 1 내지 20 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소솜이 엑소솜, 미세소낭(microvesicle) 또는 이들의 조합을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0561] 22. 구현예 1 내지 21 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소솜이 적어도 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1200 nm, 1400 nm 또는 1500 nm의 평균 크기를 갖는, 푸소좀 조성물.
- [0562] 23. 구현예 1 내지 21 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소솜이 100 nm, 80 nm, 60 nm, 40 nm 또는 30 nm 미만의 평균 크기를 갖는, 푸소좀 조성물.
- [0563] 24. 구현예 1 내지 23 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 공급원 세포가 호중구, HEK293 세포, 과립구, 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택되는, 푸소좀 조성물.
- [0564] 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소솜이 세포생물체를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0565] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 복수의 푸소솜이 제핵 세포를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0566] 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 포유류 푸소솜을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0567] 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 바이러스 푸소솜을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0568] 29. 구현예 1 내지 28 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성인, 푸소좀 조성물.
- [0569] 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 또는 9~10의 pH에서 활성이지 않은, 푸소좀 조성물.
- [0570] 31. 구현예 1 내지 30 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 단백질 푸소솜인, 푸소좀 조성물.
- [0571] 32. 구현예 1 내지 31 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소솜(예를 들어 재-표적화된 푸소솜)이 니파(Nipah) 바이러스 단백질 F, 홍역 바이러스 F 단백질, 투파이아(tupaia) 파라믹소바이러스 F 단백질, 파라믹소 바이러스 F 단백질, 헨드라(Hendra) 바이러스 F 단백질, 헤니파바이러스 F 단백질, 모빌리바이러스(Morbilivirus) F 단백질, 레스피로바이러스(respirovirus) F 단백질, 센다이(Sendai) 바이러스 F 단백질, 루볼라바이러스(rubulavirus) F 단백질, 아볼라바이러스(avulavirus) F 단백질 또는 이들의 유도체로부터 선택되

는 서열을 포함하는, 푸소좀 조성물.

- [0572] 33. 구현예 1 내지 32 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소젠이 1개 푸소좀 당 적어도 2, 5, 또는 10 복사체의 복사수로 존재하는, 푸소좀 조성물.
- [0573] 34. 구현예 1 내지 33 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)이 니파 바이러스 단백질 G, 홍역 단백질 H, 투파이아 파라믹소바이러스 H 단백질, 파라믹소바이러스 G 단백질, 파라믹소바이러스 H 단백질, 파라믹소바이러스 HN 단백질, 모빌리바이러스 H 단백질, 레스피로바이러스 HN 단백질, 쉐다이 HN 단백질, 루블라바이러스 HN 단백질, 아블라바이러스 HN 단백질 또는 이들의 유도체를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0574] 35. 구현예 1 내지 34 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)이 니파 바이러스 F와 G 단백질, 홍역 바이러스 F와 H 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F와 H 단백질, 파라믹소바이러스 F와 G 단백질 또는 F와 H 단백질 또는 F와 HN 단백질, 헨드라 바이러스 F와 G 단백질, 헤니파바이러스 F와 G 단백질, 모빌리바이러스 F와 H 단백질, 레스피로바이러스 F와 HN 단백질, 쉐다이 바이러스 F와 HN 단백질, 루블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 아블라바이러스 F와 HN 단백질, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 서열을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0575] 36. 구현예 1 내지 35 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 적재물이 외인성 단백질 또는 외인성 핵산을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0576] 37. 구현예 1 내지 36 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 적재물이 세포기질 단백질 또는 막 단백질을 포함하거나 인코딩하는, 푸소좀 조성물.
- [0577] 38. 구현예 1 내지 37 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 적재물이 치료제를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0578] 39. 구현예 1 내지 38 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 적재물이 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 또는 200 복사체(예를 들어 1개 푸소좀 당 약 1,000 이하의 복사체)의 복사수로 존재하는, 푸소좀 조성물.
- [0579] 40. 구현예 1 내지 39 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 푸소젠(예를 들어 재-표적화된 푸소젠)의 복사수 : 상기 적재물의 복사수의 비가 1000:1 내지 1:1, 500:1 내지 1:1, 250:1 내지 1:1, 150:1 내지 1:1, 100:1 내지 1:1, 75:1 내지 1:1, 50:1 내지 1:1, 25:1 내지 1:1, 20:1 내지 1:1, 15:1 내지 1:1, 10:1 내지 1:1, 5:1 내지 1:1, 2:1 내지 1:1, 또는 1:1 내지 1:2인, 푸소좀 조성물.
- [0580] 41. 구현예 1 내지 40 중 어느 한 구현예에 있어서, 하기 중 하나 이상인, 푸소좀 조성물:
- [0581] a) 상기 푸소좀 조성물이 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 100~10,000, 500~5,000, 1000~5000, 2000~4000, 2500~3500, 2900~2930, 2910~2915, 또는 2912.0의, CD63에 대한 푸소젠의 비를 가짐;
- [0582] b) 상기 푸소좀 조성물이 약 5~35, 10~30, 15~25, 16~19, 18~19, 또는 18.6의, CD63에 대한 단백질 적재물의 비를 가짐; 또는
- [0583] c) 상기 푸소좀 내 15%, 20%, 또는 25% 미만의 단백질이 엑소좀 단백질임.
- [0584] 42. 구현예 1 내지 41 중 어느 한 구현예에 있어서, 하기 중 하나 이상인, 푸소좀 조성물:
- [0585] a) 상기 푸소젠이 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 상기 푸소좀에 약 1~30%, 5~20%, 10~15%, 12~15%, 13~14%, 또는 13.6%의 총 단백질을 포함함;
- [0586] b) 상기 푸소젠이 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 20~120, 40~100, 50~90, 60~80, 65~75, 68~70, 또는 69의, GAPDH에 대한 비를 가짐;
- [0587] c) 상기 푸소젠이 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 200~900, 300~800, 400~700, 500~600, 520~590, 530~580, 540~570, 550~560, 또는 558.4의, CNX에 대한 비를 가짐;
- [0588] d) 상기 푸소좀 내 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 단백질이 리보솜 단백질이거나, 상기 푸소좀 내 약 1%~20%, 3%~15%, 5%~12.5%, 7.5%~11%, 또는 8.5%~10.5%, 또는 9%~10%의 단백질이 리보솜 단백질임.
- [0589] 43. 구현예 1 내지 42 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 공급원 세포가 ARDC1 또는 이의 활성 단편 또는

변이체를 발현하는(예를 들어 과발현하는), 푸소좀 조성물.

- [0590] 44. 구현예 1 내지 43 중 어느 한 구현예에 있어서, 예를 들어 질량 분광분석 검정법에 의해, 약 1~3, 1~10, 1~100, 3~10, 4~9, 5~8, 6~7, 15~100, 60~200, 80~180, 100~160, 120~140, 3~100, 4~100, 5~100, 6~100, 15~100, 80~100, 3~200, 4~200, 5~200, 6~200, 15~200, 80~200, 100~200, 120~200, 300~1000, 400~900, 500~800, 600~700, 640~690, 650~680, 660~670, 100~10,000, 또는 664.9의, ARRDC1에 대한 푸소좀의 비를 갖는, 푸소좀 조성물.
- [0591] 45. 구현예 1 내지 44 중 어느 한 구현예에 있어서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRDC1의 수준이 적어도 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25%이거나; 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRDC1의 수준이 약 0.01~25%, 0.5~20%, 2~15%, 또는 5~10%인, 푸소좀 조성물.
- [0592] 46. 구현예 1 내지 45 중 어느 한 구현예에 있어서, 예를 들어 질량 분광분석 검정법, 예를 들어 실시예 162의 검정법을 사용하여, 약 1,000~10,000, 2,000~5,000, 3,000~4,000, 3,050~3,100, 3,060~3,070, 또는 3,064의, tsg101에 대한 푸소좀의 비를 갖는, 푸소좀 조성물.
- [0593] 47. 구현예 1 내지 46 중 어느 한 구현예에 있어서, 예를 들어 질량 분광분석 검정법을 사용하여, 예를 들어 실시예 163의 검정법을 사용하여, 10~30, 15~25, 18~21, 19~20, 또는 19.5의, tsg101에 대한 적재물의 비를 갖는, 푸소좀 조성물.
- [0594] 48. 구현예 1 내지 47 중 어느 한 구현예에 있어서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준이 적어도 약 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.004%, 0.005%, 0.006%, 또는 0.007%이거나; 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준이 약 0.001~0.01, 0.002~0.006, 0.003~0.005, 또는 0.004인, 푸소좀 조성물.
- [0595] 49. 구현예 1 내지 48 중 어느 한 구현예에 있어서,
- [0596] e) 약제학적 또는 우수 의약품 제조관리 기준(GMP) 표준을 충족시키거나;
- [0597] f) 우수 의약품 제조관리 기준(GMP)에 따라 제조되었거나;
- [0598] g) 예정된 기준값보다 낮은 병원체 수준을 가지며, 예를 들어 병원체가 실질적으로 없거나;
- [0599] h) 예정된 기준값보다 낮은 오염물 수준을 가지며, 예를 들어 오염물이 실질적으로 없는, 푸소좀 조성물.
- [0600] 50. 구현예 1 내지 49 중 어느 한 구현예에 있어서, 4℃, 0℃, -4℃, -10℃, -12℃, -16℃, -20℃, -80℃ 또는 -160℃ 미만의 온도에서 존재하는, 푸소좀 조성물.
- [0601] 51. 구현예 1 내지 50 중 어느 한 구현예의 푸소좀 조성물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0602] 52. 구현예 51에 있어서, 상기 적재물이 치료제를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0603] 53. 치료제를 대상체에게 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 구현예 52의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 푸소좀 조성물을 상기 치료제가 전달되는 양 및/또는 시간으로 투여하는, 방법.
- [0604] 54. 푸소좀 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:
- [0605] a) 구현예 1 내지 50 중 어느 한 구현예의 푸소좀 조성물을 제공하는 단계; 및
- [0606] b) 푸소좀을 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로서 제제화하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0607] c) 푸소좀을 대상체에게 투여하는 단계.
- [0608] 55. 푸소좀 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:
- [0609] a) 구현예 1 내지 50 중 어느 한 구현예의 푸소좀 조성물을 제공하는 단계; 및
- [0610] b) 복수의 푸소좀으로부터 하나 이상의 푸소좀을 검정하여, 하기 인자 중 하나 이상의 존재 또는 수준을 결정하는 단계: (i) 면역원성 분자; (ii) 병원체; 또는 (iii) 오염물; 및
- [0611] c) 상기 인자 중 하나 이상이 기준값보다 낮다면, 복수의 푸소좀 또는 푸소좀 조성물을 방출용으로 승인하는 단계.

- [0612] 를 포함하는, 방법.
- [0613] 56. 공급원 세포로부터 유래된 복수의 푸소좀을 포함하는 푸소좀 조성물로서, 여기서, 상기 복수의 푸소좀은:
- [0614] (a) 지질 이중층;
- [0615] (b) 상기 지질 이중층에 의해 둘러싸인 내강;
- [0616] (c) 외인성 또는 과발현된 푸소젠으로서, 여기서, 상기 푸소젠은 상기 지질 이중층에 배치되는, 푸소젠; 및
- [0617] (d) 적재물
- [0618] 을 포함하고, 상기 푸소좀은 핵을 포함하지 않으며;
- [0619] 하기 중 하나 이상(예를 들어 적어도 2, 3, 4, 또는 5)이 존재하는, 푸소좀 조성물:
- [0620] i) 상기 푸소젠은 적어도 1,000 복사체의 복사수로 존재하거나;
- [0621] ii) 상기 푸소좀은 적어도 1,000 복사체의 복사수의 치료제를 포함하거나;
- [0622] iii) 상기 푸소좀은 지질을 포함하며, 여기서, CL, Cer, DAG, HexCer, LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LPS, PA, PC, PE, PG, PI, PS, CE, SM 및 TAG 중 하나 이상은 공급원 세포에서 상응하는 지질 수준의 75% 이내이거나;
- [0623] iv) 상기 푸소좀은 공급원 세포와 유사한 단백질 조성물을 포함하거나;
- [0624] v) 상기 푸소좀은 신호 전달을 할 수 있으며, 예를 들어 음성 대조군, 예를 들어 인슐린의 부재 하에서의 다른 유사한 푸소좀보다 예를 들어 적어도 10% 초과만큼, 인슐린에 반응하여 세포의 신호, 예를 들어 AKT 인산화, 또는 인슐린에 반응하여 글루코스(예를 들어 표지된 글루코스, 예를 들어 2-NBDG) 흡수를 전달할 수 있거나;
- [0625] vi) 상기 푸소좀은 대상체, 예를 들어 마우스에게 투여 시, 조직, 예를 들어 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이 또는 눈을 표적화하며, 예를 들어 투여된 푸소좀 집단 내 적어도 0.1%, 또는 10%의 푸소좀이 24시간 후 표적 조직에 존재하거나;
- [0626] vii) 상기 공급원 세포는 호중구, 과립구, 간엽 줄기세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 골수아세포, 근아세포, 간세포 또는 뉴런, 예를 들어 망막 신경 세포로부터 선택됨.
- [0627] 57. 구현예 56에 있어서, 바이러스 캡시드 단백질, 또는 DNA 통합 폴리펩타이드를 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0628] 58. 구현예 56에 있어서, 상기 적재물이 바이러스 게놈을 포함하는, 푸소좀 조성물.
- [0629] 59. 구현예 56에 있어서, 예를 들어 유전자 치료법을 위해 예를 들어 표적 세포의 게놈을 안정하게 변형시키기 위해, 핵산을 상기 표적 세포에 전달할 수 있는, 푸소좀 조성물.
- [0630] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명, 도면 및 청구항으로부터 분명해질 것이다.
- [0631] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속한 당업계의 당업자가 보편적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 언급된 모든 공개, 특허 출원, 특허 및 다른 참조문헌은 그 전문이 참조에 의해 포함된다. 예를 들어, 본원에서, 예를 들어 본원의 임의의 표에서 지칭된 모든 GenBank, Unigene 및 Entrez 서열은 참조에 의해 포함된다. 다르게 명시되지 않는 한, 본원의 임의의 표를 포함하여 본원에서 명시된 서열 기탁 번호는 2017년 5월 8일자로 데이터베이스 진입을 지칭한다. 하나의 유전자 또는 단백질이 복수의 서열 기탁 번호를 참조할 때, 모든 서열 변이체가 포괄된다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적이고, 제한하려는 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0632] 본 발명의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 양호하게 이해될 것이다. 본 발명을 예시하기 위해, 현재 예시된 본원에 기재된 도면에서 소정의 구현예에 제시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 제시된 구현예의 정확한 배열 및 장치로 한정되지 않음을 이해해야 한다.
- 도 1은 소포체에 대한 염료로 푸소좀을 염색한 것을 정량화한 것이다.

도 2는 미토콘드리아에 대한 염료로 푸소솜을 염색한 것을 정량화한 것이다.

도 3은 리소솜에 대한 염료로 푸소솜을 염색한 것을 정량화한 것이다.

도 4는 F-액틴에 대한 염료로 푸소솜을 염색한 것을 정량화한 것이다.

도 5는 Cre 및 GFP를 발현하는 푸소솜과 접촉된 세포의 광퇴색(photobleaching) 후, GFP 형광의 회수를 보여주는 그래프이다.

도 6은 푸소솜 또는 음성 대조군과 접촉된 후, RFP를 발현하는 표적 세포의 퍼센트를 보여주는 그래프이다.

도 7은 공여자 HeLa 세포와 수여자 HeLa 세포 사이에서의 융합을 통한 양성 세포소기관 전달의 이미지이다. 백색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 미토콘드리아와 수여자 미토콘드리아 사이에서의 중첩을 나타낸다. 회색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 세포소기관과 수여자 세포소기관이 중첩되지 않는 곳을 나타낸다.

도 8은 공여자 HeLa 세포와 수여자 HeLa 세포 사이에서의 융합을 통한 양성 세포소기관 전달의 이미지이다. 백색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 미토콘드리아와 수여자 미토콘드리아 사이에서의 중첩을 나타낸다. 회색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 세포소기관과 수여자 세포소기관이 중첩되지 않는 곳을 나타낸다.

도 9는 푸소솜이 주사된 마우스로부터의 표시된 조직의 현미경 이미지를 보여준다. 백색 표시는 RFP-형광 세포를 나타내어, 생체내에서 세포로의 단백질 적재물의 전달을 나타낸다.

도 10은 지시된 투여 경로에 의해 생체내에서 무린 조직으로의 푸소솜의 성공적인 전달, 및 이로 인한 표적화된 세포에 의한 루시페라제의 발현을 초래하는 것을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 11은 세포생물체에 의한 근육 세포로의 단백질 적재물의 전달을 나타내는, 무린 근육 조직에서 tdTomato 형광의 현미경 이미지를 보여준다.

도 12는 단백질-중강, 제핵 VSV-G HeLa 세포를 사용한, 수여자 HeLa Rho0 세포 내로의 미토콘드리아의 전달을 보여주는 그래프이다.

도 13은 거대(giant) 형질막 푸소솜의 발생 및 단리를 보여주는 일련의 이미지이다.

도 14a는 Cre 리컴비나제를 운반하는 푸소솜과 함께 인큐베이션되고, 지시된 바와 같이 다양한 크기의 공극을 갖는 막을 통한 압출에 의해 발생된 HEK293T 세포에서의 RFP의 발현을 보여주는 그래프이다.

도 14b는 부모 세포 및 푸소솜의 AF488의 Eu:488 양성 사건(event)(좌측 패널) 및 중앙 형광 강도(MFI; 우측 패널)를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 14c는 부모 세포 및 푸소솜의 AF647의 Edu:647 양성 사건 및 중앙 형광 강도를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 14d는 3, 5 및 24시간의 기간에 걸쳐 폴리머라제 액틴에 대한 푸소솜 및 부모 세포에 대한 용량을 보여주는 그래프이다.

도 15는 지질 이중층 구조를 갖는 푸소솜을 보여주는 전자 현미경 이미지이다.

도 16은 웨스턴 블롯에 의한 VSV-G 발현의 검출을 보여주는 다이어그램이다. "+대조군"은 VSV-G로 형질감염된 293T 세포를 나타낸다. "-대조군"은 형질감염되지 않은 293T 세포를 나타낸다.

도 17a는 서브-미크론 푸소솜 측정 매개변수 및 세팅을 보여주는 표이다.

도 17b는 수프라-미크론(supra-micron) 푸소솜 측정 매개변수 및 세팅을 보여주는 표이다.

도 17c는 NTA 및 현미경에 의해 측정된 바와 같이 푸소솜 및 부모 세포의 크기 분포를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 17d는 NTA 및 현미경에 의해 측정된 바와 같이 푸소솜 및 부모 세포의 크기 직경을 보여주는 일련의 표이다.

도 18은 NTA 및 현미경에 의해 측정된 바와 같이 푸소솜 및 부모 세포의 크기 분포 통계를 보여주는 일련의 표이다.

도 19는 푸소솜 및 부모 세포의 평균 크기 및 용적을 보여주는 표이다.

도 20a 내지 20c는 푸소솜에서 세포소기관의 검출을 보여주는 일련의 그래프이다. (a) 소포체; (b) 미토콘드리

아; (c) 리소좀.

도 21은 푸소좀 또는 세포 조제물에 대해 관찰된 가용성:불용성 비를 보여주는 일련의 다이어그램이다.

도 22는 표적 또는 비-표적 세포로의 MvH(CD8)+F 푸소좀 융합 및 표적화된 융합의 절대량을 보여주는 일련의 다이어그램이다.

도 23은 푸소좀으로 처리된 PC3 세포에서 h0x40L 발현을 보여주는 다이어그램이다.

도 24는 VSV-G 푸소좀에서 2-NBDG 평균 형광 강도를 보여주는 다이어그램이다.

도 25는 VSV-G 푸소좀의 세포기질에서 에스테라제 활성을 보여주는 다이어그램이다.

도 26a 내지 26b는 푸소좀이 주사된 마우스의 조직에서 파이어플라이 루시페라제 신호의 지속성으로 보여주는 일련의 다이어그램이다. (a) 푸소좀(우측 다리) 처리된 마우스 대 PBS(좌측 다리) 처리된 FVB 마우스의 복부 이미지 및 발광 신호이다. 좌측면은 이미지와 발광 신호의 오버레이(overlay)이고, 우측면은 발광 신호 단독이다. (b) 푸소좀 처리된 TA(짙은 정사각형), PBS 처리된 TA(열린 원), 마우스 백그라운드(짙은 육각형), 및 병기 백그라운드(열린 육각형)의 총 유속 신호이고; y-척도는 log10 척도 상에 있다. 푸소좀 치료받은 다리는 처리-후 1(p<0.0001), 6(p<0.01) 및 12(p<0.01)시간째에 유의하게 더 큰 신호를 가졌다.

도 27a 내지 27b는 마우스에서 생물발광 이미지에 의해 검출된 바와 같은 푸소좀에 의한 Cre 리컴비나제 전달을 보여주는 일련의 다이어그램이다. (a) IV 푸소좀 처리된 마우스의 노출된 간 및 비장의 복부 이미지 및 발광 신호 오버레이(1x 및 3x 농도)이다. 하위부는 발광 신호 단독이다. (b) 푸소좀 표적화된 비장 및 간의 총 유속 신호이며; y-척도는 log10 척도 상에 있다. 3x 농도의 푸소좀 처리로 처리된 마우스는 비장(p=0.0004)에서 처리-후 72시간째에 백그라운드보다 유의하게 더 큰 신호를 가졌다.

도 28a 내지 28b는 생물발광 이미징에 의해 검출된 바와 같이, 푸소좀에 의한 뮤린 간 및 비장으로의 Cre 리컴비나제를 보여주는 일련의 다이어그램이다. (a) 좌측으로부터 우측까지; 안락사 후 5분 이내에 수합되고 이미지화된 절제된 간, 심장, 폐, 신장, 소장, 췌장 및 비장의 배면(dorsal) 이미지 및 발광 신호 오버레이이다. 하위부는 발광 신호 단독이다. (b) 푸소좀 표적화된 비장 및 간 및 다른 조직의 총 유속 신호이며; y-척도는 log10 척도 상에 있다. 3x 농도의 푸소좀 처리로 처리된 마우스는 최저 신호를 갖는 조직(심장)과 비교하여, 비장(p<0.0001)에서 유의하게 더 큰 신호를 가졌다.

도 29는 비-세포내이입 경로를 통한 NivG+F 푸소좀에 의한 Cre 적재물의 전달을 보여주는 표이다.

도 30은 세포내이입 경로를 통한 VSV-G 푸소좀에 의한 Cre 적재물의 전달을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 31은 Syn1 HeLa 세포 푸소좀을 사용한, 수여자 HeLa Rho0 세포로의 기능성 미토콘드리아의 전달을 보여주는 그래프이다.

도 32는 푸소좀을 통한 수여자 세포로의 DNA의 시험관내 전달을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 33은 푸소좀을 통한 수여자 세포로의 mRNA의 시험관내 전달을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 34a 내지 34b는 푸소좀을 사용한, 마우스의 조직 내로의, 파이어플라이 루시페라제를 인코딩하는 mRNA의 생체내 전달을 보여주는 일련의 다이어그램이다. (a) 푸소좀(우측 다리) 처리된 마우스 대 PBS(좌측 다리) 처리된 FVB 마우스의 복부 이미지 및 발광 신호이다. 좌측면은 이미지와 발광 신호의 오버레이이고, 우측면은 발광 신호 단독이다. (b) 푸소좀 처리된 TA(짙은 정사각형), PBS 처리된 TA(열린 원), 마우스 백그라운드(짙은 육각형), 및 병기 백그라운드(열린 육각형)의 총 유속 신호이고; y-척도는 log10 척도 상에 있다. 푸소좀 처리된 다리는 처리-후 1 (p<0.0001), 6 (p<0.01) 및 12 (p<0.01)시간째에 유의하게 더 큰 신호를 가졌다.

도 35는 푸소좀을 통한 수여자 세포로의 단백질의 시험관내 전달을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 36a 내지 36b는 푸소좀을 사용한, 마우스의 조직 내로의 Cre 리컴비나제 단백질의 생체내 전달을 보여주는 일련의 이미지이다. (a) 좌측으로부터 우측까지; 배측 노출 처리된 TA의 발광 신호 및 마우스의 이미지, 및 발광 신호 단독이다. (b) 치료받은 다리 대 치료받지 않은 다리, 백그라운드(마우스 흉부) 및 병기 백그라운드의 총 유속이며; y-척도는 log10 척도 상에 있다.

도 37은 초음파처리에 의해 로딩된 푸소좀을 통한, 수여자 세포로의 miRFP670 DNA의 전달을 보여주는 일련의 다이어그램이다.

도 38은 초음파처리에 의해 로딩된 푸소좀을 통한, 수여자 세포로의 BSA-AF647 단백질의 전달을 보여주는 일련의 다이어그램이다.

도 39는 푸소좀 고스트(ghost)의 크기 분포 및 농도를 보여주는 히스토그램이다.

도 40은 부모 세포 및 푸소좀의 AF647의 Edu:647 양성 사건 및 중앙 형광 강도를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 41은 푸소좀 및 부모 세포에서 비신초닌산(bicinchoninic acid) 검정법에 의해 측정된 GAPDH: 총 단백질 비를 보여주는 그래프이다.

도 42는 푸소좀 및 부모 세포에서 비신초닌산 검정법에 의해 측정된 지질: 단백질 비를 보여주는 그래프이다.

도 43은 푸소좀 및 부모 세포에서 비신초닌산 검정법에 의해 측정된 단백질: DNA 비를 보여주는 그래프이다.

도 44는 푸소좀 및 부모 세포에서 비신초닌산 검정법에 의해 측정된 지질: DNA 비를 보여주는 그래프이다.

도 45는 디나민 저해제 디나소어의 존재 또는 부재 하에 VSV-G 푸소좀에 의한 세포 내로의 Cre 전달을 보여주는 일련의 이미지이다.

도 46은 엑소좀 및 푸소좀에서 엑소좀 마커 CD63의 단백질 수준을 보여주는 그래프이다.

도 47은 푸소좀 및 부모 세포에서 검출된 칼넥신 신호의 강도를 보여주는 그래프이다.

도 48은 푸소좀 및 부모 세포에 대해 결정된 지질:DNA 비를 보여주는 그래프이다.

도 49a 내지 49b는 부모 세포, 엑소좀 및 푸소좀에서의 총 지질의 퍼센트로서, 지질 화학종의 비율을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 50은 지시된 바와 같이, 특이적인 구획과 결합된 단백질에 대한 부모 세포, 엑소좀 및 푸소좀의 단백질 함량을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 51은 부모 세포, 엑소좀 및 푸소좀에서의 총 단백질 함량의 퍼센트로서, ARRDC1(좌측 패널) 또는 TSG101(우측 패널)의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 52a 내지 52b는 어레스틴 도메인-함유 단백질 1(ARRDC1)을, Cre를 캡슐화하는 푸소좀의 생성 내로 혼입한 효과를 보여주는 일련의 그래프이다. (a) ARRDC1의 존재 또는 부재 하에 생성된 푸소좀과 함께 인큐베이션된 후 검출되는 RFP-양성 세포의 퍼센트이다. (b) ARRDC1의 존재 또는 부재 하에 생성된 푸소좀에 대한 나노입자 추적 분석(fNTA; Nano입자 Tracking Analysis)을 사용하여 검출된, 1 mL 당 입자의 수이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0633] 본 발명은 푸소좀을 포함하는 천연 유래된 이중지질 막 또는 조작된 이중지질 막을 기재하고 있다.
- [0634] 정의
- [0635] 본원에 사용된 바와 같이, "세포막"은 세포, 예를 들어 공급원 세포 또는 표적 세포로부터 유래된 막을 지칭한다.
- [0636] 본원에 사용된 바와 같이, "콘드리움"은 천연 세포 또는 조직 공급원의 미토콘드리아 네트워크로부터 유래되고 단리되거나 정제된 아세포성 장치를 지칭한다. "콘드리움 조제물"은 생물활성(세포 또는 조직과 상호작용할 수 있거나 이에 대해 효과를 가질 수 있음) 및/또는 약제학적 활성을 가진다.
- [0637] 본원에 사용된 바와 같이, "세포생물체"는 내강 및 세포막을 포함하는 세포, 또는 부분적인 또는 완전한 핵 불활성화를 갖는 세포의 일부를 지칭한다. 일부 구현예에서, 세포생물체는 세포골격 구성성분, 세포소기관 및 리보솜 중 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 세포생물체는 제핵 세포, 미세소낭 또는 세포 고스트이다.
- [0638] 본원에 사용된 바와 같이, "세포기질"은 세포의 세포질의 수성 구성성분을 지칭한다. 세포기질은 단백질, RNA, 대사물 및 이온을 포함할 수 있다.
- [0639] 본원에 사용된 바와 같이, "외인성 작용제"는: i) 천연적으로 존재하지 않는 작용제, 예컨대 내인성 단백질에 비해 (예를 들어 삽입, 결실, 또는 치환에 의해) 변경된 서열을 갖는 단백질, 또는 ii) 외인성 작용제가 배치되는 푸소좀의 천연 발생 공급원 세포에서 천연적으로 발생하지 않는 작용제를 지칭한다.
- [0640] 본원에 사용된 바와 같이, "융합하다"는 2개의 막-밀폐 내강 사이에서 상호작용을 생성하는, 예를 들어 2개의

막의 융합을 용이하게 하거나 2개의 내강 사이에서 연결, 예를 들어 공극을 생성하는 것을 말한다.

- [0641] 본원에 사용된 바와 같이, "푸소젠"은 2개의 막-밀폐 내강 사이에서 상호작용을 생성하는 작용제 또는 분자를 지칭한다. 구현예에서, 푸소젠은 막의 융합을 용이하게 한다. 다른 구현예에서, 푸소젠은 2개의 내강(예를 들어 푸소좀의 내강과 표적 세포의 세포질) 사이에서 연결, 예를 들어 공극을 생성한다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 2개 이상의 단백질의 복합체를 포함하며, 예를 들어, 어떠한 단백질도 푸소젠 활성을 단독으로 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 표적화 도메인을 포함한다.
- [0642] 본원에 사용된 바와 같이, "푸소젠 결합 파트너"는 2개의 막 사이에서 융합을 용이하게 하기 위해 푸소젠과 상호작용하는 작용제 또는 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너는 세포의 표면 특징일 수 있거나 세포의 표면 특징을 포함할 수 있다.
- [0643] 본원에 사용된 바와 같이, "푸소좀"은 막-밀폐 조제물, 및 양친매성 지질 이중층과 상호작용하는 푸소젠을 지칭한다.
- [0644] 본원에 사용된 바와 같이, "푸소좀 조성물"은 하나 이상의 푸소좀을 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0645] 본원에 사용된 바와 같이, "막-밀폐 조제물"은 내강 또는 공동(cavity)에서 적재물을 둘러싸고 있는 양친매성 지질의 이중층을 지칭한다. 일부 구현예에서, 적재물은 내강 또는 공동에 대해 외인성이다. 다른 구현예에서, 적재물은 내강 또는 공동에 대해 내인성이며, 예를 들어 공급원 세포에 대해 내인성이다.
- [0646] 본원에 사용된 바와 같이, "미토콘드리아 생물발생"은 미토콘드리아의 바이오매스를 증가시키는 과정을 말한다. 미토콘드리아 생물발생은 세포에서 미토콘드리아의 수 및/또는 크기를 증가시키는 단계를 포함한다.
- [0647] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "정제된"은 천연 상태에서부터 변경되거나 제거되는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아 있는 동물에서 천연적으로 존재하는 세포 또는 세포 단편은 "정제되지" 않지만, 이의 천연 상태에서부터 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 세포 또는 세포 단편은 "정제된"다. 정제된 푸소좀 조성물은 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있거나, 비-천연 환경, 예를 들어 배양 배지, 예컨대 세포를 포함하는 배양 배지에 존재할 수 있다.
- [0648] 본원에 사용된 바와 같이, "재-표적화된 푸소젠"은, 천연-발생 형태의 푸소젠의 일부가 아닌 서열을 갖는 표적화 모이어티를 포함하는 푸소젠을 지칭한다. 구현예에서, 푸소젠은 천연-발생 형태의 푸소젠에 표적화 모이어티에 비해 상이한 표적화 모이어티를 포함한다. 구현예에서, 천연-발생 형태의 푸소젠은 표적화 도메인이 결여되어 있고, 재-표적화된 푸소젠은 천연-발생 형태의 푸소젠으로부터 부재인(absent) 표적화 모이어티를 포함한다. 구현예에서, 푸소젠은 표적화 모이어티를 포함하도록 변형된다. 구현예에서, 푸소젠은 천연-발생 형태의 푸소젠에 비해 표적화 모이어티의 외부에, 예를 들어 막관통 도메인, 푸소젠적 활성 도메인, 또는 세포질 도메인에서 하나 이상의 서열 변경을 포함한다.
- [0649] 본원에 사용된 바와 같이, "공급원 세포"("부모 세포"와 상호교환적으로 사용됨)는 푸소좀이 유래되는 세포를 지칭한다.

[0650] 푸소좀

- [0651] 일부 양태에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물 및 방법은 푸소젠을 포함하는, 막-밀폐 조제물, 예를 들어 천연 유래된 또는 조작된 지질 막을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 푸소젠, 예를 들어 단백질, 지질 및 화학적 푸소젠을 포함하는 비-식물 세포, 예를 들어 포유류 세포, 또는 이의 유도체(예를 들어 미토콘드리아, 콘드리솜, 세포소기관, 소낭 또는 제핵 세포)의 일부를 제공한다.

[0652] 캡슐화

- [0653] 본원에 기재된 조성물 및 방법의 일부 구현예는 푸소좀, 예를 들어 푸소젠과 함께 양친매성 지질의 천연 유래된 또는 조작된 이중층을 포함한다. 이러한 조성물은 놀랍게도, 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 일부 상황에서, 막은 자가, 동종이계, 이종성(xenogeneic) 또는 조작된 세포 형태를 취할 수 있으며, 예를 들어 문헌[Ahmad et al. 2014 Mirol regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. EMBO Journal. 33(9):994-1010]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 예를 들어 문헌[Orive. et al. 2015. Cell encapsulation: technical and clinical advances. Trends in Pharmacology Sciences; 36 (8):537-46; 및 Mishra. 2016. Handbook of Encapsulation and Controlled Release. CRC Press]에 기재된 조작된 막을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 천연 발생 막을 포함한다(문헌[McBride et al.

2012. A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from mitochondria to lysosomes. Current Biology 22:135-141)).

- [0654] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 천연 유래 막, 예를 들어 세포 또는 조직으로부터 제조된 막 소낭을 포함한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 MSC 또는 정상세포로부터의 소낭이다.
- [0655] 일 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀이다.
- [0656] 예시적인 엑소좀 및 다른 막-밀폐 바디(body)는 예를 들어 US2016137716에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 세포로부터 수득 가능한 소낭, 예를 들어 미세소낭, 엑소좀, 세포자멸사 바디(세포자멸사 세포로부터), 미세입자(예를 들어 혈소판으로부터 유래될 수 있음), 엑토좀(ectosome)(예를 들어 혈청 내 호중구 및 단핵구로부터 유래 가능함), 프로스타토좀(prostatosome)(전립선암 세포로부터 수득 가능함), 카디오좀(cardiosome)(심장 세포로부터 유래 가능함) 등을 포함한다.
- [0657] 예시적인 엑소좀 및 다른 막-밀폐 바디는 또한, WO/2017/161010, WO/2016/077639, US20160168572, US20150290343 및 US20070298118에 기재되어 있고, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포의 소낭, 나노소낭, 또는 엑소좀을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 세포의 소낭, 예를 들어 내부 공간을 둘러싸고 있으며 이것이 유래되는 세포보다 더 작은 직경을 갖는 막을 포함하는 세포-유래 소낭을 포함한다. 구현예에서, 세포의 소낭은 20 nm 내지 1000 nm의 직경을 가진다. 구현예에서, 푸소좀은 세포자멸사 바디, 세포의 단편, 직접적인 또는 간접적인 조작에 의해 세포로부터 유래된 소낭, 소낭화된(vesiculated) 세포소기관, 및 살아 있는 세포에 의해(예를 들어 직접적인 형질막 출아(budding) 또는 후기 엔도솜과 형질막의 융합에 의해) 생성된 소낭을 포함한다. 구현예에서, 세포의 소낭은 살아 있는 또는 죽은 유기체, 외식된(외식편) 조직 또는 기관, 또는 배양된 세포로부터 유래된다. 구현예에서, 푸소좀은 나노소낭, 예를 들어 내부 공간을 둘러싸고 있는 막을 포함하는 세포-유래 저분자(예를 들어 20 내지 250 nm의 직경, 또는 30 내지 150 nm의 직경) 소낭을 포함하고, 이는 직접적인 또는 간접적인 조작에 의해 상기 세포로부터 발생된다. 일부 상황에서, 나노소낭의 생성은 공급원 세포의 파괴를 초래할 수 있다. 나노소낭은 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀을 포함한다. 구현예에서, 엑소좀은 내부 공간을 둘러싸고 있는 막을 포함하는 세포-유래 저분자(예를 들어 20 내지 300 nm의 직경, 또는 40 내지 200 nm의 직경) 소낭이고, 이는 직접적인 형질막 출아에 의해 또는 후기 엔도솜과 형질막의 융합에 의해 상기 세포로부터 발생된다. 구현예에서, 엑소좀의 생성은 공급원 세포의 파괴를 초래하지 않는다. 구현예에서, 엑소좀은 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0658] 예시적인 엑소좀 및 다른 막-밀폐 바디는 또한, US 20160354313에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 구현예에서, 푸소좀은 생용적합성 전달 모듈, 엑소좀(예를 들어 약 30 nm 내지 약 200 nm의 직경), 미세소낭(예를 들어 약 100 nm 내지 약 2000 nm의 직경), 세포자멸사 바디(예를 들어 약 300 nm 내지 약 2000 nm의 직경), 막 입자, 막 소낭, 엑소좀-유사 소낭, 엑토좀-유사 소낭, 엑토좀, 또는 엑소소낭을 포함한다.
- [0659] 일 구현예에서, 푸소좀은 미세소낭이다. 일부 구현예에서, 미세소낭은 약 10 내지 10,000 nm의 직경을 가진 아세포성 또는 세포의 소낭이다. 일부 구현예에서, 미세소낭은 세포로부터 천연적으로 방출되고, 일부 구현예에서, 세포는 소낭의 형성을 증강시키기 위해 처리된다. 일 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀이다. 일부 상황에서, 엑소좀은 약 30 내지 100 nm의 직경이다. 일부 구현예에서, 엑소좀은 다소낭체(multivesicular body)로부터 발생된다. 일부 구현예에서, 세포는 엑소좀의 형성을 증강시키기 위해 처리된다. 일 구현예에서, 푸소좀은 세포 고스트이다. 일 구현예에서, 소낭은 형질막 소낭, 예를 들어 거대 형질막 소낭이다.
- [0660] 푸소좀은 몇몇 상이한 유형의 지질, 예를 들어 양친매성 지질, 예컨대 인지질로부터 제조될 수 있다. 푸소좀은 지질 이중층을 최외곽 표면으로서 포함할 수 있다. 이러한 이중층은 동일하거나 상이한 유형의 하나 이상의 지질로 이루어질 수 있다. 예는 비제한적으로, 인지질, 예컨대 포스포콜린 및 포스포이노시톨을 포함한다. 구체적인 예는 비제한적으로, DMPC, DOPC 및 DSPC를 포함한다.
- [0661] 푸소좀은 주로, 천연 인지질 및 지질, 예컨대 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스파티딜 콜린(DSPC), 스펡고미엘린, 에그(egg) 포스파티딜콜린 및 모노시알로글리오사이드로 이루어질 수 있다. 구현예에서, 푸소좀은 인지질만 포함하고, 혈장에서 덜 안정하다. 그러나, 구현예에서, 콜레스테롤을 이용한 지질 막의 조작은 캡슐화된 생물활성 화합물의 안정성을 증가시키고 혈장으로의 상기 활성 화합물의 급속 방출을 감소시킬 수 있다. 일부

구현예에서, 푸소솜은 예를 들어 안정성을 증가시키기 위해 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)을 포함한다(예를 들어 리뷰를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).

[0662] 일부 구현예에서, 푸소솜은 막 곡률(curvature)에 영향을 주는 지질을 포함하거나 상기 지질에 대해 농화된다(예를 들어 문헌[Thiam et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14(12): 775-785, 2013] 참조). 일부 지질은 작은 친수성 머리 기(head group) 및 큰 소수성 꼬리를 가지며, 이는 국소 영역에서의 농축에 의해 융합 공극의 형성을 용이하게 한다. 일부 구현예에서, 푸소솜은 음성-곡률(negative curvature) 지질, 예컨대 콜레스테롤, 포스파티딜에탄올아민(PE), 디글리세라이드(DAG), 포스파티드산(PA), 지방산(FA)을 포함하거나 이에 대해 농화된다. 일부 구현예에서, 푸소솜은 양성-곡률(positive-curvature) 지질, 예컨대 리소포스파티딜콜린(LPC), 포스파티딜이노시톨(PtdIns), 리소포스파티드산(LPA), 리소포스파티딜에탄올아민(LPE), 모노아실글리세롤(MAG)을 포함하지 않거나, 이것이 결실되어 있거나, 이를 적은 수로 가진다.

[0663] 일부 구현예에서, 지질은 푸소솜에 첨가된다. 일부 구현예에서, 지질은 배양물 내 공급원 세포에 첨가되고, 이는 푸소솜의 형성 전에 또는 동안에 이들의 막 내로 지질을 혼입한다. 일부 구현예에서, 지질은 세포 또는 푸소솜에 리포솜 형태로 첨가된다. 일부 구현예에서, 메틸-베타사이클로덱스트란(α -CD)은 지질을 농화시키거나 이를 결실시키는 데 사용된다(예를 들어 문헌[Kainu et al, Journal of Lipid Research, 51(12): 3533-3541, 2010] 참조).

[0664] 푸소솜은 비제한적으로, DOPE(디올레오일포스파티딜에탄올아민), DOTMA, DOTAP, DOTIM, DDAB를 단독으로 또는 콜레스테롤과 함께 포함하여, DOPE와 콜레스테롤, DOTMA와 콜레스테롤, DOTAP와 콜레스테롤, DOTIM과 콜레스테롤, 및 DDAB와 콜레스테롤을 산출할 수 있다. 다층 소낭 지질의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어 미국 특허 6,693,086을 참조하며, 다층 소낭 지질 제조에 관한 이의 교시는 참조에 의해 본 명세서에 포함됨). 지질 필름이 수용액과 혼합되는 경우 푸소솜의 형성이 자발적일 수 있더라도, 이러한 형성은 또한, 균질화기, 초음파처리기 또는 압출 장치를 사용함으로써 셰이킹 형태로 힘을 가함으로써 수행될 수 있다(예를 들어 리뷰를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조). 압출된 지질은 문헌[Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997]에 기재된 바와 같이, 크기를 저하시키는 필터를 통해 압출시킴으로써 제조될 수 있으며, 압출된 지질 제조에 관한 이의 교시는 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0665] 또 다른 구현예에서, 지질은 푸소솜을 형성하는 데 사용될 수 있다. 비제한적으로 DLin-KC2-DMA4, C12-200 및 공동지질(colipid) 디스테로일포스파티딜 콜린, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 포함하는 지질은 자발적 소낭 형성 절차를 사용하여 제제화될 수 있다(예를 들어 문헌[Novobrantseva, Molecular Therapy-Nucleic Acids (2012) 1, e4; doi:10.1038/mtna.2011.3] 참조). Tekmira 공개문헌은 지질 소낭 및 지질 소낭 제제의 다양한 양태를 기재하고 있으며(예를 들어 미국 특허 7,982,027; 7,799,565; 8,058,069; 8,283,333; 7,901,708; 7,745,651; 7,803,397; 8,101,741; 8,188,263; 7,915,399; 8,236,943 및 7,838,658 및 유럽 특허 1766035; 1519714; 1781593 및 1664316 참조), 이들은 모두 참조에 의해 본 명세서에 포함되고, 본 발명에 사용되며 및/또는 적용될 수 있다.

[0666] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소솜은 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 중합체는 생분해성일 수 있다. 생분해성 중합체 소낭은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 중합체 소낭을 합성하기 위한 예시적인 방법은 문헌[Bershteyn et al., Soft Matter 4:1787-1787, 2008] 및 US 2008/0014144 A1에 기재되어 있고, 미세입자 합성에 관한 이의 구체적인 교시는 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0667] 사용될 수 있는 예시적인 합성 중합체는 비제한적으로, 지방족 폴리에스테르, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(락트산)(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 락트산과 글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 다중무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리우레탄, 폴리(부티르산), 폴리(발레르산) 및 폴리(락타이드-코-카프로락톤), 및 천연 중합체, 예컨대 알부민, 알기네이트, 및 텍스트란 및 셀룰로스를 포함하는 다른 다당류, 콜라겐, 치환, 화학적 기, 예를 들어 알킬, 알킬렌의 첨가, 하이드록실화, 산화 및 당업자에 의해 일상적으로 이루어진 다른 변형을 포함하는 이들의 화학적 유도체, 알부민 및 다른 친수성 단백질, 제인(zein) 및 다른 프롤라민 및 소수성 단백질, 이들의 공중합체 및 혼합물을 포함한다. 일반적으로, 이들 물질은 효소적 가수분해 또는 생체내에서 물에의 노출에 의해, 표면 또는 벌크 미란(erosion)에 의해 분해된다.

[0668] 푸소솜

- [0669] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀(예를 들어 소낭 또는 세포의 일부를 포함함)은 예를 들어 막, 예를 들어 세포막으로의 푸소좀의 융합을 용이하게 하기 위해 하나 이상의 푸소젠을 포함한다. 또한 이들 조성물은 합성 동안 또는 후에 이루어진 표면 변형을 포함하여, 하나 이상의 푸소젠을 포함할 수 있으며, 예를 들어 푸소젠은 표적 세포에 상보적일 수 있다. 표면 변형은 막에 대한 변형, 예를 들어 막 내로의 지질 또는 단백질의 삽입을 포함할 수 있다.
- [0670] 일부 구현예에서, 푸소좀은 이들의 외부 표면 상에(예를 들어 세포막 내로 통합된) 하나 이상의 푸소젠을 포함하여, 특이적인 세포 또는 조직 유형(예를 들어 심근세포)을 표적화할 수 있다. 푸소젠은 비제한적으로, 단백질계, 지질계, 및 화학계 푸소젠을 포함한다. 푸소젠은 표적 세포의 표면 상의 파트너를 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소젠을 포함하는 푸소좀은 표적 세포의 지질 이중층 내로 막을 통합시킬 것이다.
- [0671] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소젠 중 하나 이상은 푸소좀에 포함될 수 있다.
- [0672] 단백질 푸소젠
- [0673] 일부 구현예에서, 푸소젠은 단백질 푸소젠, 예를 들어 포유류 단백질 또는 포유류 단백질의 상동체(homologue)(예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 가짐), 비-포유류 단백질, 예컨대 바이러스 단백질 또는 바이러스 단백질의 상동체(예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 가짐), 선천적(native) 단백질 또는 선천적 단백질의 유도체, 합성 단백질, 이들의 단편, 이들의 변이체, 푸소젠 또는 단편 중 하나 이상을 포함하는 단백질 융합 및 이들의 임의의 조합이다.
- [0674] 일부 구현예에서, 푸소젠은 푸소좀 내의 지질과 표적 세포 내의 지질 사이에서 혼합을 초래한다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 푸소좀의 내강과 표적 세포의 세포기질 사이에서 하나 이상의 공극의 형성을 초래하며, 예를 들어 푸소좀은 본원에 기재된 바와 같은 코넥신(connexin)이거나 코넥신을 포함한다.
- [0675] 포유류 단백질
- [0676] 일부 구현예에서, 푸소젠은 포유류 단백질을 포함할 수 있으며, 표 1을 참조한다. 포유류 푸소젠의 예는 SNARE과 단백질, 예컨대 vSNARE 및 tSNARE, 신시틴(syncytin) 단백질, 예컨대 신시틴-1(DOI: 10.1128/JVI.76.13.6442-6452.2002), 및 신시틴-2, 마이오마커(biorxiv.org/content/early/2017/04/02/123158, doi.org/10.1101/123158, doi: 10.1096/fj.201600945R, doi:10.1038/nature12343), 마이오믹서(www.nature.com/nature/journal/v499/n7458/full/nature12343.html, doi:10.1038/nature12343), 마이오머저(science.sciencemag.org/content/early/2017/04/05/science.aam9361, DOI: 10.1126/science.aam9361), FGFR1(섬유아세포 성장 인자 수용체-유사 1), 미니온(Minion)(doi.org/10.1101/122697), 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈하이드로게나제(GAPDH)의 이소형(isoform)(예를 들어 US 6,099,857A에 개시된 바와 같음), 간극 연결 단백질, 예컨대 코넥신 43, 코넥신 40, 코넥신 45, 코넥신 32 또는 코넥신 37(예를 들어 US 2007/0224176에 기재된 바와 같음, Hap2, 이중성 세포 사이에서 신시티움(syncytium) 형성을 유도할 수 있는 임의의 단백질(표 2 참조), 푸소젠 특성을 갖는 임의의 단백질(표 3참조), 이들의 상동체, 이들의 단편, 이들의 변이체, 및 하나 이상의 단백질 또는 임의의 단편을 포함하는 단백질 융합을 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 인간 게놈에서 확인되는 인간 내인성 레트로바이러스 요소(hERV)에 의해 인코딩된다. 추가적인 예시적인 푸소젠은 US 6,099,857A 및 US 2007/0224176에 개시되어 있으며, 이들의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

표 1: 인간 푸소젠 및 비-인간 푸소젠의 비제한적인 예.

인간 푸소젠 및 비-인간 푸소젠 클래스		
푸소젠 클래스	Uniprot 단백질 과 ID	서열의 #
EFF-AFF	PF14884	191
SNARE	PF05739	5977
DC-STAMP	PF07782	633
ENV	PF00429	312

[0677]

표 2: 푸소젠 특성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자.

하기의 유전자 존재론 주석을 갖는 인간 유전자:	
형질막 융합 단백질에 의한 신시티움 형성	
ID	부호
A0A024R0I0	DYRK1B
A0A024R1N1	MYH9
A0A024R2D8	CAV3
A0A096LNV2	FER1L5
A0A096LPA8	FER1L5
A0A096LPB1	FER1L5
A0AVI2	FER1L5
A6NI61	TMEM8C (마이오마커)
B3KSL7	-
B7ZLI3	FER1L5
H0YD14	MYOF
O43184	ADAM12
O60242	ADGRB3
O60500	NPHS1
O95180	CACNA1H
O95259	KCNH1
P04628	WNT1
P15172	MYOD1
P17655	CAPN2
P29475	NOS1
P35579	MYH9
P56539	CAV3
Q2NNQ7	FER1L5
Q4KMG0	CDON
Q53GL0	PLEKHO1
Q5TCZ1	SH3PXD2A
Q6YHK3	CD109
Q86V25	VASH2
Q99697	PITX2
Q9C0D5	TANC1
Q9H295	DCSTAMP
Q9NZM1	MYOF
Q9Y463	DYRK1B

[0678]

표 3: 인간 푸소젠 후보

푸소젠 클래스	유전자 ID
SNARE	O15400
	Q16623
	K7EQB1
	Q86Y82
	E9PN33
	Q96NA8
	H3BT82
	Q9UNK0
	P32856
	Q13190
	O14662
	P61266
	O43752
	O60499
	Q13277
	B7ZBM8
	A0AVG3
	Q12846
DC-STAMP	Q9H295
	Q5T1A1
	Q5T197
	E9PJX3
ENV	Q9BR26
	Q9UQF0
	Q9N2K0
	P60507
	P60608
	B6SEH9
	P60508
	B6SEH8
	P61550
	P60509
	Q9N2J8
근육 융합 (마이오마커)	H0Y5B2
	H7C1S0
	Q9HCN3
	A6NDV4
	K4DI83

[0679]

근육 융합 (마이오믹서)	NP_001302423.1
	ACT64390.1
	XP_018884517.1
	XP_017826615.1
	XP_020012665.1
	XP_017402927.1
	XP_019498363.1
	ELW65617.1
	ERE90100.1
	XP_017813001.1
	XP_017733785.1
	XP_017531750.1
	XP_020142594.1
	XP_019649987.1
	XP_019805280.1
	NP_001170939.1
	NP_001170941.1
	XP_019590171.1
	XP_019062106.1
	EPQ04443.1
	EPY76709.1
	XP_017652630.1
	XP_017459263.1
	OBS58441.1
	XP_017459262.1
	XP_017894180.1
	XP_020746447.1
	ELK00259.1
	XP_019312826.1
	XP_017200354.1
	BAH40091.1
HA	P03452
	Q9Q0U6
	P03460
간극 연결	P36382
	P17302
	P36383
	P08034
	P35212
기타	FGFRL1
	GAPDH

[0680]

[0681]

일부 구현예에서, 푸소솜은 곡물-발생 단백질, 예를 들어 Epsin1, 디나민, 또는 BAR 도메인을 포함하는 단백질을 포함한다. 예를 들어 문헌[Kozlov et al, CurrOp StrucBio 2015, Zimmerberget al. Nat Rev 2006, Richard et al, Biochem J 2011]을 참조한다.

[0682]

비-포유류 단백질

[0683]

바이러스 단백질

[0684]

일부 구현예에서, 푸소젠은 비-포유류 단백질, 예를 들어 바이러스 단백질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 푸소젠은 클래스 I 바이러스 막 융합 단백질, 클래스 II 바이러스 막 단백질, 클래스 III 바이러스 막 융합 단백질, 바이러스 막 당단백질, 또는 다른 바이러스 융합 단백질, 또는 이들의 상동체, 이들의 단편, 이들의 변이체, 또는 하나 이상의 단백질 또는 이들의 단편을 포함하는 단백질 융합이다.

[0685]

일부 구현예에서, 클래스 I 바이러스 막 융합 단백질은 바칼로바이러스 F 단백질, 예를 들어 뉴클레오폴리헤드로바이러스(NPV) 속(genera)의 F 단백질, 예를 들어 스포도테라 엑시구아(Spodoptera exigua) MNPV(SeMNPV) F 단백질 및 리만트리아 디스파(Lymantria dispar) MNPV(LdMNPV), 및 파라믹소바이러스 F 단백질을 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

- [0686] 일부 구현예에서, 클래스 II 바이러스 막 단백질은 진드기 매개 뇌염 E (TBEV E; tick bone encephalitis E), 셴리키 삼림열(Semliki Forest) 바이러스 E1/E2를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0687] 일부 구현예에서, 클래스 III 바이러스 막 융합 단백질은 람도바이러스 G(예를 들어 수포성 구내염 바이러스 (VSV-G)의 푸소젠 단백질 G), 헤르페스바이러스 당단백질 B(예를 들어 단순포진 바이러스 1(HSV-1) gB), 엡스타인 바 바이러스 당단백질 B(EBV gB), 토고토바이러스 G, 바쿨로바이러스 gp64(예를 들어 오토그라파 캘리포니아 다중 NPV(AcMNPV; Autographa California multiple NPV) gp64), 및 보르나병 바이러스(BDV) 당단백질(BDV G)을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0688] 다른 바이러스 푸소젠, 예를 들어 막 당단백질 및 바이러스 융합 단백질의 예는 바이러스 신시티아(syncytia) 단백질, 예컨대 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 또는 이의 돌연변이체, 또는 융합 단백질; 인간 면역결핍 바이러스 1형 외피 단백질(HIV-1 ENV), 림프구 신시티움을 형성하기 위해 HIV 결합 LFA-1로부터의 gp120, HIV gp41, HIV gp160, 또는 HIV 전사 Trans-활성자(TAT); 바이러스 당단백질 VSV-G, 람도비리대과의 수포성 구내염 바이러스로부터의 바이러스 당단백질; 수두 대상포진 바이러스(VZV)의 당단백질 gB 및 gH-gL; 무린 백혈병 바이러스 (MLV)-10A1; 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 당단백질(GaLV); 광견병, 모콜라(Mokola) 수포성 구내염 바이러스 및 토가바이러스에서 G형 당단백질; 무린 간염 바이러스 JHM 표면 투사(projection) 단백질; 돼지 호흡기 코로나바이러스 스파이크(spike)- 및 막 당단백질; 조류 전염성 기관지염 스파이크 당단백질 및 이의 전구체; 소 장 코로나바이러스 스파이크 단백질; 홍역 바이러스의 F 및 H, HN 또는 G 유전자; 개 디스템퍼(canine distemper) 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스 3, 시미안 바이러스 41, 쉐다이 바이러스 및 인간 호흡기 세포융합 바이러스; 샤페론 단백질 gL을 갖는, 인간 헤르페스바이러스 1 및 시미안 수두 바이러스의 gH; 인간, 소 및 세르코피티신(cercopithecine) 헤르페스바이러스 gB; 프렌드 무린 백혈병 바이러스 및 메이즌 화이자 원숭이(Mason Pfizer monkey) 바이러스의 외피 당단백질; 유행성 이하선염 바이러스 헤마글루티닌 뉴라미니 다제, 및 당단백질 F1 및 F2; 베네주엘라 말 뇌염으로부터의 막 당단백질; 파라믹소바이러스 F 단백질; HIV gp160 단백질; 에볼라 바이러스 G 단백질; 또는 쉐다이 바이러스 융합 단백질, 또는 이들의 상동체, 이들의 단편, 이들의 변이체, 및 하나 이상의 단백질 또는 이들의 단편을 포함하는 단백질 융합을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0689] 비-포유류 푸소젠은 바이러스 푸소젠, 이의 상동체, 이의 단편, 및 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 바이러스 푸소젠은 클래스 I 푸소젠, 클래스 II 푸소젠, 클래스 III 푸소젠, 및 클래스 IV 푸소젠을 포함한다. 구현예에서, 클래스 I 푸소젠, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스(HIV) gp41은 중심 코일드-코일 구조를 갖는 α-나선형 헤어핀의 시그너처 삼량체를 갖는 특징적인 융합후 형태를 가진다. 클래스 I 바이러스 융합 단백질은 중심 융합후 6-나선 다발을 갖는 단백질을 포함한다. 클래스 I 바이러스 융합 단백질은 인플루엔자 HA, 파라인플루엔자 F, HIV Env, 에볼라 GP, 오르토믹소바이러스로부터의 헤마글루티닌, 파라믹소바이러스로부터의 F 단백질(예를 들어 홍역(문헌[Katoh et al. BMC Biotechnology 2010, 10:37])), 레트로바이러스로부터의 ENV 단백질, 및 필로바이러스와 코로나바이러스의 푸소젠을 포함한다. 구현예에서, 클래스 II 바이러스 푸소젠, 예컨대 뎅기열 E 당단백질은 헤어핀의 삼량체에서 구조를 가진다. 구현예에서, 클래스 II 바이러스 푸소젠은 중심적인 코일드 코일이 결여되어 있다. 클래스 II 바이러스 푸소젠은 알파바이러스(예를 들어 E1 단백질) 및 플라비바이러스(예를 들어 E 당단백질)에서 확인될 수 있다. 클래스 II 바이러스 푸소젠은 셴리키 삼림열 바이러스, 신비스(Sinbis), 풍진 바이러스 및 뎅기열 바이러스로부터의 푸소젠이다. 구현예에서, 클래스 III 바이러스 푸소젠, 예컨대 수포성 구내염 바이러스 G 당단백질은 클래스 I 및 II에서 확인되는 구조적 시그너처를 조합한다. 구현예에서, 클래스 III 바이러스 푸소젠은 클래스 II 바이러스 푸소젠을 연상하게 하는, 양친매성 융합 펩타이드를 이의 말단에 갖는 α 나선(예를 들어 클래스 I 바이러스 푸소젠으로서 단백질을 되접기(fold back) 위해 6-나선 다발을 형성함) 및 β 병풍을 포함한다. 클래스 III 바이러스 푸소젠은 람도바이러스 및 헤르페스바이러스에서 확인될 수 있다. 구현예에서, 클래스 IV 바이러스 푸소젠은 융합-연관 저분자 막관통(FAST) 단백질이며(doi:10.1038/sj.emboj.7600767, 문헌[Nesbitt, Rae L., " Targeted Intracellular Therapeutic Delivery Using Liposomes Formulated with Multifunctional FAST proteins" (2012). Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 388]), 이는 비외피 레오바이러스에 의해 인코딩된다. 구현예에서, 클래스 IV 바이러스 푸소젠은 이들 푸소젠이 헤어핀을 형성하지 않을 정도로 충분히 작다(doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122422, doi:10.1016/j.devcel.2007.12.008).
- [0690] 일부 구현예에서, 푸소젠은 파라믹소바이러스 푸소젠이다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 니파 바이러스 단백질 F, 홍역 바이러스 F 단백질, 투파이아 파라믹소바이러스 F 단백질, 파라믹소바이러스 F 단백질, 헨드라 바이러스 F 단백질, 헤니파바이러스 F 단백질, 모빌리바이러스 F 단백질, 레스피로바이러스 F 단백질, 쉐다이 바이러스 F

단백질, 루블라바이러스 F 단백질, 또는 아블라바이러스 F 단백질이다.

[0691]

일부 구현예에서, 푸소젠은 폭스비리대 푸소젠이다.

[0692]

부가적인 예시적인 푸소젠은 US 9,695,446, US 2004/0028687, US 6,416,997, US 7,329,807, US 2017/0112773, US 2009/0202622, WO 2006/027202 및 US 2004/0009604에 개시되어 있으며, 이들 모두의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0693]

기타 단백질

[0694]

일부 구현예에서, 푸소젠은 pH 의존적(예를 들어 허혈성 상해의 경우에서와 같이) 단백질, 이의 상동체, 이의 단편, 및 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 단백질 융합을 포함할 수 있다. 푸소젠은 세포 표면에서 또는 엔도솜이나 또 다른 세포-막 결합 공간에서 막 융합을 매개할 수 있다.

[0695]

일부 구현예에서, 푸소젠은 EFF-1, AFF-1, 간극 연결 단백질, 예를 들어 코넥신(예컨대 Cn43, GAP43, CX43)(DOI: 10.1021/jacs.6b05191), 다른 종양 연결 단백질, 이들의 상동체, 이들의 단편, 이들의 변이체, 및 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 단백질 융합을 포함한다.

[0696]

단백질 푸소젠에 대한 변형

[0697]

단백질 푸소젠은 융합 단백질 또는 표적화 단백질(예를 들어 헤마글루티닌 단백질)에서 아미노산 잔기를 돌연변이화시킴으로써 재-표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 무작위 돌연변이화된다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 합리적으로 돌연변이화된다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 직접 진화(directed evolution)를 받는다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 절단되고, 펩타이드의 하위세트만 푸소솜에서 사용된다. 예를 들어, 홍역 헤마글루티닌 단백질 내의 아미노산 잔기는 단백질의 결합 특성을 변경시켜, 융합을 전용하도록 돌연변이화될 수 있다(doi:10.1038/nbt942, Molecular Therapy vol. 16 no. 8, 1427-1436 Aug. 2008, doi:10.1038/nbt1060, DOI: 10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002, DOI: 10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001, doi: 10.1073/pnas.0604993103).

[0698]

단백질 푸소젠은 표적화-모이어터를 융합 단백질 또는 표적화 단백질(예를 들어 헤마글루티닌 단백질)에 공유 공액시킴으로써 재-표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소젠 및 표적화 모이어터는 상기 표적화 모이어터에 연결된 푸소젠을 포함하는 키메라 단백질의 발현에 의해 공유 공액된다. 표적은 표적 세포 상에서 제시되는 임의의 펩타이드(예를 들어 수용체)를 포함한다. 일부 예에서, 표적은 비-표적 세포보다 표적 세포 상에서 더 높은 수준으로 발현된다. 예를 들어, 단일 사슬 가변 단편(scFv)은 푸소젠에 공액되어, scFv 결합 표적을 제시하는 세포에 대해 융합 활성을 전용할 수 있다(doi:10.1038/nbt1060, DOI 10.1182/blood-2012-11-468579, doi:10.1038/nmeth.1514, doi:10.1006/mthe.2002.0550, HUMAN GENE THERAPY 11:817-826, doi:10.1038/nbt942, doi:10.1371/journal.pone.0026381, DOI 10.1186/s12896-015-0142-z). 예를 들어, 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 푸소젠에 공액되어, DARPin 결합 표적(doi:10.1038/mt.2013.16, doi:10.1038/mt.2010.298, doi: 10.4049/jimmunol.1500956), 뿐만 아니라 상이한 DARPIn의 조합(doi:10.1038/mto.2016.3)을 제시하는 세포에 대한 융합 활성을 전용할 수 있다. 예를 들어, 수용체 리간드 및 항원은 푸소젠에 공액되어, 표적 수용체를 제시하는 세포에 대한 융합 활성을 전용할 수 있다(DOI: 10.1089/hgtb.2012.054, DOI: 10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002). 표적화 단백질은 또한 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 이황화-연결된 Fv(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb(VL 또는 VH), 나노바디, 또는 카멜리드(camelid) VHH 도메인), 항원-결합 피브로넥틴 III형(Fn3) 스캐폴드, 예컨대 피브로넥틴 폴리펩타이드 미니바디, 리간드, 사이토카인, 케모카인 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함할 수 있다. 단백질 푸소젠은 표적화 모이어터를 융합 단백질 또는 표적화 단백질(예를 들어 헤마글루티닌 단백질)에 비-공유 공액함으로써 재-표적화될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 표적 세포 상의 항원을 표적화하는 항체의 Fc 영역에 결합하도록 조작되어, 항체의 표적을 제시하는 세포에 대한 융합 활성을 전용할 수 있다(DOI: 10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001, doi:10.1038/nm1192). 변경된 푸소젠 및 비-변경된 푸소젠은 동일한 푸소솜 상에서 제시될 수 있다(doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.051).

[0699]

표적화 모이어터는 예를 들어 인간화 항체 분자, 온전한 IgA, IgG, IgE 또는 IgM 항체; 이중특이적 또는 다중특이적 항체(예를 들어 Zybodies® 등); 항체 단편, 예컨대 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 및 이들의 단리된 CDR 또는 세트; 단일 사슬 Fv; 폴리펩타이드-Fc 융합; 단일 도메인 항체(예를 들어 샤크(shark) 단일 도메인 항체, 예컨대 IgNAR 또는 이의 단편); 카멜로이드(cameloid) 항체; 마스크드(masked) 항체(예를 들어 Probodies®); 작은 조정 면역약물("SMIPs™"; Small Modular ImmunoPharmaceuticals); 단일

사슬 또는 탠덤 디아바디(Tandem diabody)(TandAb®); VHH; Anticalins®; Nanobodies®; 미니바디; BiTE®; 안키린 반복 단백질 또는 DARPINs®; Avimers®; DART; TCR-유사 항체; Adnectins®; Affilins®; Trans-bodies®; Affibodies®; TrimerX®; 마이크로단백질; Fynomers®, Centyrins®, 및 KALBITOR®을 포함할 수 있다.

[0700] 구현예에서, 재-표적화된 푸소젠은 표적 세포 상의 세포 표면 마커, 예를 들어 단백질, 당단백질, 수용체, 세포 표면 리간드, 효능제(agonist), 지질, 당, 클래스 I 막관통 단백질, 클래스 II 막관통 단백질, 또는 클래스 III 막관통 단백질에 결합한다.

[0701] 푸소좀은 표적화 모이어티에 의해 결합된 세포에 대한 융합 활성을 전용하거나(redirect) 푸소좀 귀소에 영향을 주기 위해 단백질 푸소젠에 공역되지 않는 표적화 모이어티를 제시할 수 있다.

[0702] 푸소좀에 첨가된 표적화 모이어티는 상이한 결합 강도를 갖도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 다양한 결합 강도를 갖는 scFv 및 항체는 높거나 낮은 양의 표적 항원을 제시하는 세포에 대한, 푸소좀의 융합 활성을 변경시키는 데 사용될 수 있다(doi:10.1128/JVI.01415-07, doi:10.1038/cgt.2014.25, DOI: 10.1002/jgm.1151). 예를 들어, 상이한 친화성을 갖는 DARPIn은 높거나 낮은 양의 표적 항원을 제시하는 세포에 대한, 푸소좀의 융합 활성을 변경시키는 데 사용될 수 있다(doi:10.1038/mt.2010.298). 표적화 모이어티는 또한, 표적 리간드 상의 상이한 영역을 표적화하도록 조정될 수 있으며, 이는 표적을 제시하는 세포와의 융합율에 영향을 줄 것이다(doi:10.1093/protein/gzv005).

[0703] 일부 구현예에서, 단백질 푸소젠은 면역반응성을 감소시키도록 변경될 수 있다. 예를 들어, 단백질 푸소젠은 면역 상호작용을 감소시키는 분자, 예컨대 PEG로 장식될 수 있다(DOI: 10.1128/JVI.78.2.912-921.2004). 따라서, 일부 구현예에서, 푸소젠은 PEG를 포함하며, 예를 들어 PEG화된 폴리펩타이드이다. 면역계에 의해 표적화되는 푸소젠 내 아미노산 잔기는 상기 면역계에 의해 인지되지 않도록 변경될 수 있다(doi:10.1016/j.virol.2014.01.027, doi:10.1371/journal.pone.0046667). 일부 구현예에서, 푸소젠의 단백질 서열은 인간에서 확인되는 아미노산 서열을 닮도록(인간화되도록) 변경된다. 일부 구현예에서, 푸소젠의 단백질 서열은 MHC 복합체를 덜 강하게 결합시키는 단백질 서열로 변한다. 일부 구현예에서, 단백질 푸소젠은 인간을 감염시키지 않는 바이러스 또는 유기체로부터 유래되어(및 인간이 이에 대해 백신화되지 않았음), 환자의 면역계가 단백질 푸소젠에 미접촉인 가능성을 증가시킨다(예를 들어 푸소젠에 대한 무시할 만한 체액성 또는 세포-매개 적응성 면역 반응이 존재함)(doi:10.1006/mthe.2002.0550, doi:10.1371/journal.ppat.1005641, doi:10.1038/gt.2011.209, DOI 10.1182/blood-2014-02-558163). 일부 구현예에서, 푸소젠의 글리코실화는 면역 상호작용을 변경하거나 면역반응성을 감소시키도록 변할 수 있다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 인간을 감염시키지 않는 바이러스 또는 유기체로부터 유래된 단백질 푸소젠은 환자에서 천연 융합 표적을 갖지 않으며, 따라서 높은 특이성을 가진다.

[0704] 지질 푸소젠

[0705] 일부 구현예에서, 푸소좀은 푸소젠성 지질, 예컨대 포화된 지방산으로 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 포화된 지방산은 10~14개의 탄소를 가진다. 일부 구현예에서, 포화된 지방산은 더 긴 카르복실산을 가진다. 일부 구현예에서, 포화된 지방산은 모노-에스테르이다.

[0706] 일부 구현예에서, 푸소좀은 불포화된 지방산으로 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 불포화된 지방산은 C16 내지 C18 불포화된 지방산을 가진다. 일부 구현예에서, 불포화된 지방산은 올레산, 글리세롤 모노-올레에이트, 글리세라이드, 디아실글리세롤, 변형된 불포화된 지방산 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0707] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 음성 곡률(negative curvature) 지질은 막 융합을 촉진한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 하나 이상의 음성 곡률 지질, 예를 들어 외인성 음성 곡률 지질을 막에 포함한다. 구현예에서, 음성 곡률 지질 또는 이의 전구체는 공급원 세포 또는 푸소좀을 포함하는 배지에 첨가된다. 구현예에서, 공급원 세포는 하나 이상의 지질 합성 유전자를 발현하거나 과발현하도록 조작된다. 음성 곡률 지질은 예를 들어 디아실글리세롤(DAG), 콜레스테롤, 포스파티드산(PA), 포스파티딜에탄올아민(PE), 또는 지방산(FA)일 수 있다.

[0708] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 양성 곡률 지질은 막 융합을 저해한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 막에서 하나 이상의 양성 곡률 지질, 예를 들어 외인성 양성 곡률 지질의 감소된 수준을 포함한다. 구현예에서, 수준은 공급원 세포에서 지질의 합성을 예를 들어 지질 합성 유전자의 녹아웃 또는 녹다운에 의해 저해함으로써 감소된다. 양성 곡률 지질은 예를 들어 리소포스파티딜콜린(LPC), 포스파티딜이노시톨

(PtdIns), 리소포스파티드산(LPA), 리소포스파티딜에탄올아민(LPE), 또는 모노아실글리세롤(MAG)일 수 있다.

[0709] 화학적 푸소젠

[0710] 일부 구현예에서, 푸소좀은 푸소젠 화학물질로 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소젠 화학물질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 이의 유도체이다.

[0711] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 이중층의 바람직하지 못한 분자 패킹을 초래하는, 2개 막 사이에서의 국소 탈수를 유도한다. 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 지질 이중층 부근의 영역의 탈수를 유도하여, 세포 사이에서 수성 분자의 변위(displacement)를 유발하고 2개의 막 사이에서 상호작용을 함께 허용한다.

[0712] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 양성 양이온성이다. 양성 양이온의 일부 비제한적인 예는 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , La^{3+} , Sr^{3+} , 및 H^{+} 를 포함한다.

[0713] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 표면 극성을 변형시킴으로써 표적 막에 결합하며, 이는 수화-의존적 막간 반발을 변경시킨다.

[0714] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 가용성 지질 가용성이다. 일부 비제한적인 예는 올레오일글리세롤, 디올레오일글리세롤, 트리올레오일글리세롤, 및 이들의 변이체와 유도체를 포함한다.

[0715] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 물-가용성 화학물질이다. 일부 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜, 디메틸 설펍사이드 및 이들의 변이체와 유도체를 포함한다.

[0716] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 작은 유기 분자이다. 비제한적인 예는 n-헥실 브로마이드를 포함한다.

[0717] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 푸소젠 또는 표적 막의 구성, 세포 생존율 또는 이온 수송 특성을 변경시키지 않는다.

[0718] 일부 구현예에서, 화학적 푸소젠은 호르몬 또는 비타민이다. 일부 비제한적인 예는 아브시스산, 레티놀(비타민 A1), 토코페롤(비타민 E), 및 이들의 변이체와 유도체를 포함한다.

[0719] 일부 구현예에서, 푸소좀은 액틴, 및 중합된 액틴을 안정화시키는 작용제를 포함한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 푸소좀 내 안정화된 액틴은 표적 세포와의 융합을 촉진할 수 있다. 구현예에서, 중합된 액틴을 안정화시키는 작용제는 액틴, 미오신, 비오틴-스트렙타비딘, ATP, 뉴턴 비스코트-올드리치 중후군 단백질(N-WASP), 또는 포르민으로부터 선택된다. 예를 들어 문헌[Langmuir. 2011 Aug 16;27(16):10061-71 및 Wen et al., Nat Commun. 2016 Aug 31;7]을 참조한다. 구현예에서, 푸소좀은 외인성 액틴, 예를 들어 야생형 액틴, 또는 중합을 촉진하는 돌연변이를 포함하는 액틴을 포함한다. 구현예에서, 푸소좀은 ATP 또는 포스포크레아틴, 예를 들어 외인성 ATP 또는 포스포크레아틴을 포함한다.

[0720] 저분자 푸소젠

[0721] 일부 구현예에서, 푸소좀은 푸소젠 저분자로 처리될 수 있다. 일부 비제한적인 예는 할로탄, 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 예컨대 멜록시캄, 피록시캄, 테녹시캄 및 클로르프로마진을 포함한다.

[0722] 일부 구현예에서, 저분자 푸소젠은 미셀-유사 응집물에 존재할 수 있거나 응집물이 없을 수 있다.

[0723] 푸소젠 변형

[0724] 일부 구현예에서, 푸소젠은 절단 가능한 단백질에 연결된다. 일부 경우에, 절단 가능한 단백질은 프로테아제에 노출됨으로써 절단될 수 있다. 조작된 융합 단백질은 막관통 단백질의 임의의 도메인에 결합할 수 있다. 조작된 융합 단백질은 막간 공간 내에 위치한 단백질 도메인에 절단 펩타이드에 의해 연결될 수 있다. 절단 펩타이드는 막간 프로테아제(예를 들어 P1 위치에서 비-극성 지방족 아미노산 - 발린, 이소류신 또는 메티오닌이 바람직함 - 을 필요로 하고, P2 및 P3 위치에서 친수성 잔기 - 아르기닌이 바람직함 - 을 필요로 하는 HTRA2/OMI) 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 절단될 수 있다.

[0725] 일부 구현예에서, 푸소젠은 친화성 태그에 연결된다. 일부 구현예에서, 친화성 태그는 푸소좀 분리 및 단리에 일조한다. 일부 구현예에서, 친화성 태그는 절단 가능하다. 일부 구현예에서, 친화성 태그는 푸소젠에 비-공유 연결된다. 일부 구현예에서, 친화성 태그는 푸소젠 상에 존재하고, 푸소젠으로부터 분리된다.

[0726] 일부 구현예에서, 푸소젠 단백질은 단백질해성 분해 서열, 예를 들어 미토콘드리아 또는 세포기질 분해 서열을 포함하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법 또는 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 조작된다. 푸소젠 단백질

은 비제한적으로 단백분해성 분해 서열, 예를 들어 카스파제 2 단백질 서열(예를 들어 Val-Asp-Val-Ala-Asp-|-) 또는 다른 단백분해성 서열(예를 들어 문헌[Gasteiger et al., The Proteomics Protocols Handbook; 2005: 571-607] 참조), 야생형 단백분해성 분해 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상의 동일성을 갖는 변형된 단백분해성 분해 서열, 세포기질 단백분해성 분해 서열, 예를 들어 유비퀴틴, 또는 야생형 단백분해성 분해 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상의 동일성을 갖는 변형된 세포기질 단백분해성 분해 서열을 포함하도록 조작될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 예를 들어 야생형 단백분해성 분해 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상의 동일성을 갖는 단백분해성 분해 서열, 세포기질 단백분해성 분해 서열, 예를 들어 유비퀴틴, 또는 야생형 단백분해성 분해 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상의 동일성을 갖는 변형된 세포기질 단백분해성 분해 서열로 변형된 단백질을 포함하는 공급원 또는 콘드리움 내의 미토콘드리아의 조성물을 포함한다.

[0727] 일부 구현예에서, 푸소젠은 특이적인 단백질, 예를 들어 프로테아제의 과발현, 예를 들어 프로테아제 활성을 갖는 조작된 융합 단백질을 인지하는 프로테아제 도메인으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 프로테아제 또는 프로테아제, 예컨대 MMP, 미토콘드리아 가공 펩티다제, 미토콘드리아 중간 펩티다제, 내막 펩티다제로부터의 프로테아제 도메인이다.

[0728] 문헌[Alfonzo, J.D. & Soll, D. Mitochondrial tRNA import - the challenge to understand has just begun. Biological Chemistry 390: 717-722. 2009; Langer, T. et al. Characterization of Peptides Released from Mitochondria. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 280, No. 4. 2691-2699, 2005; Vlieghe, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today. 15(1/2). 2010; Quiros P.M.m et al., New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology. V16, 2015; Weber-Lotfi, F. et al. DNA import competence and mitochondrial genetics. Biopolymers and Cell. Vol. 30. N 1. 71-73, 2014]를 참조한다.

[0729] 푸소좀 발생

[0730] 세포로부터 발생된 푸소좀

[0731] 푸소좀의 조성물은 배양물 내의 세포, 예를 들어 배양된 포유류 세포, 예를 들어 배양된 인간 세포로부터 발생될 수 있다. 세포는 전구 세포 또는 비-전구(예를 들어 분화된) 세포일 수 있다. 세포는 일차 세포 또는 세포주(예를 들어 본원에 기재된 포유류, 예를 들어 인간 세포주)일 수 있다. 구현예에서, 배양된 세포는 전구 세포, 예를 들어 골수 기질 세포, 골수 유래 성인 전구 세포(MAPC), 내피 전구 세포(EPC), 아세포, 뇌실하대(subventricular zone)에서 형성된 중간 전구 세포, 신경 줄기세포, 근육 줄기세포, 위성 세포, 간 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 골수 기질 세포, 상피 줄기세포, 배아 줄기세포, 간엽 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 전구 세포, 근육 전구 세포, 근아세포, 심장근아세포, 신경 전구 세포, 신경교 전구 세포, 뉴런 전구 세포, 간아세포이다.

[0732] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 내피 세포, 섬유아세포, 혈액 세포(예를 들어 대식세포, 호중구, 과립구, 백혈구), 줄기세포(예를 들어 간엽 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 골수 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 예를 들어 대상체의 세포로부터 유래된 유도 만능 줄기세포), 배아 줄기세포(예를 들어 난황 주머니, 태반, 제대혈, 태아 피부, 성인 피부, 혈액, 골수, 지방 조직, 적혈구생성 조직, 조혈모 조직으로부터의 줄기세포), 근아세포, 실질 세포(예를 들어 간세포), 폐포 세포, 뉴런(예를 들어 망막 신경 세포) 전구 세포(예를 들어 망막 전구 세포, 골수아세포, 골수 전구 세포, 흥선 세포, 감수분열 모세포, 거대핵모세포, 쫓겨대핵모세포, 멜라닌모세포, 림프아세포, 골수 전구 세포, 정적아구, 또는 혈관모세포), 전구 세포(예를 들어 심장 전구 세포, 위성 세포, 방사 신경교 세포, 골수 기질 세포, 췌장 전구 세포, 내피 전구 세포, 아세포), 또는 불멸화된 세포(예를 들어 HeLa, HEK293, HFF-1, MRC-5, WI-38, IMR 90, IMR 91, PER.C6, HT-1080, 또는 BJ 세포)이다.

[0733] 배양된 세포는 상피, 결합, 근육 또는 신경 조직 또는 세포, 및 이들의 조합으로부터의 것일 수 있다. 푸소좀은 임의의 진행(예를 들어 포유류) 기관계, 예를 들어, 심혈관계(심장, 맥관구조); 소화계(식도, 위, 간, 담낭, 췌장, 장, 결장, 직장 및 항문); 내분비계(시상하부, 뇌하수체, 송과체 또는 송과선, 갑상선, 부갑상선, 부신); 배설(신장, 수뇨관, 방광); 림프계(림프, 림프절, 림프관, 편도선, 아데노이드, 흉선, 비장); 외피계(integumentary system)(피부, 모발, 손발톱); 근육계(예를 들어 골격근); 신경계(뇌, 척수, 신경); 생식계(난소, 자궁, 유선, 고환, 수정관, 정낭, 전립선); 호흡계(인두, 후두, 기관, 기관지, 폐, 횡격막); 골격계(뼈, 연골) 및 이들의 조합으로부터의 배양된 세포로부터 발생될 수 있다. 구현예에서, 세포는 고도로 체세포분열성 조직(예를 들어 고도로 체세포분열성 건강한 조직, 예컨대 상피, 배아 조직, 골수, 장 움(intestinal crypt))으로

부터의 것이다. 구현예에서, 조직 시료는 고도로 대사성 조직(예를 들어 골격 조직, 신경 조직, 심근세포)이다.

- [0734] 일부 구현예에서, 세포는 젊은 공여자, 예를 들어 공여자 25세, 20세, 18세, 16세, 12세, 10세, 8세, 5세, 1세 이하의 공여자로부터의 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 태아 조직으로부터의 것이다.
- [0735] 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 유래되고, 동일한 대상체 또는 유사한 유전적 시그니처(예를 들어 MHC-매칭)를 갖는 대상체에게 투여된다.
- [0736] 소정의 구현예에서, 세포는 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 또는 10000개 초과 뉴클레오타이드 길이(예를 들어 4,000~10,000개 뉴클레오타이드 길이, 6,000~10,000개 뉴클레오타이드 길이)의 평균 크기의 텔로미어를 가진다.
- [0737] 푸소좀은 일반적으로 당업계에 공지된 방법에 따라 배양된 세포로부터 발생될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 2개 이상의 "기(phase)", 예를 들어 세포가 배양물의 바이오매스를 배가시키고(multiply) 증가시키는 조건 하에서 배양되는 성장기, 및 세포가 세포 표현형을 변경시키는(예를 들어 미토콘드리아 표현형을 최대화시키며, 미토콘드리아의 수 또는 크기를 증가시키며, 산화적 인산화 상태를 증가시키는) 조건 하에 배양되는 "생성" 기에서 배양될 수 있다. 세포가 세포막 상에서 단백질 푸소젠 또는 외인성 작용제의 발현을 최대화시키고 다른 기에서 원치 않는 용해를 제약시키는 조건 하에 배양되는 "발현" 기가 또한 존재할 수 있다.
- [0738] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 성장기 또는 생성기 동안에 동기발생하는(synchronized) 세포로부터 발생된다. 예를 들어, 세포는 배양 배지로부터의 혈청의 제거에 의해(예를 들어 약 12~24시간 동안) 또는 배양 배지에서 DNA 합성 저해제, 예컨대 티미딘, 아미노프테린, 하이드록시우레아 및 시토신 아리비노사이드의 사용에 의해 G1 기에서 동기발생될 수 있다. 포유류 세포 주기 동기화(synchronization)를 위한 부가적인 방법은 예를 들어 문헌[Rosner et al. 2013. Nature Protocols 8:602-626(구체적으로 Rosner에서 표 1)]에 공지되어 있고 개시되어 있다.
- [0739] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물에 대한 공급원으로서 사용하기에 바람직한 표현형 또는 유전자형에 대해 평가되고 선택적으로 농화될 수 있다. 예를 들어, 세포는 예를 들어 배양 전에, 배양 동안에(예를 들어 성장기 또는 생성기 동안에) 또는 배양 후이지만 푸소좀 생성 전에, 예를 들어 하기 중 하나 이상에 대해 평가되고 선택적으로 농화될 수 있다: 막 전위(예를 들어 -5 내지 -200 mV의 막 전위; 카디오리핀 함량(예를 들어 총 지질의 1~20%); 콜레스테롤, 포스파티딜에탄올아민(PE), 디글리세라이드(DAG), 포스파티드산(PA), 또는 지방산(FA) 함량; 유전적 품질 > 80%, >85%, > 90%; 푸소젠 발현 또는 함량; 적재물 발현 또는 함량.
- [0740] 일부 구현예에서, 푸소좀은 본원에 기재된 푸소좀 조성물에 대한 공급원으로서 사용하기에 바람직한 표현형 또는 유전자형을 기초로 식별되거나, 선택되거나 선별된 세포 클론으로부터 발생된다. 예를 들어, 세포 클론은 낮은 미토콘드리아 돌연변이 로드, 긴 텔로미어 길이, 분화 상태, 또는 특정한 유전적 시그니처(예를 들어 수여자를 매칭시키기 위한 유전적 시그니처)를 기초로 식별되거나, 선택되거나 선별된다.
- [0741] 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 하나의 세포 또는 조직 공급원으로부터의 푸소좀 또는 공급원들의 조합으로부터의 푸소좀으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 푸소좀 조성물은 이중성 공급원(예를 들어 동물, 상기 언급된 종의 세포의 조직 배양물), 동종이계, 자가로부터의 푸소좀, 상이한 단백질 농도 및 분포를 초래하는 특이적인 조직(간, 골격, 신경, 지방 등)으로부터의 푸소좀, 상이한 대사 상태(예를 들어 당분해성, 호흡)의 세포로부터의 푸소좀을 포함할 수 있다. 조성물은 또한, 본원 어디에서나 기재된 바와 같이, 상이한 대사 상태, 예를 들어 커플링 또는 언커플링에서의 푸소좀을 포함할 수 있다.
- [0742] 일부 구현예에서, 푸소좀은 푸소젠, 예를 들어 본원에 기재된 푸소젠을 발현하는 공급원 세포로부터 발생된다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 공급원 세포의 막, 예를 들어 지질 이중층 막, 예를 들어 세포 표면 막 또는 아세포성 막(예를 들어 리소좀 막)에 배치된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포 표면 막에 배치된 푸소젠과 함께 공급원 세포로부터 발생된다.
- [0743] 일부 구현예에서, 푸소좀은 엑소좀, 미세소낭, 막 소낭, 세포외 막 소낭, 형질막 소낭, 거대 형질막 소낭, 세포자멸사 바디, 미토파자, 피레노사이트(pyrenocyte), 리소좀, 또는 다른 막-밀폐 소낭의 출아를 유도함으로써 발생된다.
- [0744] 일부 구현예에서, 푸소좀을 생성하는 단계는 공급원 세포에 대해 이중성 또는 내인성 단백질의 발현을 상향조절하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 형질막으로부터의 푸소좀 방출을 상향조절한다. 일부 구현

예에서, 단백질은 바이러스 구조 단백질, 예를 들어 바이러스 Gag 단백질, 매트릭스 단백질, 캡시드 단백질, 또는 뉴클레오캡시드 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 바이러스 후기 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 인간 게놈에 의해 인코딩되는 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 ESCRT 경로를 고용한다(engage). 일부 구현예에서, 단백질은 ESCRT-1을 고용한다. 일부 구현예에서, 단백질은 Tsg101을 고용한다. 일부 구현예에서, 단백질은 푸소좀 내로 혼입된다. 일부 구현예에서, 단백질은 푸소좀 내로 혼입되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질은 어레스틴이다. 일부 구현예에서, 단백질은 ARRD1이다. 일부 구현예에서, TSG101은 부모 세포 또는 엑소좀보다 푸소좀에서 더 큰 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준은 푸소좀에서 적어도 약 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.004%, 0.005%, 0.006%, 또는 0.007%이다. 일부 구현예에서, ARRD1은 부모 세포 또는 엑소좀보다 푸소좀에서 더 큰 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRD1의 수준은 푸소좀에서 적어도 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 또는 0.05% 일 것이다. 일부 구현예에서, 단백질은 ESCRT-1, Nedd4 과 유비퀴틴 리가제, 예컨대 WWP2, 또는 Alix를 동원하는 PSAP, PTAP, PPxY, 또는 YPxL 모티프를 함유한다. 예를 들어, 이러한 단백질은 US9737480B2, 문헌 [Scourfield and Martin-Serrano, *Biochemical Society Transactions* 2017, Zhadina and Bieniasz, *PLoS Pathogens* 2010]에 기재되어 있고, 이들은 모두 참조에 의해 포함된다.

- [0745] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포 제핵을 유도함으로써 발생된다. 제핵은 검정법, 예컨대 유전적, 화학적(예를 들어 액티노마이신 D를 사용하며, 문헌[Bayona-Bafaluyet al., "A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to p⁰ cells" *Nucleic Acids Res.* 2003 Aug 15; 31(16): e98] 참조), 기계적 방법(예를 들어 압착(squeezing) 또는 흡인, 문헌[Lee et al., "A comparative study on the efficiency of two enucleation methods in pig somatic cell nuclear transfer: effects of the squeezing and the aspiration methods." *Anim Biotechnol.* 2008;19(2):71-9] 참조), 또는 이들의 조합을 사용하여 수행될 수 있다. 제핵은, 세포가 핵을 함유하지만 이 핵이 비-기능성이 되도록 핵의 완전한 제거뿐만 아니라 핵의 전형적인 위치로부터 핵의 변위를 지칭한다.
- [0746] 구현예에서, 푸소좀을 제조하는 단계는 세포 고스트, 거대 형질막 소낭 또는 세포자멸사 바디를 생성하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 푸소좀 조성물은 세포 고스트, 거대 형질막 소낭 및 세포자멸사 바디 중 하나 이상을 포함한다.
- [0747] 일부 구현예에서, 푸소좀은 세포 단편화를 유도함으로써 발생된다. 일부 구현예에서, 세포 단편화는 비제한적으로 하기 방법을 사용하여 수행될 수 있다: 화학적 방법, 기계적 방법(예를 들어 원심분리(예를 들어 초원심분리, 또는 밀도 원심분리), 냉동-해동, 또는 초음파처리) 또는 이들의 조합.
- [0748] 일 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 푸소좀을 발현하는 공급원 세포로부터 예를 들어 하기 방법 중 임의의 하나, 모두 또는 조합에 의해 발생될 수 있다:
- [0749] i) 미토입자, 엑소좀, 또는 다른 막-밀폐 소낭의 출아를 유도함;
- [0750] ii) 하기 방법 또는 이들의 조합 중 임의의 하나에 의해 핵 불활성화, 예를 들어 제핵을 유도함:
- [0751] a) 유전적 방법;
- [0752] b) 예를 들어 액티노마이신 D를 사용하는 화학적 방법; 또는
- [0753] c) 기계적 방법, 예를 들어 압착 또는 흡인; 또는
- [0754] iii) 세포 단편화를 예를 들어 하기 방법 또는 이들의 조합 중 임의의 방법에 의해 유도함:
- [0755] a) 화학적 방법;
- [0756] b) 기계적 방법, 예를 들어 원심분리(예를 들어 초원심분리 또는 밀도 원심분리); 냉동 해동; 또는 초음파처리.
- [0757] 의심의 여지를 없애기 위해, 많은 경우, 푸소좀을 제조하는 데 실제로 사용되는 공급원 세포는 푸소좀이 제조된 후 시험에 이용 가능하지 않을 것으로 이해된다. 따라서, 공급원 세포와 푸소좀 사이의 비교는, 푸소좀을 제조하기 위해 실제로 변형된(예를 들어 제핵된) 공급원 세포를 검정하는 것을 필요로 하지 않는다. 그보다는, 예를 들어 동일한 배양물, 동일한 유전자형 동일한 조직 유형 또는 이들의 임의의 조합으로부터의 공급원 세포와 다르게 유사한 세포는 대신에 검정될 수 있다.
- [0758] 푸소좀 발생 전에 세포에 대한 변형

- [0759] 일 양태에서, 변형은 푸소좀 발생 전에 세포에 대해 이루어지며, 대상체, 조직 또는 세포의 변형이다. 이러한 변형은 예를 들어 융합, 푸소젠 발현 또는 활성화, 적재물의 구조 또는 기능, 또는 표적 세포의 구조 또는 기능을 향상시키기에 효과적일 수 있다.
- [0760] 물리적 변형
- [0761] 일부 구현예에서, 세포는 푸소좀을 발생시키기 전에 물리적으로 변형된다. 예를 들어, 본원 어디에서나 기재된 바와 같이, 푸소젠은 세포의 표면에 연결될 수 있다.
- [0762] 일부 구현예에서, 세포는 푸소좀을 발생시키기 전에 화학제로 처리된다. 예를 들어, 세포는 화학적 또는 지질 푸소젠으로 처리될 수 있으며, 따라서, 화학적 또는 지질 푸소젠은 세포의 표면과 비-공유 또는 공유 상호작용 하거나 세포의 표면 내에 포매된다. 일부 구현예에서, 세포는 세포막 내에서 지질의 푸소젠 특성을 증강시키기 위해 작용제로 처리된다.
- [0763] 일부 구현예에서, 세포는 푸소좀을 발생시키기 전에, 기관, 조직 또는 세포-유형으로의 푸소좀의 표적화를 증강시키는, 세포 표면 상의 합성 또는 내인성 저분자 또는 지질에 대한 하나 이상의 공유 또는 비-공유 부착 부위를 이용하여 물리적으로 변형된다.
- [0764] 구현예에서, 푸소좀은 증가된 또는 저하된 수준의 내인성 분자를 포함한다. 예를 들어, 푸소좀은 천연 발생 공급원에서, 그러나 푸소좀에서보다 더 높거나 더 낮은 수준으로 천연적으로 발생하기도 하는 내인성 분자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 공급원 세포 또는 푸소좀 내의 외인성 핵산으로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 공급원으로부터 단리되고, 공급원 세포 또는 푸소좀 내로 로딩되거나 이에 공액된다.
- [0765] 일부 구현예에서, 세포는 세포에서 내인성 푸소젠의 발현 또는 활성을 증가시키기 위해 푸소좀의 발생 전에 화학제로 처리된다. 일 구현예에서, 저분자는 내인성 푸소젠의 전사 활성자의 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 저분자는 내인성 푸소젠의 전사 억제자의 발현 또는 활성을 저하시킬 수 있다. 보다 다른 구현예에서, 저분자는 내인성 푸소젠의 발현을 증가시키는 후성적 변형자이다.
- [0766] 일부 구현예에서, 푸소좀은 융합 억제 화합물, 예를 들어 리소포스파티딜콜린으로 처리된 세포로부터 발생된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 푸소젠을 절단하지 않는 해리 시약, 예를 들어 아큐타제(Accutase)로 처리된 세포로부터 발생된다.
- [0767] 일부 구현예에서, 세포는 푸소젠의 농도를 더하거나 증가시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 예를 들어 CRISPR 활성자로 물리적으로 변형된다.
- [0768] 일부 구현예에서, 세포는 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아, 골지체, 소포체, 세포내 소낭(예컨대 리소좀, 자가포식소체)의 양을 증가시키거나 저하시키거나, 이의 구조 또는 기능을 증강시키기 위해 물리적으로 변형된다.
- [0769] 유전적 변형
- [0770] 일부 구현예에서, 세포는 세포에서 내인성 푸소젠의 발현을 증가시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 변형된다. 일 구현예에서, 유전적 변형은 내인성 푸소젠의 전사 활성자의 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 유전적 변형은 내인성 푸소젠의 전사 억제자의 발현 또는 활성을 저하시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 활성자 또는 억제자는, 가이드 RNA에 의해 내인성 푸소젠으로 표적화되는 전사 활성자 또는 억제자에 연결된 뉴클레아제-불활성 cas9(dCas9)이다. 보다 다른 구현예에서, 유전적 변형은 내인성 푸소젠 유전자의 발현을 증가시키기 위해 상기 유전자를 후성적으로 변형시킨다. 일부 구현예에서, 후성적 활성자는, 가이드 RNA에 의해 내인성 푸소젠으로 표적화되는 후성적 변형자에 연결된 뉴클레아제-불활성 cas9(dCas9)이다.
- [0771] 일부 구현예에서, 세포는 세포에서 외인성 푸소젠의 발현, 예를 들어 이식유전자의 전달을 증가시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 핵산, 예를 들어 DNA, mRNA 또는 siRNA는 예를 들어 기관, 조직 또는 세포 표적화에 사용되는 세포 표면 분자(단백질, 글리칸, 지질 또는 저분자량 분자)의 발현을 증가시키거나 저하시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 세포로 이송된다. 일부 구현예에서, 핵산은 푸소젠의 억제자, 예를 들어 shRNA, siRNA 구축물을 표적화한다. 일부 구현예에서, 핵산은 푸소젠 억제자의 저해제를 인코딩한다.
- [0772] 일부 구현예에서, 상기 방법은 푸소젠을 인코딩하는 외인성 핵산을 공급원 세포 내로 도입하는 단계를

포함한다. 외인성 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 DNA는 선형 DNA, 원형 DNA, 또는 인공 염색체일 수 있다. 일부 구현예에서, DNA는 에피솜적으로 유지된다. 일부 구현예에서, DNA는 게놈 내로 통합된다. 외인성 RNA는 화학적으로 변형된 RNA일 수 있으며, 예를 들어 하나 이상의 백본 변형, 당 변형, 비-캐노니컬 염기(noncanonical base) 또는 캡(cap)을 포함할 수 있다. 백본 변형은 예를 들어 포스포로티오에이트, N3'-포스포라미다이트, 보라노스포에이트, 포스포노아세테이트, 티오-PACE, 모르폴리노 포스포라미다이트, 또는 PNA를 포함한다. 당 변형은 예를 들어 2'-O-Me, 2'F, 2'F-ANA, LNA, UNA 및 2'-O-MOE를 포함한다. 비-캐노니컬 염기는 예를 들어 5-브로모-U, 및 5-요오도-U, 2,6-디아미노퓨린, C-5 프로피닐 피리미딘, 디플루오로톨루엔, 디플루오로벤젠, 디클로로벤젠, 2-티오우리딘, 슈도우리딘 및 디하이드로우리딘을 포함한다. 캡은 예를 들어 ARCA를 포함한다. 부가적인 변형은 예를 들어 문헌[Deleavey et al., "Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing" Chemistry & Biology Volume 19, Issue 8, 24 August 2012, Pages 937-954]에서 고찰되어 있으며, 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0773] 일부 구현예에서, 세포는 세포에서 외인성 푸소젠의 발현 또는 활성을 증가시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 화학제로 처리된다. 일 구현예에서, 저분자는 외인성 푸소젠의 전사 활성자의 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 저분자는 외인성 푸소젠의 전사 억제자의 발현 또는 활성을 저하시킬 수 있다. 보다 다른 구현예에서, 저분자는 외인성 푸소젠의 발현을 증가시키는 후성적 변형자이다.

[0774] 일부 구현예에서, 핵산은 변형된 푸소젠을 인코딩한다. 예를 들어, 조절 가능한 푸소젠 활성, 예를 들어 특이적인 세포-유형, 조직-유형 또는 국소 미세환경 활성을 갖는 푸소젠이다. 이러한 조절 가능한 푸소젠 활성은 낮은 pH, 높은 pH, 열, 적외선, 세포의 효소 활성(진핵 또는 원핵), 또는 저분자, 단백질 또는 지질의 노출에 의한 푸소젠 활성의 활성화 및/또는 개시를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 저분자, 단백질 또는 지질은 표적 세포 상에서 제시된다.

[0775] 일부 구현예에서, 세포는 신호전달 경로(예를 들어 Wnt/베타-카테닌 경로)의 발현을 변경시키기 위해(즉, 상향조절하거나 하향조절하기 위해), 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 세포는 관심 유전자 또는 유전자들의 발현을 변경시키기 위해(즉, 상향조절하거나 하향조절하기 위해), 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 세포는 관심 핵산 또는 핵산들(예를 들어 miRNA 또는 mRNA)의 발현을 변경시키기 위해(즉, 상향조절하거나 하향조절하기 위해), 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 핵산, 예를 들어 DNA, mRNA 또는 siRNA는 예를 들어 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산의 발현을 증가시키거나 저하시키기 위해, 푸소좀을 발생시키기 전에 세포로 이송된다. 일부 구현예에서, 핵산은 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산의 억제자를 표적화하거나, 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산을 억제시킨다. 일부 구현예에서, 핵산은 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산을 상향조절하거나 하향조절하는 전사 인자를 인코딩한다. 일부 구현예에서, 활성자 또는 억제자는 가이드 RNA에 의해 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산으로 표적화되는 전사 활성자 또는 억제자에 연결된 뉴클레아제-불활성 cas9(dCas9)이다. 보다 다른 구현예에서, 유전적 변형은 내인성 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산을 이의 발현에 대해 후성적으로 변형시킨다. 일부 구현예에서, 후성적 활성자는 가이드 RNA에 의해 신호전달 경로, 유전자 또는 핵산으로 표적화되는 후성적 변형자에 연결된 뉴클레아제-불활성 cas9(dCas9)이다. 일부 구현예에서, 세포의 DNA는 신호전달 경로(예를 들어 Wnt/베타-카테닌 경로), 유전자 또는 핵산의 발현을 변경시키기 위해(즉, 상향조절하거나 하향조절하기 위해), 푸소좀을 발생시키기 전에 유전적으로 편집된다. 일부 구현예에서, DNA는 가이드 RNA 및 CRISPR-Cas9/Cpf1 또는 다른 유전자 편집 기술을 사용하여 편집된다.

[0776] 세포는 재조합 방법을 사용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 요망되는 유전자를 코딩하는 핵산 서열은 재조합 방법을 사용하여, 예를 들어 표준 기술을 사용하여, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 유전자를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 상기 유전자를 유도함으로써, 또는 유전자를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접적으로 단리함으로써 수득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 클로닝되기 보다는 합성적으로 생성될 수 있다.

[0777] 천연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로, 관심 유전자를 인코딩하는 핵산을 프로모터에 작동적으로 연결하고, 구축물을 발현 벡터 내로 혼입함으로써 달성된다. 벡터는 진핵세포에서 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 요망되는 핵산 서열의 발현에 유용한 프로모터를 함유한다.

[0778] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 발현 영역, 예를 들어 유전자를 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 유전자(예를 들어 외인성 유전자 생성물, 예컨대 RNA 또는 폴리펩타이드 생성물

을 발현할 수 있음) 및/또는 외인성 조절 핵산을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 표적 세포에 대해 내인성인 유전자 생성물을 인코딩하는 외인성 서열 및/또는 내인성 유전자의 발현을 조절할 수 있는 외인성 조절 핵산을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 유전자 및/또는 외인성 유전자의 발현을 조정하는 조절 핵산을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 유전자 및/또는 내인성 유전자의 발현을 조정하는 조절 핵산을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 당업자는, 본원에 기재된 세포가, 예를 들어 표적 세포의 내인성 또는 외인성 계통의 유전자 생성물에 작용할 수 있는 단백질 또는 조절 분자를 인코딩하는 여러 가지 외인성 유전자를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 유전자는 푸소좀에 특징을 부여하며, 예를 들어 표적 세포와의 융합을 조정한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 내인성 유전자 및/또는 조절 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자 또는 조절 핵산은 다른 내인성 유전자의 발현을 조정한다. 일부 구현예에서, 세포는 다른 염색체 상의 내인성 유전자 및/또는 조절 핵산의 버전보다 상이하게(예를 들어 유도적으로, 조직-특이적으로, 구성적으로, 또는 더 높거나 더 낮은 수준에서) 발현되는 내인성 유전자 및/또는 조절 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다.

[0779] 프로모터 요소, 예를 들어 인헨서는 전사 개시 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들 프로모터 요소는 출발 부위의 30~110 bp 업스트림 영역에 위치하긴 하지만, 많은 프로모터는 출발 부위의 다운스트림에 기능성 요소를 또한 함유하는 것으로 최근에 제시되었다. 프로모터 요소들 사이의 간격은 빈번하게도 융통성이 있으며, 따라서, 요소들이 서로에 대해 반전(invert)되거나 이동될 때 프로모터 기능은 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서, 프로모터 요소들 사이의 간격은, 활성이 저하되기 시작하기 전에 50 bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화시키기 위해 협동적으로 또는 독립적으로 작용할 수 있는 것으로 보인다.

[0780] 적합한 프로모터의 일례는 극초기(immediate early) 사이토메갈로바이러스(CMV; cytomegalovirus) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 높은 발현 수준을 구동할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나, 비제한적으로 시미안 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복부(LTR; long terminal repeat) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인 바 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예컨대 비제한적으로, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하여 다른 구성적 프로모터 서열이 또한, 사용될 수 있다.

[0781] 나아가, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 한정되지 않아야 한다. 유도적 프로모터가 또한, 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도적 프로모터의 사용은, 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현이 요망되는 경우 상기 프로모터가 작동적으로 연결된 상기 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 켜거나, 발현이 요망되지 않는 경우 상기 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도적 프로모터의 예는 조직-특이적인 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 푸소좀의 발현은, 푸소좀이 발생되기 전에, 예를 들어 푸소좀이 발생되기 전 3, 6, 9, 12, 24, 26, 48, 60, 또는 72시간째에 상향조절된다.

[0782] 공급원 내로 도입되는 발현 벡터는 또한, 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되고자 하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선별을 용이하게 하기 위해, 선별 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유할 수 있다. 다른 양태에서, 선별 마커는 DNA의 별개의 조각 상에서 운반되고 공동-형질감염 절차에서 사용될 수 있다. 선별 마커 유전자와 리포터 유전자 둘 모두는 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하기 위해 적절한 조절 서열의 측면에 존재할 수 있다. 유용한 선별 마커는 예를 들어 항생제-내성 유전자, 예컨대 네오(neo) 등을 포함한다.

[0783] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는, 수여자 공급원에 존재하지 않거나 상기 공급원에 의해 발현되지 않고 폴리펩타이드를 인코딩하는 유전자이며, 상기 폴리펩타이드의 발현은 일부 용이하게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소적 활성에 의해 표명(manifest)된다. 리포터 유전자의 발현은, DNA가 수여자 세포 내로 도입된 후 적합한 시기에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리 포스파타제를 인코딩하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어 문헌[Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82]). 적합한 발현 시스템은 잘 공지되어 있고, 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 입수될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 수준의 발현을 보여주는 최소 5' 측면(flanking) 영역을 갖는 구축물은 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되

고, 프로모터-구동 전사를 조정하는 능력에 대해 작용제를 평가하는 데 사용될 수 있다.

- [0784] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 단백질의 발현을 변경시키기 위해 유전적으로 변형될 수 있다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특이적인 시간 동안, 예를 들어 공급원의 발달 또는 분화 상태 동안 변형될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 융합 활성, 구조 또는 기능에 영향을 주는 하나 이상의 단백질, 예를 들어 푸소젠 단백질 또는 비-푸소젠 단백질의 발현을 변경시키기 위해 유전적으로 변형된 세포 공급원으로부터 발생된 푸소좀을 포함한다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특이적인 장소(들)에 제약되거나 공급원 전체에 걸쳐 확산될 수 있다.
- [0785] 일부 구현예에서, 푸소젠 단백질의 발현은 변형된다. 일 구현예에서, 본 발명은 푸소젠 단백질의 변형된 발현, 예를 들어 푸소젠 발현의 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 이상만큼의 증가 또는 저하를 갖는 세포로부터 발생된 푸소좀을 포함한다.
- [0786] 일부 구현예에서, 세포는 푸소젠 단백질을 표적화하는 세포기질 효소(예를 들어 프로테아제, 포스파타제, 키나제, 데메틸라제, 메틸트랜스퍼라제, 아세틸라제)을 발현하도록 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포기질 효소는 번역-후 변형을 변경시킴으로써 하나 이상의 푸소젠에 영향을 준다. 단백질의 번역-후 단백질 변형은 영양소 이용 가능성(nutrient availability) 및 산화환원 조건에 대한 감응성(responsiveness), 및 단백질-단백질 상호작용에 영향을 줄 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 변경된 번역-후 변형, 예를 들어 번역-후 변형의 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 이상만큼의 증가 또는 저하를 갖는 푸소젠을 포함하는 푸소좀을 포함한다.
- [0787] 변형을 세포 내로 도입하는 방법은 물리적, 생물학적 및 화학적 방법을 포함한다. 예를 들어 문헌[Geng. & Lu, Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. Lab on a Chip. 13(19):3803-21. 2013; Sharei, A. et al. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. PNAS vol. 110 no. 6. 2013; Yin, H. et al., Non-viral vectors for gene-based therapy. Nature Reviews Genetics. 15: 541-555. 2014]을 참조한다. 본원에 기재된 푸소좀을 발생시키는 사용하기 위한 세포를 변형시키는 적합한 방법은 예를 들어, 발산, 삼투, 삼투적 펄싱(osmotic pulsing), 삼투압 충격, 저장성 용해, 저장성 투석, 이온영동(ionophoresis), 전기천공, 초음파처리, 현미주사, 칼슘 침전, 막 삽입(membrane intercalation), 지질-매개 형질감염, 세제 처리, 바이러스 감염, 수용체-매개 세포내이입, 단백질 전달 도메인의 사용, 입자 파이어링(particle firing), 막 융합, 냉동-해동, 기계적 붕괴, 및 여과를 포함한다.
- [0788] 유전적 변형의 존재를 확인하는 단계는 여러 가지 검정법을 포함한다. 이러한 검정법은 예를 들어, 분자생물학 검정법, 예컨대 서던 및 노던 블로팅, RT-PCR 및 PCR; 예컨대 특정 펩타이드의 존재 또는 부재를 검출하는 생화학적 검정법, 예를 들어 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블롯) 또는 본원에 기재된 검정법을 포함한다.
- [0789] *미토콘드리아 생물발생에 대한 변형*
- [0790] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은:
- [0791] (a) 미토콘드리아 생물발생의 조정제와 접촉되었던 복수의 공급원 세포를 제공하는 단계, 예를 들어 복수의 공급원 세포를 미토콘드리아 생물발생의 조정제(예를 들어 (i) mtDNA 증폭을 조정하는 작용제, (ii) 미토콘드리아 지질 합성을 조정하는 작용제, 또는 (iii) 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 조정하는 작용제 또는 이들의 조합)와 접촉시키는 단계, 및
- [0792] (b) 복수의 세포로부터 푸소좀을 분리하는 단계
- [0793] 를 포함한다.
- [0794] 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조정제는 미토콘드리아 생물발생을 상향조절하거나 자극한다. 다른 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조정제는 미토콘드리아 생물발생을 하향조절하거나 저해한다.
- [0795] 구현예에서, mtDNA 증폭을 조정하는 작용제는 mtDNA 증폭을 촉진하거나 저해하는 작용제이다. 구현예에서, 미토콘드리아 지질 합성을 조정하는 작용제는 미토콘드리아 지질 합성을 촉진하거나 저해하는 작용제이다. 구현예에서, 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 조정하는 작용제는 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 촉진하거나 저해하는 작용제이다.
- [0796] 구현예에서, mtDNA 증폭을 촉진하는 작용제는: mtDNA 증폭에 참여하는 단백질, mtDNA 복제에 참여하는 단백질을 상향조절하는 단백질, 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 이의 전구체를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 지질 합성을 촉진하는 작용제는 지질 합성 유전자이다. 구현예에서, 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을

촉진하는 작용제는 전사 인자이다.

- [0797] 구현예에서, mtDNA 증폭을 저해하는 작용제는: mtDNA 증폭에 참여하는 단백질의 저해제(예를 들어 토포이소머라제 저해제, 삽입제(intercalating agent), mtDNA 증폭에 참여하는 단백질을 하향조절하는 siRNA, mtDNA 증폭에 참여하는 단백질을 하향조절하는 표적화된 뉴클레아제, mtDNA 증폭에 참여하는 단백질에 대한 유전자를 방해하는 CRISPR/Cas9 분자), mtDNA 복제에 참여하는 단백질을 하향조절하는 단백질, 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 유사체 또는 이의 전구체를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 지질 합성을 저해하는 작용제는 지질 합성 유전자의 저해제이다. 구현예에서, 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 저해하는 작용제는 전사 억제자이다.
- [0798] 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 표 4의 단백질을 조정하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 직접 조절 유전자(예를 들어 마스터 조절자 또는 DNA 결합 인자)를 조정하는, 상향조절하는, 하향조절하는, 자극하는 또는 저해하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 표 4의 직접 조절 유전자(예를 들어 표 4의 마스터 조절자 또는 표 4의 DNA 결합 인자)를 상향조절하는, 하향조절하는, 자극하는 또는 저해하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 간접 조절 유전자(예를 들어 활성자 또는 저해제)를 상향조절하는, 하향조절하는, 자극하는 또는 저해하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 표 4의 간접 조절 유전자(예를 들어 표 4의 활성자 또는 표 4의 저해제)를 상향조절하는, 하향조절하는, 자극하는 또는 저해하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생을 조정하는 단계는 대사물, 예를 들어 표 4의 대사물을 상향조절하거나 하향조절하는 단계를 포함한다.
- [0799] 구현예에서, 미토콘드리아 지질의 합성을 촉진하거나 저해하는 작용제는 미토콘드리아 막에서 지질의 변경된 비율을 유발할 수 있거나 초래한다. 구현예에서, 미토콘드리아 지질의 합성을 조정하는 작용제는 하기 미토콘드리아 지질: 카디오리핀, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티드산, CDP-디아실글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 콜레스테롤, 또는 세라마이드 중 하나의 비율의 예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼의 증가 또는 저하를 초래한다.
- [0800] 일부 구현예에서, 상기 방법은 (i), (ii) 및 (iii) 중 1, 2 또는 3개 모두를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 (i), (ii) 및 (iii) 중 2개, 예를 들어 (i)과 (ii), (i)과 (iii), 또는 (ii)와 (iii)을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미토콘드리아 생물발생을 자극하기에 충분한 수준에서 (i), (ii) 및 (iii) 중 1, 2 또는 3개 모두 중 하나를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0801] 구현예에서, 상기 방법은 mtDNA 증폭을 (예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, mtDNA 증폭을 조정하는 단계는 지질 합성과 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성 중 하나 또는 둘 모두의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다. 구현예에서, 상기 방법은 지질 합성을 (예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, 조정하는 단계는 mtDNA 증폭과 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성 중 하나 또는 둘 모두의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다. 구현예에서, 상기 방법은 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 (예를 들어 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 조정하는 단계는 지질 합성과 mtDNA 증폭 중 하나 또는 둘 모두의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다.
- [0802] 구현예에서, 상기 방법은 mtDNA 증폭 및 지질 합성을 (예를 들어 각각 독립적으로 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, mtDNA 증폭 및 지질 합성을 조정하는 단계는 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다. 구현예에서, 상기 방법은 mtDNA 증폭 및 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 (예를 들어 각각 독립적으로 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, mtDNA 증폭 및 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 조정하는 단계는 지질 합성의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다. 구현예에서, 상기 방법은 지질 합성 및 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 (예를 들어 각각 독립적으로 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다. 구현예에서, 조정하는 지질 합성 및 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성은 mtDNA 증폭의 검출 가능한 조정(예를 들어 자극) 없이 발생한다.
- [0803] 구현예에서, 상기 방법은 mtDNA 증폭, 지질 합성 및 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성을 (예를 들어 각

각 독립적으로 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼) 조정하는(예를 들어 자극하는) 단계를 포함한다.

- [0804] 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 미토콘드리아 생물발생의 자극제이다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 갈변화의 자극제이다. 구현예에서, 갈변화의 자극제는 PGC1 α 이다. 구현예에서, 갈변화의 자극제는 퀴논, FGF21, 이리신(irisin), 아펠린(apelin) 또는 이소프로테레놀이다. 구현예에서, 복수의 공급원 세포, 또는 복수의 공급원 세포로부터 유래되는 푸소좀 조성물은 예를 들어 문헌[Spaethling et al "Single-cell transcriptomics and functional target validation of brown adipocytes show their complex roles in metabolic homeostasis." in: FASEB Journal, Vol. 30, Issue 1, pp. 81-92, 2016]에 기재된 바와 같이, 갈변화에 대해 검정되며, 예를 들어 UCP1 발현에 대해 ELISA에 의해 검정된다.
- [0805] 구현예에서, 복수의 공급원 세포, 또는 복수의 공급원 세포로부터 유래되는 푸소좀 조성물은 mtDNA 증폭, 미토콘드리아 지질 합성 또는 핵-인코딩된 미토콘드리아 단백질의 생성 또는 이들의 임의의 조합의 존재 또는 수준에 대해 검정된다.
- [0806] 공급원 세포는 미토콘드리아 생물발생의 조절제와, 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 (예를 들어 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 이상만큼) 증가시키기에 충분한 양 및 시간 동안 접촉될 수 있다. 이러한 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 예를 들어 문헌[Cameron et al. 2016. Development of Therapeutics That Induce Mitochondrial Biogenesis for the Treatment of Acute and Chronic Degenerative Diseases. DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b00669]에 기재되어 있다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 성장기 동안 및/또는 생성기 동안 공급원 세포 배양물에 첨가된다. 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는, 공급원 세포 배양물이 예정된 표적 밀도를 갖는 경우 첨가된다.
- [0807] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한, 천연 생성물 또는 이의 합성 등가물로부터 추출되는 작용제이다. 이러한 작용제의 예는 레스베라트롤(resveratrol), 에피카테킨(epicatechin), 커큐민, 피토에스트로겐(예를 들어 게니스테인, 다이드제인(daidzein), 피롤로퀴놀린, 퀴논, 쿠메스트롤(coumestrol) 및 에쿠올(equol))을 포함한다.
- [0808] 또 다른 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생, 공급원 세포에서 미토콘드리아를 증가시키기에 충분한 대사물, 예를 들어 일차 또는 이차 대사물이다. 이러한 대사물, 예를 들어 일차 대사물은 알코올, 에컨대 에탄올, 락트산 및 소정의 아미노산을 포함하고, 이차 대사물은 일차 대사물의 변형을 통해 생성된 유기 화합물을 포함하고, 문헌["Primary and Secondary Metabolites." Boundless Microbiology. Boundless, 26 May, 2016]에 기재되어 있다.
- [0809] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생, 또는 공급원 세포에서 미토콘드리아를 증가시키기에 충분한 에너지 공급원, 예를 들어 당, ATP, NADH 및 FADH₂로서 산화환원 보조인자이다. 이러한 에너지 공급원, 예를 들어 피루베이트 또는 팔미테이트는 문헌[Mehlman, M. *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*; Academic Press, 1972]에 기재되어 있다.
- [0810] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 전사 인자 조절제이다. 이러한 전사 인자 조절제의 예는: 티아졸리딘디온(예를 들어 로시글리타존(rosiglitazone), 피오글리타존(pioglitazone), 트로글리타존(troglitazone) 및 시글리타존(ciglitazone)), 에스트로겐(예를 들어 17 β -에스트라디올, 프로게스테론) 및 에스트로겐 수용체 효능제; SIRT1 활성화자(예를 들어 SRT1720, SRT1460, SRT2183, SRT2104)를 포함한다.
- [0811] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 키나제 조절제이다. 예는: AMPK 및 AMPK 활성화자, 예컨대 AICAR, 메트포르민, 펜포르민, A769662; 및 ERK1/2 저해제, 예컨대 U0126, 트라메티닙(trametinib)을 포함한다.
- [0812] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 원형 뉴클레오타이드 조절제이다. 예는 NO-cGMP-PKG 경로의 조절제(예를 들어 산화질소(NO) 공여자, 예컨대 소듐 니트로프루사이드, (±)S-니트로소-N-아세틸페니실라민(SNAP), 디에틸아민 NONOate(DEA-NONOate), 디에틸렌트리아민-NONOate(ETA-NONOate); sGC 자극제 및 활성화자, 예컨대 시나시구아트(cinaciguat), 리오시구아트(riociguat) 및 BAY 41-2272; 및 포스포디에스테라제(PDE) 저해제, 예컨대 자프리나스트(zaprinast), 실데날(sildenafil), 우데날(udenal), 타달랄(tadalafil) 및 바르데날(vardenal)) 및 cAMP-PKA-CREB 축의 조절제, 예컨대

포스포디에스터라제 (PDE) 저해제, 예컨대 롤리프람(rolipram)을 포함한다.

- [0813] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 G 단백질 커플링된 수용체(GPCR)의 조절제, 예컨대 GPCR 리간드이다.
- [0814] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 카나비노이드-1 수용체의 조절제이다. 예는 타라나반트(taranabant) 및 리모노반트(rimonabant)를 포함한다.
- [0815] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 5-하이드록시트립타민 수용체의 조절제이다. 예는 알파-메틸-5-하이드록시트립타민, DOI, CP809101, SB242084, 세로토닌 재흡수 저해제, 예컨대 플루옥세틴(fluxoxetine), 알파-메틸 5HT, 1-(2,5-디메톡시-4-요오도페닐)-2-아미노프로판, LY334370 및 LY344864를 포함한다.
- [0816] 일 구현예에서, 미토콘드리아 생물발생의 조절제는 공급원 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 증가시키기에 충분한 베타 아드레날린 작용성 수용체의 조절제이다. 예는 에피네프린, 노르에피네프린, 이소프로테레놀, 메토프롤롤(metoprolol), 포르모테롤(formoterol), 페노테롤(fenoterol) 및 프로카테롤(procaterol)을 포함한다.
- [0817] 일 구현예에서, 공급원 세포는 미토콘드리아 생물발생의 전사 활성자, 예를 들어 전사 인자 또는 전사 공동-활성자, 예컨대 PGC1 α 를 발현하도록 변형되며, 예를 들어 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 세포는 PGC1 α 를 발현한다(예를 들어 내인성 PGC1 α 를 과발현하거나 외인성 PGC1 α 를 발현함).

표 4. 미토콘드리아 생물발생의 전사 조절. 예를 들어 문헌[Scarpulla et al., “Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis” Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 23, Issue 9, p459–466, September 2012; Hock et al. “Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function.” Annu Rev Physiol. 2009;71:177-203. Santra et al., “Ketogenic Treatment Reduces Deleted Mitochondrial DNAs in Cultured Human Cells” Ann Neurol. 2004 Nov;56(5):662-9. Kanabus et al., “The pleiotropic effects of decanoic acid treatment on mitochondrial function in fibroblasts from patients with complex I deficient Leigh syndrome” J Inherit Metab Dis. 2016 May;39(3):415-26]을 참조하며, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

직접 조절 유전자	
유전자	조절되는 표적 또는 기능
마스터 조절자	
PGC-1 α	PPAR-델타,a, 감마; ERRa,b, 감마; GABP; NRF-1; YY1; CREB; c-MYC에 대한 마스터 조절자, 공동-활성자
PGC-1 β	PPAR-델타,a, 감마; ERRa,b, 감마; GABP; NRF-1; YY1; CREB; c-MYC에 대한 마스터 조절자, 공동-활성자
RIP140	PPAR-델타,a, 감마 및 ERRa, 베타, 감마와 함께 공동-억제자
PRC	PPAR-델타,a, 감마; ERRa,b, 감마; GABP; NRF-1; YY1; CREB; c-MYC에 대한 마스터 조절자, 공동-활성자
DNA 결합 인자	
RXR (레티노이드 X 수용체)	지방산 베타 산화 & 언커플링 단백질
PPARa	지방산 베타 산화 & 언커플링 단백질
PPAR-델타	지방산 베타 산화 & 언커플링 단백질
PPAR-감마	언커플링 단백질
NRF-1	mtDNA의 유지 및 ETC의 발현; mtDNA 전사; 미토콘드리아 유입
NRF-2	mtDNA의 유지 및 다수의 ETC 구성성분의 발현
ERR (a,B 및 감마)	PGC1 α 와의 상호작용을 통해, 지방산 B-ox의 조절된 발현, 미토콘드리아 동역학(dynamics)(분열(fission)/융합); ETC; mtDNA 복제 및 전사; 미토콘드리아 유입
GABP	mtDNA의 유지 및 ETC의 발현; mtDNA 전사; 미토콘드리아 유입
YY1	mtDNA의 유지 및 ETC의 발현; mtDNA 전사; 미토콘드리아 유입
c-MYC	mtDNA의 유지 및 ETC의 발현; mtDNA 전사; 미토콘드리아 유입
CREB	mtDNA의 유지 및 ETC의 발현; mtDNA 전사; 미토콘드리아 유입

[0818]

간접 조절 유전자	
유전자	조절되는 표적 또는 기능
저해제	
SRC-3	PGC-1a 를 아세틸화하고 저해함
GCN5	PGC-1a 를 아세틸화하고 저해함
AKT	
SCF-cdc4	
MYBBP1a	
활성자	
SIRT1	PCG-1a 를 탈아세틸화하고 활성화함
AMPK	PGC-1a 를 인산화하고 활성화함
Cdk/사이클린 H/MAT1	
PRMT1	
GSK-3B	
다른 과정에 대한 간접 조절 유전자	
유전자	조절되는 표적 또는 기능
SIRT3	ROS 수준을 저해하기 위해 mtSOD2 및 GSH/GPX 를 조절함
생물발생을 자극하는 대사물	
명칭	클래스
β -하이드록시부티레이트 (BHB)	케톤체
아세토아세테이트 (ACA)	케톤체
데칸산 (C10)	중간 사슬 트리글리세라이드
옥탄산	중간 사슬 트리글리세라이드

[0819]

[0820]

[0821]

[0822]

[0823]

[0824]

[0825]

[0826]

[0827]

[0828]

푸소좀 변형

일 양태에서, 변형은 푸소좀에 이루어진다. 이러한 변형은 예를 들어 표적화, 기능 또는 구조를 향상시키기에 효과적인 수 있다.

일부 구현예에서, 푸소좀은, 막의 표면에 비-공유 또는 공유 연결될 수 있는 푸소젠, 예를 들어 본원에 기재된 화학적 푸소젠으로 처리된다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 막에서 비-공유 또는 공유 연결되거나 그 자체가 막 내에 포매될 수 있는 푸소젠, 예를 들어 단백질 또는 지질 푸소젠으로 처리된다.

일부 구현예에서, 리간드는 푸소좀의 표면 상에 존재하는 기능성 화학 기 (카르복실산, 알데하이드, 아민, 설퍼드릴 및 하이드록실)를 통해 상기 푸소좀의 표면에 공액된다.

이러한 반응성 기는 비제한적으로 말레이미드기를 포함한다. 일례로, 푸소좀은 말레이미드 공액된 인지질, 예컨대 비제한적으로 DSPE-Mal-PEG2000을 포함하도록 합성될 수 있다.

일부 구현예에서, 합성 또는 선천적인 저분자 또는 지질은 푸소좀의 표면에 공유 또는 비-공유 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좀 내 막 지질은 푸소젠 특성을 촉진하거나, 유도하거나 증강시키도록 변형될 수 있다.

일부 구현예에서, 푸소좀은 변형된 단백질과 함께 로딩함으로써 변형된다(예를 들어 신규 기능성을 가능하게 하거나, 번역-후 변형을 변경시키거나, 미토콘드리아 막 및/또는 미토콘드리아 막 단백질에 결합하거나, 이중성 기능을 갖는 절단 가능한 단백질을 형성하거나, 단백질분해성 분해로 예정된 단백질을 형성하거나, 작용제의 장소 및 수준을 검정하거나, 작용제를 담체로서 전달함). 일 구현예에서, 본 발명은 변형된 단백질이 로딩된 푸소좀을 포함한다.

일부 구현예에서, 외인성 단백질은 푸소좀에 비-공유 결합된다. 단백질은 방출을 위해 절단 가능한 도메인을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 절단 가능한 도메인을 갖는 외인성 단백질을 포함하는 푸소좀을 포함한다.

일부 구현예에서, 푸소좀은 단백질분해성 분해로 예정된 단백질로 변형된다. 여러가지 프로테아제는 특이적인 단백질 아미노산 서열을 인지하고, 분해를 위해 단백질을 표적화한다. 이들 단백질 분해 효소는 단백질분해성 분해 서열을 갖는 단백질을 특이적으로 분해하는 데 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 단백질 분해 효소의 조정된 수준, 예를 들어 단백질 분해 효소에서 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 이상만큼의 증가 또는 저하를 포함하는 푸소좀을 포함한다.

- [0829] 본원에 기재된 바와 같은, 비-푸소젠 첨가제는 푸소좀의 구조 및/또는 특성을 변형시키기 위해 푸소좀에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 콜레스테롤 또는 스펅고미엘린은 막에 첨가되어, 내부 적재물의 구조를 안정화시키는 것을 돕고 상기 적재물의 누출을 방지할 수 있다. 나아가, 막은 수소화된 에그 포스파티딜콜린 또는 에그 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 디아세틸 포스페이트로부터 제조될 수 있다. (예를 들어 리뷰를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).
- [0830] 일부 구현예에서, 푸소좀은 특이적인 세포 또는 조직 유형(예를 들어 심근세포)을 표적화하기 위해 외부 표면 상에 하나 이상의 표적화 기(예를 들어 표적화 단백질)를 포함한다. 이들 표적화 기는 비제한적으로 수용체, 리간드, 항체 등을 포함한다. 이들 표적화 기는 표적 세포의 표면 상에서 이들의 파트너에 결합한다. 구현예에서, 표적화 단백질은 본원에 기재된 표적 세포, 예를 들어 피부 세포, 심근세포, 간세포, 장 세포(예를 들어 소장 세포), 췌장 세포, 뇌 세포, 전립선 세포, 폐 세포, 결장 세포, 또는 골수 세포 상의 세포 표면 마커에 특이적이다.
- [0831] 일부 구현예에서, 표적화 단백질은 표적 세포 상의 세포 표면 마커에 결합한다. 구현예에서, 세포 표면 마커는 단백질, 당단백질, 수용체, 세포 표면 리간드, 클래스 I 막관통 단백질, 클래스 II 막관통 단백질, 또는 클래스 III 막관통 단백질을 포함한다.
- [0832] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 푸소젠으로부터의 별개의 폴리펩타이드인 폴리펩타이드에 의해 포함된다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드는 막관통 도메인 및 세포의 표적화 도메인을 포함한다. 구현예에서, 세포의 표적화 도메인은 scFv, DARPIn, 나노바디, 수용체 리간드, 또는 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 표적화 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 이황화-연결된 Fv(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb(VL 또는 VH), 또는 카멜리드 VHH 도메인), 항원-결합 피브로넥틴 III형(Fn3) 스캐폴드, 예컨대 피브로넥틴 폴리펩타이드 미니바디, 리간드, 사이토카인, 케모카인, 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함한다.
- [0833] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀은 진단제를 이용하여 작용화된다. 진단제의 예는 양전자 방사 단층 촬영(PET; positron emissions tomography), 컴퓨터 보조 단층 촬영(CAT; computer assisted tomography), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영, x-선, 형광투시법 및 자기 공명 화상법(MRI; magnetic resonance imaging)에 사용되는 상업적으로 입수 가능한 이미징 작용제; 및 조영제를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. MRI에서 조영제로서 사용하기에 적합한 물질의 예는 가돌리늄 킬레이트, 뿐만 아니라 철, 마그네슘, 망간, 구리 및 크롬을 포함한다.
- [0834] 작용기를 푸소좀에 도입하는 또 다른 예는 제조-후 동안에, 푸소좀 및 리간드를 동중- 또는 이중작용성 가교제와 직접 가교시킴으로써 이루어진다. 이러한 절차는 적합한 화학 및 가교제 클래스(본원에 고찰된 바와 같이 CDI, EDAC, 글루타르알데하이드 등), 또는 제조 후 푸소좀 표면의 화학적 변형을 통해 상기 푸소좀 표면에 리간드를 커플링하는 임의의 다른 가교제를 사용할 수 있다. 이는 또한, 양친매성 분자, 예컨대 지방산, 지질 또는 기능성 안정화제가 푸소좀 표면에 수동적으로 흡착되고 접촉되어, 이로써 리간드에 테더링(tethering)하기 위한 작용성 말단기를 도입할 수 있는 과정을 포함한다.
- [0835] 적재물
- [0836] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀은 적재물, 예를 들어 아세포성 적재물을 포함한다.
- [0837] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀은 적재물, 예를 들어 치료제, 예를 들어 내인성 치료제 또는 외인성 치료제를 포함한다.
- [0838] 일부 구현예에서, 적재물은, 푸소좀이 유래되는 세포에서 천연적으로 발현되지 않는다. 일부 구현예에서, 적재물은, 푸소좀이 유래되는 세포에서 천연적으로 발현된다. 일부 구현예에서, 적재물은, 푸소좀이 유래되는 세포에서 천연적으로 발현되는 야생형 핵산 또는 단백질의 돌연변이체이거나, 푸소좀이 유래되는 세포에서 천연적으로 발현되는 돌연변이체의 야생형이다.
- [0839] 일부 구현예에서, 적재물은, 푸소좀이 유래되는 세포에서 발현(예를 들어 형질감염, 전달 또는 전기천공을 통해 도입된 DNA 또는 mRNA로부터의 발현)을 통해 푸소좀 내로 로딩된다. 일부 구현예에서, 적재물은 계능 내로 통합된 DNA로부터 발현되거나 에피솜적으로 유지된다. 일부 구현예에서, 적재물의 발현은 구성적이다. 일부 구현예에서, 적재물의 발현이 유도된다. 일부 구현예에서, 적재물의 발현은 푸소좀을 발생시키기 직전에 유도된다. 일

부 구현예에서, 적재물의 발현은 푸소젠의 발현과 동일한 때에 유도된다.

- [0840] 일부 구현예에서, 적재물은 전기천공을 통해 푸소좀 내로 로딩되거나, 푸소좀 자체 내로 로딩되거나, 푸소좀이 유래되는 세포 내로 로딩된다. 일부 구현예에서, 적재물은 (예를 들어 적재물을 인코딩하는 DNA 또는 mRNA의) 형질감염을 통해 푸소좀 내로 로딩되거나, 푸소좀 자체 내로 로딩되거나, 푸소좀이 유래되는 세포 내로 로딩된다.
- [0841] 일부 양태에서, 본 개시내용은 푸소좀 조성물(예를 들어 약제학적 조성물)을 제공하며, 상기 조성물은:
- [0842] (i) 콘드리좀(예를 들어 국제 출원 PCT/US16/64251에 기재된 바와 같음), 미토콘드리아, 세포소기관(예를 들어 미토콘드리아, 리소좀, 핵, 세포막, 세포질, 소포체, 리보솜, 액포, 엔도솜, 스플라이소솜(spliceosome), 폴리머라제, 캡시드, 첨체, 자가포식소체, 중심립, 글리코솜, 글리옥시솜, 하이드로게노솜, 멜라노솜, 미토솜, 근원섬유, 자포, 퍼옥시솜, 프로테아솜, 소낭, 스트레스 과립, 및 세포소기관의 네트워크), 또는 제핵 세포, 예를 들어 상기 중 임의의 것을 포함하는 제핵 세포 중 하나 이상, 및 (ii) 푸소젠, 예를 들어 마이오마커 단백질을 포함한다.
- [0843] 구현예에서, 푸소젠은 미토콘드리아 또는 콘드리솜에 대해 외부인 지질 이중층에 존재한다. 구현예에서, 콘드리솜은 예를 들어 발명의 실시예 및 요약을 포함하여 국제 출원, PCT/US16/64251에 기재된 바와 같은 특성 중 하나 이상을 가지며, 상기 출원은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0844] 일부 구현예에서, 적재물은 하나 이상의 핵산 서열, 하나 이상의 폴리펩타이드, 핵산 서열 및/또는 폴리펩타이드의 조합, 하나 이상의 세포소기관 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 하나 이상의 세포성 구성성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 하나 이상의 세포기질 및/또는 핵 구성성분을 포함한다.
- [0845] 일부 구현예에서, 적재물은 핵산, 예를 들어 DNA, nDNA(핵 DNA), mtDNA(미토콘드리아 DNA), 단백질 코딩 DNA, 유전자, 오페론, 염색체, 게놈, 트랜스포존, 레트로트랜스포존, 바이러스 게놈, 인트론, 엑손, 변형된 DNA, mRNA(메신저 RNA), tRNA(운반 RNA), 변형된 RNA, microRNA, siRNA(작은 간섭 RNA), tmRNA(운반 메신저 RNA), rRNA(리보솜 RNA), mtRNA(미토콘드리아 RNA), snRNA(작은 핵 RNA), 작은 핵소체 RNA(snoRNA), SmY RNA(mRNA trans-스플라이싱 RNA), gRNA(가이드 RNA), TERC(텔로머라제 RNA 구성성분), aRNA(안티센스 RNA), cis-NAT(Cis-천연 안티센스 전사체), CRISPR RNA(crRNA), lncRNA(길이가 긴 비코딩 RNA), piRNA(피위-상호작용 RNA; piwi-interacting RNA), shRNA(짧은 헤어핀 RNA), tasiRNA(trans-작용 siRNA), eRNA(인핸서 RNA), 위성 RNA, pcRNA(단백질 코딩 RNA), dsRNA(이중 가닥 RNA), RNAi(간섭 RNA), circRNA(원형 RNA), 제프로그래밍 RNA, 앵타머(aptamer) 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 야생형 핵산이다. 일부 구현예에서, 단백질은 돌연변이체 핵산이다. 일부 구현예에서, 핵산은 다수의 핵산 서열의 융합 또는 키메라이다.
- [0846] 일부 구현예에서, 푸소좀 내 DNA, 푸소좀이 유래되는 세포 내 DNA는 유전자 돌연변이를 교정(correct)하기 위해, 유전자 편집 기술, 예를 들어 가이드 RNA 및 CRISPR-Cas9/Cpf1을 사용하거나 상이한 표적화된 엔도뉴클레아제(예를 들어 아연-핑거 뉴클레아제, 전사-활성자-유사 뉴클레아제(TALEN))를 사용하여 편집된다. 일부 구현예에서, 유전자 돌연변이는 대상체에서 질병에 연결된다. DNA에 대한 편집의 예는 작은 삽입/결실, 큰 결실, 주형 DNA를 이용한 유전자 교정, 또는 DNA의 큰 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집은 비-상동성 말단 접합(NHEJ; non-homologous end joining) 또는 상동성 인도 복구(HDR; homology directed repair)를 이용하여 달성된다. 일부 구현예에서, 편집물은 녹아웃이다. 일부 구현예에서, 편집물은 녹인(knock-in)이다. 일부 구현예에서, DNA의 두 대립유전자 모두가 편집된다. 일부 구현예에서, 단일 대립유전자가 편집된다. 일부 구현예에서, 다수의 편집물이 만들어진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 또는 세포는 대상체로부터 유래되거나, 대상체에 대해 유전적으로 매칭되거나, 대상체와 면역학적으로 용화성이다(예를 들어 유사한 MHC를 가짐).
- [0847] 일부 구현예에서, 적재물은 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적재물은 내인성 단백질의 발현을 증강시키기 위해 RNA, 또는 내인성 단백질의 단백질 발현을 저해하는 siRNA 또는 miRNA를 포함할 수 있다. 예를 들어, 내인성 단백질은 표적 세포에서 구조 또는 기능을 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 표적 세포에서 구조 또는 기능을 조절하는 조작된 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 표적 세포에서 구조 또는 기능을 조절하는 전사 활성자를 표적화하는 핵산이다.
- [0848] 일부 구현예에서, 적재물은 폴리펩타이드, 예를 들어 효소, 구조 폴리펩타이드, 신호전달 폴리펩타이드, 조절 폴리펩타이드, 수송하다 폴리펩타이드, 감각 폴리펩타이드, 운동(motor) 폴리펩타이드, 방어 폴리펩타이드, 저장 폴리펩타이드, 전사 인자, 항체, 사이토카인, 호르몬, 대사 폴리펩타이드, 동화작용성(anabolic) 폴리펩타이드

드, 단백질분해성 폴리펩타이드, 대사 폴리펩타이드, 키나제, 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 리아제(lyase), 이소머라제, 리가제, 효소 조정제 폴리펩타이드, 단백질 결합 폴리펩타이드, 지질 결합 폴리펩타이드, 막 융합 폴리펩타이드, 세포 분화 폴리펩타이드, 후성적 폴리펩타이드, 세포 사멸 폴리펩타이드, 핵 수송 폴리펩타이드, 핵산 결합 폴리펩타이드, 재프로그래밍 폴리펩타이드, DNA 편집 폴리펩타이드, DNA 복구 폴리펩타이드, DNA 재조합 폴리펩타이드, 트랜스포자제(transposase) 폴리펩타이드, DNA 통합 폴리펩타이드, 표적화된 엔도뉴클레아제(예를 들어 아연-핑거 뉴클레아제, 전사-활성화-유사 뉴클레아제(TALEN), cas9 및 이들의 상동체), 리컴비나제 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 분해를 위해 세포에서 단백질을 표적화한다. 일부 구현예에서, 단백질은 상기 단백질을 프로테아좀에 위치시킴으로써 분해를 위해 세포에서 단백질을 표적화한다. 일부 구현예에서, 단백질은 야생형 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 돌연변이체 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 융합 또는 키메라 단백질이다.

[0849] 일부 구현예에서, 적재물은 저분자, 예를 들어 이온(예를 들어 Ca^{2+} , Cl^- , Fe^{2+}), 탄수화물, 지질, 반응성 산소종, 반응성 질소종, 이소프레노이드, 신호전달 분자, 헴, 폴리펩타이드 보조인자, 전자 수용 화합물, 전자 공여 화합물, 대사물, 리간드 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 저분자는 세포에서 표적과 상호작용하는 약제학적 물질이다. 일부 구현예에서, 저분자는 분해를 위해 세포에서 단백질을 표적화한다. 일부 구현예에서, 저분자는 상기 단백질을 프로테아좀에 위치시킴으로써 분해를 위해 세포에서 단백질을 표적화한다. 일부 구현예에서, 해당 저분자는 단백질분해 표적화 키메라 분자(PROTAC)이다.

[0850] 일부 구현예에서, 적재물은 단백질, 핵산, 또는 대사물의 혼합물, 예를 들어 다수의 폴리펩타이드, 다수의 핵산, 다수의 저분자; 핵산, 폴리펩타이드 및 저분자의 조합; 리보뉴클레오타이드 단백질 복합체(예를 들어 Cas9-gRNA 복합체); 다수의 전사 인자, 다수의 후성적 인자, 재프로그래밍 인자(예를 들어 Oct4, Sox2, cMyc 및 Klf4); 다수의 조절 RNA; 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0851] 일부 구현예에서, 적재물은 세포소기관, 예를 들어 콘드리솜, 미토콘드리아, 리소솜, 핵, 세포막, 세포질, 소포체, 리보솜, 액포, 엔도솜, 스플라이소솜, 폴리머라제, 캡시드, 침체, 자가포식소체, 중심립, 글리코솜, 글리옥시솜, 하이드로게노솜, 멜라노솜, 미토솜, 근원섬유, 자포, 퍼옥시솜, 프로테아솜, 소낭, 스트레스 과립, 세포소기관의 네트워크 및 이들의 임의의 조합 중 하나 이상을 포함한다.

[0852] 일부 구현예에서, 적재물은 푸소솜 또는 세포막에서 농화된다. 일부 구현예에서, 적재물은 펩타이드 신호 서열을 통해 막에 표적화함으로써 농화된다. 일부 구현예에서, 적재물은 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자와의 결합에 의해 농화된다. 일부 구현예에서, 적재물은 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자에 공유 결합한다. 일부 구현예에서, 공유 결합은 프로테아제에 의해 절단 가능하다. 일부 구현예에서, 적재물은 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자와 비-공유 상호작용을 통해 연관된다. 일부 구현예에서, 막 단백질은 푸소솜이다. 일부 구현예에서, 적재물은 이차 매개자를 통해 농화된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 적재물은 중개(intermediary) 단백질에 의해 결합된 핵산이고, 상기 중개 단백질은 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자에 결합하여, 이로써 핵산 적재물을 막으로 위치시킨다. 일부 구현예에서, 핵산과 중개 단백질 사이의 상호작용은 공유 또는 비-공유이다. 일부 구현예에서, 중개 단백질과 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자 사이의 상호작용은 공유이거나, 공유이고 프로테아제에 의해 절단 가능하거나, 비-공유이다. 예를 들어, US20170175086A1 및 US9816080B2는 적재물 단백질의 단편과 막 연관 단백질 사이의 비-공유 연관을 통한 적재물 단백질의 농화를 기재하고 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자와 이량체화함으로써 농화된다. 일부 구현예에서, 적재물은 키메라(예를 들어 키메라 단백질 또는 핵산)이고, 막 연관 단백질, 지질, 또는 저분자와의 결합 또는 이량체화를 매개하는 도메인을 포함한다. 관심 막 연관 단백질은, 세포막과 안정하게 연관되며, 예를 들어 세포막에 결합되며, 세포막 내로 통합되는 등의 도메인(즉, 막 연관 도메인)을 갖는 임의의 단백질을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니며, 여기서, 이러한 도메인은 미리스토일화된 도메인, 파르네실화된 도메인, 막 관통 도메인 등을 포함할 수 있다. 관심의 특이적인 막 연관 단백질은: 미리스토일화된 단백질, 예를 들어 p 60 v-src 등; 파르네실화된 단백질, 예를 들어 Ras, Rheb 및 CENP-E,F, 포스포티딜-세린에 결합함으로써 특이적인 지질 이중층 구성성분에 결합하는 단백질, 예를 들어 아넥신V, 세포막 이중층의 지질 구성성분 등; 막 앵커 단백질; 막관통 단백질, 예를 들어 트랜스페린 수용체 및 이의 일부; 및 막 융합 단백질을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 막 연관 단백질은 제1 이량체화 도메인을 함유한다. 제1 이량체화 도메인은 예를 들어, 적재물의 제2 이량체화 도메인에 직접적으로 결합하거나 이량체화 매개자를 통해 제2 이량체화 도메인에 결합하는 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 적재물은 제2 이량체화 도메인을 함유한다. 제2 이량체화 도메인은 예를 들어, 직접적으로 또는 이량체화 매개자를 통해 막 연관 단백질의 제1 이량체화 도메인과 이량체화하는(예를 들어 제1 이량체화 도메인과 예컨대 비-공유 결합 상호작용에 의해, 직접적으로 또는

매개자를 통해 안정하게 연관되는) 도메인일 수 있다. 이량체화 도메인에 관하여, 이들 도메인은, 직접적으로 또는 이량체화 매개자를 통해 결합 사건에 참여하는 도메인이며, 여기서, 결합 사건은 막 연관 단백질과 표적 단백질의 요망되는 다량체성, 예를 들어 이량체성 복합체의 생성을 초래한다. 제1 및 제2 이량체화 도메인은, 이들이 동일한 서열의 아미노산으로 제조된 동종이량체성일 수 있거나, 이들이 상이한 서열의 아미노산으로 제조된 이종이량체성일 수 있다. 이량체화 도메인은 다양할 수 있으며, 여기서, 관심 도메인은: 표적 생물분자의 리간드, 예컨대 관심 특정 단백질에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어 단백질:단백질 상호작용 도메인), 예컨대 SH2 도메인, Paz 도메인, RING 도메인, 전사 활성화자 도메인, DNA 결합 도메인, 효소 촉매적 도메인, 효소 조절 도메인, 효소 하위단위, 정의된 세포 장소로의 위치화를 위한 도메인, 위치화 도메인에 대한 인지 도메인, URL: pawsonlab.mshri.on.ca/index.php?option=com_content&task=view&id=30&Itemid=63/에 열거된 도메인 등을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 제1 이량체화 도메인은 핵산(예를 들어 mRNA, miRNA, siRNA, DNA)에 결합하고, 제2 이량체화 도메인은 적재물 상에 존재하는 핵산 서열이다(예를 들어 제1 이량체화 도메인은 MS2이고, 제2 이량체화 도메인은 MS2 RNA의 고 친화성 결합 루프임). 이량체화 매개자로서 작용하는 임의의 편리한 화합물이 이용될 수 있다. 천연 발생 성분과 합성 성분 둘 모두를 포함하여 광범위하게 다양한 화합물이 이량체화 매개자로서 사용될 수 있다. 이량체화 매개자를 선별하기 위한 적용 가능하고 쉽게 관찰 가능하거나 측정 가능한 기준은: (A) 리간드가 생리학적으로 허용 가능하는 것(즉, 리간드가 사용되고자 하는 세포 또는 동물에 대한 과도한 독성이 결여되어 있음); (B) 리간드가 합리적인 치료 투약 범위를 갖는 것; (c) 리간드가 필요하다면 세포막 및 다른 막을 가로질러 수 있는 것(여기서 일부 상황에서, 리간드는 세포의 외부로부터 이량체화를 매개할 수 있음); (D) 리간드가 키메라 단백질의 표적 도메인에 결합하며, 이에 대해 상기 리간드는 요망되는 적용을 위해 합리적인 친화성이 있도록 설계되는 것을 포함한다. 제1 바람직한 기준은, 화합물이 상대적으로 생리학적으로 불활성화이지만 이의 이량체화 매개자 활성화에 대해서는 아닌 것이다. 일부 상황에서, 리간드는 비-펩타이드 및 비-핵산일 것이다. 부가적인 이량체화 도메인은 예를 들어 US20170087087 및 US20170130197에 기재되어 있고, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

- [0853] 콘드리즘의 특징
- [0854] 일 양태에서, 푸소좀, 예를 들어 푸소좀의 약제학적 조성물, 또는 푸소좀의 조성물은 미토콘드리아의 세포성 공급원으로부터 유래된, 단리된 콘드리즘(예를 들어 콘드리즘 조제물)을 포함한다.
- [0855] 또 다른 양태에서, 푸소좀, 예를 들어 푸소좀의 약제학적 조성물, 또는 푸소좀의 조성물은 미토콘드리아의 세포성 공급원으로부터 유래된, 단리되며 변형된 콘드리즘(예를 들어 변형된 콘드리즘 조제물)을 포함한다.
- [0856] 또 다른 양태에서, 푸소좀, 예를 들어 푸소좀의 약제학적 조성물, 또는 푸소좀의 조성물은 외인성 단백질을 발현하는 콘드리즘(예를 들어 콘드리즘 조제물)을 포함한다.
- [0857] 본원에 개시된 콘드리즘(예를 들어 콘드리즘 조제물), 방법 및 용도를 포함하는 부가적인 특징 및 구현예는 하기 중 하나 이상을 포함한다.
- [0858] 일부 구현예에서, 콘드리즘(또는 조성물 내 콘드리즘)은 하기 특징 중 하나 이상(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 이상, 예를 들어 모두)을 가진다:
- [0859] 외부 콘드리즘 막 온전성으로서, 여기서, 조성물은 환원된 시토크롬 c의 첨가 후 상태 4 속도(rate)에 걸쳐 산소 소모율에서 < 20%(예를 들어 < 15%, < 10%, < 5%, < 4%, < 3%, < 2%, < 1%)의 증가를 나타내는, 외부 콘드리즘 막 온전성;
- [0860] > 80%, 예를 들어 >85%, >90%, >95%, >97%, >98%, >99%의 유전적 품질로서, 여기서, 콘드리즘 조제물의 "유전적 품질"은 표 5에 기재된 유전자와 모두에 대해, 야생형 대립유전자에 대한 시퀀싱 판독 맵핑의 퍼센트를 의미하는, 유전적 품질;
- [0861] 1~15, 예를 들어 2~15, 5~15, 2~10, 2~5, 10~15의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/2;
- [0862] 1~30, 1~20, 2~20, 5~20, 3~15, 10~30의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/4o;
- [0863] 1~15, 2~15, 5~15, 1~10, 10~15의 숙시네이트/로테논 RCR 3/2;
- [0864] 1~30, 1~20, 2~20, 5~20, 3~15, 10~30의 숙시네이트/로테논 RCR 3/4o;
- [0865] 1~10(예를 들어 1~5)의 팔미토일 카르니틴 및 말레이트 RCR3/2 상태 3/상태 2 호흡기 조절비(RCR 3/2);
- [0866] 카디오리핀 함량 0.05~25(.1~20, .5~20, 1~20, 5~20, 5~25, 1~25, 10~25, 15~25) 100*pmol/pmol 총 지질;

- [0867] 계놈 농도 0.001~2(예를 들어 .001~1, .01~1, .01~.1, .01~.05, .1~.2) mtDNA ug/mg 단백질; 또는
- [0868] >1000(예를 들어 >1,500, >2000, >2,500, > 3,000, >4,000, >5000, >10,000, >25,000, >50,000, >100,000, >200,000, >500,000)의 mtDNA/핵 DNA의 상대비.
- [0869] 일부 구현예에서, 콘드리솜(또는 조성물 내 콘드리솜)은 하기 특징 중 하나 이상(2, 3, 4, 5, 6 이상)을 가진다:
- [0870] 조성물 내 콘드리솜은 150~1500 nm, 예를 들어 200~1200 nm, 예를 들어 500~1200 nm, 예를 들어 175~950 nm의 평균적인 평균 크기를 가진다;
- [0871] 조성물 내 콘드리솜은 1.1 내지 6, 예를 들어 1.5~5의 다분산성(D90/D10)을 가진다. 구현예에서, 배양된 세포 공급원(예를 들어 배양된 섬유아세포)으로부터의 조성물 내 콘드리솜은 2~5, 예를 들어 2.5~5의 다분산성(D90/D10)을 가진다;
- [0872] 외부 콘드리솜 막 온전성으로서, 여기서, 조성물은 환원된 시트크롬 c의 첨가 후 상태 4 속도에 걸쳐 산소 소모율에서 < 20%(예를 들어 < 15%, < 10%, < 5%, < 4%, < 3%, < 2%, < 1%)의 증가를 나타내는, 외부 콘드리솜 막 온전성;
- [0873] 1~8 mOD/ug 총 단백질, 예를 들어 3~7 mOD/ug 총 단백질, 1~5 mOD/ug 총 단백질의 복합체 I 수준. 구현예에서, 배양된 세포 공급원(예를 들어 배양된 섬유아세포)로부터의 조제물의 콘드리솜은 1~5 mOD/ug 총 단백질의 복합체 I 수준을 가진다;
- [0874] 0.05~5 mOD/ug 총 단백질, 예를 들어 0.1~4 mOD/ug 총 단백질, 예를 들어 0.5~3 mOD/ug 총 단백질의 복합체 II 수준. 구현예에서, 배양된 세포 공급원(예를 들어 배양된 섬유아세포)로부터의 조제물의 콘드리솜은 0.05~1 mOD/ug 총 단백질의 복합체 II 수준을 가진다;
- [0875] 1~30 mOD/ug 총 단백질, 예를 들어 2~30, 5~10, 10~30 mOD/ug 총 단백질의 복합체 III 수준을 가진다. 구현예에서, 배양된 세포 공급원(예를 들어 배양된 섬유아세포)으로부터의 콘드리솜은 1~5 mOD/ug 총 단백질의 복합체 III 수준을 가진다;
- [0876] 4~50 mOD/ug 총 단백질, 예를 들어 5~50, 예를 들어 10~50, 20~50 mOD/ug 총 단백질의 복합체 IV 수준. 구현예에서, 배양된 세포 공급원(예를 들어 배양된 섬유아세포)으로부터의 콘드리솜은 3~10 mOD/ug 총 단백질의 복합체 IV 수준을 가진다;
- [0877] 계놈 농도 0.001~2(예를 들어 .001~1, .01~1, .01~.1, .01~.05, .1~.2) mtDNA ug/mg 단백질;
- [0878] 조제물의 막 전위는 -5 내지 -200 mV, 예를 들어 -100 내지 -200 mV, -50 내지 -200 mV, -50 내지 -75 mV, -50 내지 -100 mV이다. 일부 구현예에서, 조제물의 막 전위는 -150 mV 미만, -100 mV 미만, -75 mV 미만, -50 mV 미만, 예를 들어 -5 내지 -20 mV이다;
- [0879] 100 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만(예를 들어 90 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 80 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 70 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 60 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 50 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 40 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 30 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 25 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 20 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 15 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 10 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 5 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 4 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만, 3 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만의 단백질 카르보닐 수준;
- [0880] < 20% mol/mol ER 단백질(예를 들어 >15%, >10%, >5%, >3%, >2%, >1%) mol/mol ER 단백질;
- [0881] >5% mol/mol 미토콘드리아 단백질(MitoCarta 데이터베이스(문헌[Calvo et al., NAR 20151 doi:10.1093/nar/gkv1003])에서 미토콘드리아로서 식별된 단백질), 예를 들어 >10%, >15%, >20%, >25%, >30%, >35%, >40%; >50%, >55%, >60%, >65%, >70%, >75%, >80%; >90% mol/mol 미토콘드리아 단백질);
- [0882] > 0.05% mol/mol의 MT-CO₂, MT-ATP6, MT-ND5 및 MT-ND6 단백질(조합된)(예를 들어 > 0.1%; > 0.5%, >1%, >2%, >3%, >4%, >5%, >7, >8%, >9%, >10, >15% mol/mol의 MT-CO₂, MT-ATP6, MT-ND5 및 MT-ND6 단백질);
- [0883] > 80%, 예를 들어 >85%, >90%, >95%, >97%, >98%, >99%의 유전적 품질;

- [0884] 상대비 mtDNA/핵 DNA는 >1000(예를 들어 >1,500, >2000, >2,500, > 3,000, >4,000, >5000, >10,000, >25,000, >50,000, >100,000, > 200,000, >500,000)이다;
- [0885] < 0.2 EU/ug 단백질(예를 들어 <0.1, 0.05, 0.02, 0.01 EU/ug 단백질)의 내독소 수준;
- [0886] 실질적으로 부재하는 외인성 비-인간 혈청;
- [0887] 1~15, 예를 들어 2~15, 5~15, 2~10, 2~5, 10~15의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/2;
- [0888] 1~30, 1~20, 2~20, 5~20, 3~15, 10~30의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/4o;
- [0889] 1~15, 2~15, 5~15, 1~10, 10~15의 숙시네이트/로테논 RCR 3/2;
- [0890] 1~30, 1~20, 2~20, 5~20, 3~15, 10~30의 숙시네이트/로테논 RCR 3/4o;
- [0891] 0.05~100 nmol/min/mg 총 단백질(예를 들어 .05~50, .05~20, .5~10, .1~50, 1~50, 2~50, 5~100, 1~20 nmol/min/mg 총 단백질)의 복합체 I 활성;
- [0892] 0.05~50 nmol/min/mg 총 단백질(예를 들어 .05~50, .05~20, .5~10, .1~50, 1~50, 2~50, 5~50, 1~20 nmol/min/mg 총 단백질)의 복합체 II 활성;
- [0893] 0.05~20 nmol/min/mg 총 단백질(예를 들어 .05~50, .05~20, .5~10, .1~50, 1~50, 2~50, 5~100, 1~20 nmol/min/mg 총 단백질)의 복합체 III 활성;
- [0894] 0.1~50 nmol/min/mg 총 단백질(예를 들어 .05~50, .05~20, .5~10, .1~50, 1~50, 2~50, 5~50, 1~20 nmol/min/mg 총 단백질)의 복합체 IV 활성;
- [0895] 1~500 nmol/min/mg 총 단백질(예를 들어 10~500, 10~250, 10~200, 100~500 nmol/min/mg 총 단백질)의 복합체 V 활성;
- [0896] 0.01~50 pmol H₂O₂/ug 단백질/hr(예를 들어 .05~40, .05~25, 1~20, 2~20, .05~20, 1~20 pmol H₂O₂/ug 단백질/hr)의 반응성 산소종(ROS) 생성 수준;
- [0897] 0.05~5(예를 들어 .5~5, .5~2, 1~5, 1~4) mOD/min/ug 총 단백질의 시트레이트 신타제 활성;
- [0898] 0.05~10(예를 들어 .1~10, .1~8, .5~8, .1~5, .5~5, .5~3, 1~3) mOD/min/ug 총 단백질의 알파 케토글루타레이트 데하이드로게나제 활성;
- [0899] 0.1~100(예를 들어 .5~50, 1~100, 1~50, 1~25, 1~15, 5~15) mOD/min/ug 총 단백질의 크레아틴 키나제 활성;
- [0900] 0.1~10(예를 들어 .5~10, .5~8, 1~10, 1~8, 1~5, 2~3) mOD/min/ug 총 단백질의 피루베이트 데하이드로게나제 활성;
- [0901] 0.1~50(예를 들어 5~50, .1~2, .1~20, .5~30) mOD/min/ug 총 단백질의 아코니타제 활성. 구현예에서, 혈소판으로부터의 콘드리움 조제물 내 아코니타제 활성은 .5~5 mOD/min/ug 총 단백질이다. 구현예에서, 배양된 세포, 예를 들어 섬유아세포로부터의 콘드리움 조제물 내 아코니타제 활성은 5~50 mOD/min/ug 총 단백질이다;
- [0902] 0.05~50(예를 들어 .05~40, .05~30, .05~10, .5~50, .5~25, .5~10, 1~5) pmol O₂/min/ug 콘드리움 단백질의 최대 지방산 산화 수준;
- [0903] 1~10(예를 들어 1~5)의 팔미토일 카르니틴 & 말레이트 RCR3/2 상태 3/상태 2 호흡기 조절비(RCR 3/2);
- [0904] 1~1000(예를 들어 10~1000, 10~800, 10~700, 50~1000, 100~1000, 500~1000, 10~400, 100~800) nmol Om/min/mg 단백질/△GATP(kcal/mol)의 전자 수송 사슬 효율;
- [0905] 50,000~2,000,000 pmol/mg(예를 들어 50,000~1,000,000; 50,000~500,000 pmol/mg)의 총 지질 함량;
- [0906] 0.8~8(예를 들어 1~5, 2~5, 1~7, 1~6) pmol/pmol의 이중 결합/총 지질 비;
- [0907] 50~100(예를 들어 60~80, 70~100, 50~80) 100*pmol/pmol의 인지질/총 지질 비;
- [0908] 0.2~20(예를 들어 .5~15, .5~10, 1~10, .5~10, 1~5, 5~20) 100*pmol/pmol의 포스포핑고지질/총 지질 비;
- [0909] 세라마이드 함량 0.05~5(예를 들어 .1~5, .1~4, 1~5, .05~3) 100*pmol/pmol 총 지질;

- [0910] 카디오리핀 함량 0.05~25(.1~20, .5~20, 1~20, 5~20, 5~25, 1~25, 10~25, 15~25) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0911] 리소~포스파티딜콜린(LPC) 함량 0.05~5(예를 들어 .1~5, 1~5, .1~3, 1~3, .05~2) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0912] 리소~포스파티딜에탄올아민(LPE) 함량 0.005~2(예를 들어 .005~1, .05~2, .05~1) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0913] 포스파티딜콜린(PC) 함량 10~80(예를 들어 20~60, 30~70, 20~80, 10~60m 30~50) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0914] 포스파티딜콜린-에테르(PC 0-) 함량 0.1~10(예를 들어 .5~10, 1~10, 2~8, 1~8) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0915] 포스파티딜에탄올아민(PE) 함량 1~30(예를 들어 2~20, 1~20, 5~20) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0916] 포스파티딜에탄올아민-에테르(PE 0-) 함량 0.05~30(예를 들어 .1~30, .1~20, 1~20, .1~5, 1~10, 5~20) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0917] 포스파티딜이노시톨(PI) 함량 0.05~15(예를 들어 .1~15, .1~10, 1~10, .1~5, 1~10, 5~15) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0918] 포스파티딜세린(PS) 함량 0.05~20(예를 들어 .1~15, .1~20, 1~20, 1~10, .1~5, 1~10, 5~15) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0919] 스핑고미엘린(SM) 함량 0.01~20(예를 들어 .01~15, .01~10, .5~20, .5~15, 1~20, 1~15, 5~20) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0920] 트리아실글리세롤(TAG) 함량 0.005~50(예를 들어 .01~50, .1~50, 1~50, 5~50, 10~50, .005~30, .01~25, .1~30) 100*pmol/pmol 총 지질;
- [0921] PE:LPE 비 30~350(예를 들어 50~250, 100~200, 150~300);
- [0922] PC:LPC 비 30~700(예를 들어 50~300, 50~250, 100~300, 400~700, 300~500, 50~600, 50~500, 100~500, 100~400);
- [0923] PE 18:n(n > 0) 함량 0.5~20%(예를 들어 1~20%, 1~10%, 5~20%, 5~10%, 3~9%) pmol AA / pmol 지질 클래스;
- [0924] PE 20:4 함량 0.05~20%(예를 들어 1~20%, 1~10%, 5~20%, 5~10%) pmol AA / pmol 지질 클래스;
- [0925] PC 18:n(n > 0) 함량 5~50%(예를 들어 5~40%, 5~30%, 20~40%, 20~50%) pmol AA / pmol 지질 클래스;
- [0926] PC 20:4 함량 1~20%(예를 들어 2~20%, 2~15%, 5~20%, 5~15%) pmol AA / pmol 지질 클래스.
- [0927] 소정의 구현예에서, 콘드리솜(또는 조성물 내 콘드리솜)은 수여자 세포, 조직 또는 대상체에게 투여 시 하기 특성 중 하나 이상을 가진다(대조군은 음성 대조군(예를 들어 조성물이 투여되지 않은 대조군 조직 또는 대상체)일 수 있거나, 또는 투여 전의 기준선, 예를 들어 조성물의 투여 전의 세포, 조직 또는 대상체일 수 있음):
- [0928] 대조군에 비해 수여자 세포의 기저 호흡을 적어도 10%(예를 들어 >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0929] 조성물 내 콘드리솜은 적어도 1%(예를 들어 적어도 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%)만큼의 수여자 세포에 의해 흡수된다;
- [0930] 조성물 내 콘드리솜은 수여자 세포에 흡수되고 막 전위를 유지시킨다;
- [0931] 조성물 내 콘드리솜은 수여자 세포에서 적어도 6시간, 예를 들어 적어도 12시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 1주, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월 지속된다;
- [0932] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 ATP 수준을 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 증가시킨다;
- [0933] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 세포자멸사를 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 저하시킨다;
- [0934] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 세포성 지질 수준을 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% 이상만큼) 저하시킨다;

- [0935] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 막 전위를 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 증가시킨다;
- [0936] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 언커플링 호흡을 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 증가시킨다;
- [0937] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 PI3K 활성을 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 증가시킨다;
- [0938] 수여자 세포, 조직 또는 대상체에서 환원적 스트레스(reductive stress)를 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 감소시킨다;
- [0939] 대상체의 세포, 조직에서(예를 들어 표적 대상체의 혈청에서) 반응성 산소종(예를 들어 H_2O_2)을 (예를 들어 기준값, 예를 들어 대조군 값, 예를 들어 비처리된 대조군과 비교하여 예를 들어 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상만큼) 저하시킨다;
- [0940] 수여자 세포의 세포성 지질 수준을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0941] 수여자 세포의 언커플링 호흡을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0942] 수여자 세포에서 미토콘드리아 투과성 변이공(MPTP; mitochondrial permeability transition pore) 형성을 대조군에 비해 적어도 5% 저하시키고, 10% 초과 증가시키지 않는다;
- [0943] 수여자 세포에서 Akt 수준을 대조군에 비해 적어도 10%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0944] 수여자 세포에서 총 NAD/NADH 비를 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0945] 수여자 세포에서 ROS 수준을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 감소시킨다;
- [0946] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 분획 단축율(fractional shortening)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0947] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 확장기말 용적(end diastolic volume)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0948] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 수축기말 용적(end systolic volume)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0949] 허혈성 심장의 경색 영역(infarct area)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0950] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 일회박출량(stroke volume)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0951] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 구혈률(ejection fraction)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0952] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 심박출량(cardiac output)을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;
- [0953] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 심장박출 지수(cardiac index)를 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%,

>20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 증가시킨다;

- [0954] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 CKMB 수준을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0955] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 cTnI 수준을 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0956] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 과산화수소를 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다;
- [0957] 대상체에서 혈청 콜레스테롤 수준 및/또는 트리글리세라이드를 대조군에 비해 적어도 5%(예를 들어 >10%, >15%, >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%) 저하시킨다.
- [0958] 일부 구현예에서, 푸소좀은 미토콘드리아 공급원으로부터 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 콘드리솜, 예를 들어 단리된 콘드리솜을 포함한다:
- [0959] 조성물 내 콘드리솜은 150~1500 nm의 평균적인 평균 크기를 가진다;
- [0960] 조성물 내 콘드리솜은 1.1 내지 6의 다분산성(D90/D10)을 가진다;
- [0961] 조성물 내 콘드리솜의 외부 콘드리솜 막 온전성은 환원된 시트크롬 c의 첨가 후 상태 4 속도에 걸쳐 산소 소모율에서 < 20%의 증가를 나타낸다;
- [0962] 1~8 mOD/ug 총 단백질의 복합체 I 수준;
- [0963] 0.05~5 mOD/ug 총 단백질의 복합체 II 수준;
- [0964] 1~30 mOD/ug 총 단백질의 복합체 III 수준;
- [0965] 4~50 mOD/ug 총 단백질의 복합체 IV 수준;
- [0966] 0.001~2 mtDNA ug/mg 단백질의 계층 농도; 및/또는
- [0967] 조성물 내 콘드리솜의 막 전위는 -5 내지 -200 mV이다.
- [0968] 일부 구현예에서, 푸소좀은 미토콘드리아 공급원으로부터 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 콘드리솜, 예를 들어 단리된 콘드리솜을 포함한다:
- [0969] 100 nmol 카르보닐/mg 콘드리솜 단백질 미만의 단백질 카르보닐 수준.
- [0970] < 20% mol/mol ER 단백질
- [0971] >5% mol/mol 미토콘드리아 단백질(MitoCarta);
- [0972] > 0.05% mol/mol의 MT-CO₂, MT-ATP6, MT-ND5 및 MT-ND6 단백질;
- [0973] 유전적 품질 > 80%;
- [0974] 상대비 mtDNA/핵 DNA >1000;
- [0975] 내독소 수준 < 0.2EU/ug 단백질; 및/또는
- [0976] 실질적으로 부재하는 외인성 비-인간 혈청.
- [0977] 일부 구현예에서, 푸소좀은 미토콘드리아 공급원으로부터 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 콘드리솜, 예를 들어 단리된 콘드리솜을 포함한다:
- [0978] 1~15의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/2;
- [0979] 1~30의 글루타메이트/말레이트 RCR 3/4o;
- [0980] 1~15의 숙시네이트/로테논 RCR 3/2;
- [0981] 1~30의 숙시네이트/로테논 RCR 3/4o;
- [0982] 0.05~100 nmol/min/mg 총 단백질의 복합체 I 활성;

- [0983] 0.05~50 nmol/min/mg 총 단백질의 복합체 II 활성;
- [0984] 0.05~20 nmol/min/mg 총 단백질의 복합체 III 활성;
- [0985] 0.1~50 nmol/min/mg 총 단백질의 복합체 IV 활성;
- [0986] 1~500 nmol/min/mg 총 단백질의 복합체 V 활성;
- [0987] 0.01~50 pmol H₂O₂/ug 단백질/hr의 반응성 산소종(ROS) 생성 수준;
- [0988] 0.05~5 mOD/min/ug 총 단백질의 시트레이트 신타제 활성;
- [0989] 0.05~10 mOD/min/ug 총 단백질의 알파 케토글루타레이트 데하이드로게나제 활성;
- [0990] 0.1~100 mOD/min/ug 총 단백질의 크레아틴 키나제 활성;
- [0991] 0.1~10 mOD/min/ug 총 단백질의 피루베이트 데하이드로게나제 활성;
- [0992] 0.1~50 mOD/min/ug 총 단백질의 아코니타제 활성;
- [0993] 0.05~50 pmol O₂/min/ug 콘드리솜 단백질의 최대 지방산 산화 수준;
- [0994] 1~10의 팔미토일 카르니틴 & 말레이트 RCR3/2 상태 3/상태 2 호흡기 조절비(RCR 3/2); 및/또는
- [0995] 1~1000 nmol O₂/min/mg 단백질/△GATP(kcal/mol)의 전자 수송 사슬 효율.
- [0996] 일부 구현예에서, 푸소솜은 미토콘드리아 공급원으로부터 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 콘드리솜, 예를 들어 단리된 콘드리솜을 포함한다:
- [0997] 50,000~2,000,000 pmol/mg의 총 지질 함량;
- [0998] 0.8~8 pmol/pmol의 이중 결합/총 지질 비;
- [0999] 50~100 100*pmol/pmol의 인지질/총 지질 비;
- [1000] 0.2~20 100*pmol/pmol의 포스포스핑고지질/총 지질 비;
- [1001] 세라마이드 함량 0.05~5 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1002] 카디오리핀 함량 0.05~25 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1003] 0.05~5 100*pmol/pmol 총 지질의 리소-포스파티딜콜린(LPC) 함량;
- [1004] 0.005~2 100*pmol/pmol 총 지질의 리소-포스파티딜에탄올아민(LPE) 함량;
- [1005] 10~80 100*pmol/pmol 총 지질의 포스파티딜콜린(PC) 함량;
- [1006] 0.1~10 100*pmol/pmol 총 지질의 포스파티딜콜린-에테르(PC O-) 함량;
- [1007] 포스파티딜에탄올아민(PE) 함량 1~30 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1008] 포스파티딜에탄올아민-에테르(PE O-) 함량 0.05~30 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1009] 포스파티딜이노시톨(PI) 함량 0.05~15 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1010] 포스파티딜세린(PS) 함량 0.05~20 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1011] 스핑고미엘린(SM) 함량 0.01~20 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1012] 트리아실글리세롤(TAG) 함량 0.005~50 100*pmol/pmol 총 지질;
- [1013] PE:LPE 비 30~350;
- [1014] PC:LPC 비 30~700;
- [1015] PE 18:n(n > 0) 함량 0.5~20% pmol AA / pmol 지질 클래스;
- [1016] PE 20:4 함량 0.05~20% pmol AA / pmol 지질 클래스;

- [1017] PC 18:n(n > 0) 함량 5~50% pmol AA / pmol 지질 클래스; 및/또는
- [1018] PC 20:4 함량 1~20%.
- [1019] 일부 구현예에서, 푸소좀은 미토콘드리아 공급원으로부터 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 콘드리좀, 예를 들어 단리된 콘드리좀을 포함한다:
- [1020] 수여자 세포의 기저 호흡을 적어도 10% 증가시킨다;
- [1021] 조성물 내 콘드리좀은 적어도 1%만큼의 수여자 세포에 의해 흡수된다;
- [1022] 조성물 내 콘드리좀은 수여자 세포에 흡수되고 막 전위를 유지시킨다;
- [1023] 조성물 내 콘드리좀은 수여자 세포에서 적어도 6시간 지속된다;
- [1024] 수여자 세포의 세포성 지질 수준을 적어도 5% 저하시킨다;
- [1025] 수여자 세포의 언커플링 호흡을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1026] 수여자 세포에서 미토콘드리아 투과성 변이공(MPTP) 형성을 적어도 5% 저하시키고 10% 초과 증가하지 않는다;
- [1027] 수여자 세포에서 Akt 수준을 적어도 10% 증가시킨다;
- [1028] 수여자 세포에서 총 NAD/NADH 비를 적어도 5% 저하시킨다; 및/또는
- [1029] 수여자 세포에서 ROS 수준을 적어도 5% 감소시킨다.
- [1030] 일부 구현예에서, 콘드리좀을 포함하는 푸소좀은 하기 특성 중 하나 이상을 가진다:
- [1031] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 분획 단백질을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1032] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 확장기말 용적을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1033] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 수축기말 용적을 적어도 5% 저하시킨다;
- [1034] 허혈성 심장의 경색 영역을 적어도 5% 저하시킨다;
- [1035] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 일회박출량을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1036] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 구혈률을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1037] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 심박출량을 적어도 5% 증가시킨다;
- [1038] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 심장박출 지수를 적어도 5% 증가시킨다;
- [1039] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 CKNB 수준을 적어도 5% 저하시킨다;
- [1040] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 cTnI 수준을 적어도 5% 저하시킨다; 및/또는
- [1041] 심장 허혈을 갖는 대상체에서 혈청 과산화수소를 적어도 5% 저하시킨다.
- [1042] 구현예에서, 콘드리좀을 포함하는 푸소좀은 (예를 들어 4℃, 0℃, -4℃, 또는 -20℃, -80℃에서) 적어도 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일, 30일, 45일, 60일, 90일, 120일, 180일 이상 동안 안정하다.
- [1043] 구현예에서, 작용제(예를 들어 콘드리좀)를 포함하는 푸소좀은 예를 들어 천연, 합성 또는 조작된 캡슐화 물질, 예컨대 지질계 물질, 소낭, 엑소좀, 지질 뗏목, 클라트린 코팅된 소낭, 또는 혈소판(미토입자), MSC 또는 정상 세포 미세소낭 막을 포함할 수 있다.
- [1044] 구현예에서, 콘드리좀을 포함하는 푸소좀은 조성물에서 150~20,000 ug 단백질/ml; 150~15,000 ug/ml; 200~15,000 ug/ml; 300~15,000 ug/ml; 500~15,000 ug/ml; 200~10,000 ug/ml; 200~5,000 ug/ml; 300~10,000 ug/ml; > 200 ug/ml; > 250 ug/ml; > 300 ug/ml; > 350 ug/ml; > 400 ug/ml; > 450 ug/ml; > 500 ug/ml; > 600 ug/ml; > 700 ug/ml; > 800 ug/ml; > 900 ug/ml; > 1 mg/ml; > 2 mg/ml; > 3 mg/ml; > 4 mg/ml; > 5 mg/ml; > 6 mg/ml; > 7 mg/ml; > 8 mg/ml; > 9 mg/ml; > 10 mg/ml; > 11 mg/ml; > 12 mg/ml; > 14 mg/ml; > 15 mg/ml(및 예를 들어 ≤ 20 mg/ml)이다.
- [1045] 구현예에서, 콘드리좀을 포함하는 푸소좀은 수여자 동물, 예를 들어 수여자 포유류, 예컨대 인간에서 바람직하

지 못한 면역 반응을 생성하지 않는다(예를 들어 수여자에서 IL-1-베타, IL-6, GM-CSF, TNF-알파의 수준, 또는 림프절 크기를 유의하게 증가시키지 않음).

[1046] 적재물에 대한 변형은 예를 들어, 국제 출원, PCT/US16/64251에 기재된 바와 같이, 콘드리움 또는 콘드리움의 공급원에 대한 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 본원에 기재된 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 사용하여 제조된 콘드리움을 포함한다.

[1047] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물, 예를 들어 미토콘드리아 또는 콘드리움을 포함하는 푸소좀 조성물은 하기 중 하나 이상(예를 들어 2, 3, 또는 4)을 할 수 있다:

[1048] a) 표적 세포에서 최대 호흡을 증가시킬 수 있으며, 예를 들어, 최대 호흡에서의 증가는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배, 또는 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 90%~100%, 1-배 ~ 2-배, 2-배 ~ 3-배, 3-배 ~ 4-배, 또는 4-배 ~ 5-배이다;

[1049] b) 표적 세포에서 여분 호흡 용량(spare respiratory capacity)을 증가시킬 수 있으며, 예를 들어, 여분 호흡 용량에서의 증가는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배, 또는 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 90%~100%, 1-배 ~ 2-배, 2-배 ~ 3-배, 3-배 ~ 4-배, 또는 4-배 ~ 5-배이다;

[1050] c) 표적 세포에서 미토콘드리아 생물발생을 자극할 수 있으며, 예를 들어, 미토콘드리아 생물발생을 자극하는 단계는 미토콘드리아 바이오매스를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배, 또는 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 90%~100%, 1-배 ~ 2-배, 2-배 ~ 3-배, 3-배 ~ 4-배, 또는 4-배 ~ 5-배만큼 증가시키는 단계를 포함한다; 또는

[1051] d) 표적 세포에서 핵 유전자의 전사를 조정할 수 있으며(예를 들어 자극하거나 저해할 수 있으며), 예를 들어, 핵 유전자의 전사체 수준에서의 변화는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배, 또는 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 90%~100%, 1-배 ~ 2-배, 2-배 ~ 3-배, 3-배 ~ 4-배, 또는 4-배 ~ 5-배이다.

[1052] 면역원성

[1053] 본원에 기재된 임의의 양태의 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 실질적으로 비-면역원성이다. 면역원성은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다.

[1054] 일부 구현예에서, 푸소좀은 표적 세포와 융합하여, 수여자 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 푸소좀에 융합된 수여자 세포는 면역원성에 대해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 세포 표면 상의 항체의 존재에 대해, 예를 들어 항-IgM 항체를 이용하여 염색함으로써 분석된다. 다른 구현예에서, 면역원성은 PBMC 세포 용해 검정법에 의해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 함께 인큐베이션되고, 그 후에 PBMC에 의한 세포의 용해에 대해 평가된다. 다른 구현예에서, 면역원성은 천연 살해(NK) 세포 용해 검정법에 의해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 NK 세포와 함께 인큐베이션되고, 그 후에 NK 세포에 의한 세포의 용해에 대해 평가된다. 다른 구현예에서, 면역원성은 CD8+ T-세포 용해 검정법에 의해 평가된다. 구현예에서, 수여자 세포는 CD8+ T-세포와 함께 인큐베이션되고, 그 후에 CD8+ T-세포에 의한 세포의 용해에 대해 평가된다.

[1055] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 실질적으로 비-면역원성, 예를 들어 줄기세포, 간엽 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 세르톨리 세포, 또는 망막 색소 상피 세포이거나 또는 이러한 세포인 것으로 공지된 세포의 막 대칭을 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 본원에 기재된 검정법에 의해 측정된 바와 같이 줄기세포, 간엽 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 세르톨리 세포, 또는 망막 색소 상피 세포의 면역원성보다 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하 더 큰 면역원성을 가진다.

[1056] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 상승된 수준의 면역억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상승된 수준은 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 또는 100-배이다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포로부터 부재하는 면역억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여 감소된 수준의 면역 활성화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 감소된 수준은 기준 세포와 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%,

30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 면역 활성화제는 푸소좀으로부터 실질적으로 부재한다.

- [1057] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 예를 들어 단백질에 의해 측정된 바와 같이, 공급원 세포, 예를 들어 실질적으로 비-면역원성 공급원 세포와 실질적으로 유사한 조성물을 갖는 막을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 공급원 세포의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 막 단백질을 포함하는 막을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 공급원 세포의 막 상에서 막 단백질의 발현 수준의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%에서 발현되는 막 단백질을 포함하는 막을 포함한다.
- [1058] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물, 또는 푸소좀 조성물이 유래되는 공급원 세포는 하기 특징 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 이상을 가진다:
- [1059] a. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 HeLa 세포와 비교하여, MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1060] b. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 본원에 기재된 기준 세포와 비교하여, 비제한적으로 LAG3, ICOS-L, ICOS, O_x40L, OX40, CD28, B7, CD30, CD30L 4-1BB, 4-1BBL, SLAM, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, B7-H3, 또는 B7-H4를 포함하는 하나 이상의 공동-자극성 단백질의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1061] c. 대식세포 포식(engulfment)을 억제시키는 표면 단백질, 예를 들어 CD47의 발현, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 검출 가능한 발현, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 대식세포 포식을 억제시키는 표면 단백질, 예를 들어 CD47의 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배 초과와 더 많은 발현;
- [1062] d. 가용성 면역억제성 사이토카인, 예를 들어 IL-10의 발현, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 검출 가능한 발현, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 가용성 면역억제성 사이토카인, 예를 들어 IL-10의 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배 초과와 더 많은 발현;
- [1063] e. 가용성 면역억제성 단백질, 예를 들어 PD-L1의 발현, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 검출 가능한 발현, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 가용성 면역억제성 단백질, 예를 들어 PD-L1의 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배 초과와 더 많은 발현;
- [1064] f. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 U-266 세포와 비교하여, 가용성 면역 자극하는 사이토카인, 예를 들어 IFN- γ 또는 TNF- α 의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1065] g. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 A549 세포 또는 SK-BR-3 세포와 비교하여, 내인성의 면역-자극성 항원, 예를 들어 Zg16 또는 Hormad1의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1066] h. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 검출 가능한 발현, HLA-E 또는 HLA-G의 발현;
- [1067] i. 예를 들어 NK 세포 활성화를 억제시키는 작용을 하는, 예를 들어 시알산을 함유하는 표면 글리코실화 프로파일;
- [1068] j. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, TCR α/β 의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1069] k. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 HeLa 세포와 비교하여, ABO 혈액군의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1070] l. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 부 조직적합성 항원(MHA; Minor Histocompatibility Antigen)의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현; 또는

- [1071] m. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 더 적은 미토콘드리아 MHA를 갖거나, 검출 가능한 미토콘드리아 MHA를 갖지 않는다.
- [1072] 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 4-1BB, B7, SLAM, LAG3, HVEM, 또는 LIGHT이고, 기준 세포는 HDLM-2이다. 일부 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 BY-H3이고, 기준 세포는 HeLa이다. 일부 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 ICOSL 또는 B7-H4이고, 기준 세포는 SK-BR-3이다. 일부 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 ICOS 또는 OX40이고, 기준 세포는 MOLT-4이다. 일부 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 CD28이고, 기준 세포는 U-266이다. 일부 구현예에서, 공동-자극성 단백질은 CD30L 또는 CD27이고, 기준 세포는 Daudi이다.
- [1073] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역계, 예를 들어 내재 면역계(innate immune system)에 의한 면역원성 반응을 실질적으로 도출하지 않는다. 구현예에서, 면역원성 반응은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다. 일부 구현예에서, 내재 면역계에 의한 면역원성 반응은 비제한적으로 NK 세포, 대식세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 수지상 세포, 비만 세포, 또는 감마/델타 T 세포를 포함하는 내재 면역 세포에 의한 반응을 포함한다. 일부 구현예에서, 내재 면역계에 의한 면역원성 반응은 가용성 혈액 구성성분 및 막 결합 구성성분을 포함하는 보체계에 의한 반응을 포함한다.
- [1074] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역계, 예를 들어 적응 면역계에 의한 면역원성 반응을 실질적으로 도출하지 않는다. 구현예에서, 면역원성 반응은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다. 일부 구현예에서, 적응 면역계에 의한 면역원성 반응은 비제한적으로 T 림프구(예를 들어 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및/또는 감마-델타 T 세포), 또는 B 림프구의 수 또는 활성에서의 변화, 예를 들어 증가를 포함하여 적응 면역 세포에 의한 면역원성 반응을 포함한다. 일부 구현예에서, 적응 면역계에 의한 면역원성 반응은 비제한적으로 사이토카인 또는 항체(예를 들어 IgG, IgM, IgE, IgA, 또는 IgD)의 수 또는 활성에서의 변화, 예를 들어 증가를 포함하여 가용성 혈액 구성성분의 증가된 수준을 포함한다.
- [1075] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 감소된 면역원성을 갖도록 변형된다. 면역원성은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포의 면역원성보다 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 더 적은 면역원성을 가진다.
- [1076] 본원에 기재된 임의의 양태의 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역원성을 감소시키도록, 예를 들어 약화시키도록 변형된, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 사용하여 변형된 계놈을 갖는 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래된다. 면역원성은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다.
- [1077] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 하기 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 이상이 결실되어 있는, 예를 들어 녹아내려 있는 포유류 세포로부터 유래된다:
- [1078] a. MHC 클래스 I, MHC 클래스 II 또는 MHA;
- [1079] b. 비제한적으로: LAG3, ICOS-L, ICOS, OX40L, OX40, CD28, B7, CD30, CD30L 4-1BB, 4-1BBL, SLAM, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, B7-H3, 또는 B7-H4를 포함하는 하나 이상의 공동-자극성 단백질;
- [1080] c. 가용성의 면역-자극성 사이토카인, 예를 들어 IFN-감마 또는 TNF- α ;
- [1081] d. 내인성의 면역-자극성 항원, 예를 들어 Zg16 또는 Hormad1;
- [1082] e. T-세포 수용체(TCR);
- [1083] f. ABO 혈액군을 인코딩하는 유전자, 예를 들어 ABO 유전자;
- [1084] g. 면역 활성화를 구동하는 전사 인자, 예를 들어 NFkB;
- [1085] h. MHC 발현을 조절하는 전사 인자, 예를 들어 클래스 II trans-활성자(CIITA), Xbox 5의 조절 인자(RFX5), RFX-연관 단백질(RFXAP), 또는 RFX 안키린 반복(RFXANK; RFXB로도 공지되어 있음); 또는
- [1086] i. MHC 클래스 I 발현을 감소시키는 TAP 단백질, 예를 들어 TAP2, TAP1, 또는 TAPBP.
- [1087] 일부 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 하기 중 1, 2, 3 이상을 갖는 면역억제제의 증가된 발현을 초래하는 유전적 변형을 갖는 공급원 세포로부터 유래된다(예를 들어, 유전적 변형 전에, 세포는 인자를 발현하지 않았음):

- [1088] a. 대식세포 포식을 억제시키는 표면 단백질, 예를 들어 CD47; 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, CD47의 증가된 발현;
- [1089] b. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 가용성 면역억제성 사이토카인, 예를 들어 IL-10, 예를 들어 IL-10의 증가된 발현;
- [1090] c. 가용성 면역억제성 단백질, 예를 들어 PD-1, PD-L1, CTLA4, 또는 BTLA; 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 세포 공급원과 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 면역억제성 단백질의 증가된 발현;
- [1091] d. 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 관용원성(tolerogenic) 단백질, 예를 들어 ILT-2 또는 ILT-4 효능제, 예를 들어 HLA-E 또는 HLA-G 또는 임의의 다른 내인성 ILT-2 또는 ILT-4 효능제, 예를 들어 HLA-E, HLA-G, ILT-2 또는 ILT-4 기준 세포의 증가된 발현; 또는
- [1092] e. 보체 활성을 억제시키는 표면 단백질, 예를 들어 보체 조절 단백질, 예를 들어 붕괴-가속 인자(DAF, CD55)에 결합하는 단백질, 예를 들어 인자 H(FH)-유사 단백질-1(FHL-1), 예를 들어 C4b-결합 단백질(C4BP), 예를 들어 보체 수용체 1(CD35), 예를 들어 막 보조인자 단백질(MCP, CD46), 예를 들어 프로팩틴(CD59), 예를 들어 전형적인 및 대안적인 보체 경로 CD/C5 컨버타제 효소를 저해하는 단백질, 예를 들어 MAC 조립을 조절하는 단백질; 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 보체 조절 단백질의 증가된 발현.
- [1093] 일부 구현예에서, 증가된 발현 수준은 기준 세포와 비교하여, 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2-배, 3-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 또는 100-배 더 높다.
- [1094] 일부 구현예에서, 푸소솜은 예를 들어 하기 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 이상을 갖는 면역 활성화제의 저하된 발현을 갖도록 변형된 공급원 세포로부터 유래된다:
- [1095] a. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 HeLa 세포와 비교하여, MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1096] b. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 본원에 기재된 기준 세포와 비교하여, 비제한적으로 LAG3, ICOS-L, ICOS, OX40L, OX40, CD28, B7, CD30, CD30L 4-1BB, 4-1BBL, SLAM, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, B7-H3, 또는 B7-H4를 포함하는 하나 이상의 공동-자극성 단백질의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1097] c. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 U-266 세포와 비교하여, 가용성 면역 자극하는 사이토카인, 예를 들어 IFN-감마 또는 TNF- α 의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1098] d. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 A549 세포 또는 SK-BR-3 세포와 비교하여, 내인성의 면역-자극성 항원, 예를 들어 Zg16 또는 Hormad1의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1099] e. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, T-세포 수용체(TCR)의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1100] f. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 HeLa 세포와 비교하여, ABO 혈액군의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1101] g. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, 면역 활성화를 구동하는 전사 인자, 예를 들어 NF κ B의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현;
- [1102] h. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 저각 세포와 비교하여, MHC 발현을 조절하는 전사 인자, 예를 들어 클래스 II trans-활성자(CIITA), Xbox 5의 조절 인자(RFX5), RFX-연관 단백질(RFXAP), 또는 RFX 안키린 반복(RFXANK; RFXB로도 공지되어 있음)의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현; 또는
- [1103] i. 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포, 또는 HeLa 세포와 비교하여, MHC 클래스 I 발현을 감소시키는 TAP 단백질, 예를 들어 TAP2, TAP1, 또는 TAPBP의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 더 적은 발현.

- [1104] 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 발현을 저하시키기 위해 렌티바이러스를 발현하는 shRNA를 사용하여 변형된, 포유류 세포, 예를 들어 간엽 줄기세포로부터 유래된 푸소좀 조성물은 비변형된 세포, 예를 들어 변형되지 않은 간엽 줄기세포와 비교하여, MHC 클래스 I의 더 적은 발현을 가진다. 일부 구현예에서, HLA-G의 발현을 증가시키기 위해 HLA-G를 발현하는 렌티바이러스를 사용하여 변형된, 포유류 세포, 예를 들어 간엽 줄기세포로부터 유래된 푸소좀 조성물은 비변형된 세포, 예를 들어 변형되지 않은 간엽 줄기세포와 비교하여, HLA-G의 더 적은 발현을 가진다.
- [1105] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 실질적으로 면역원성이 아닌 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래되며, 여기서, 공급원 세포는 T-세포 IFN-감마 분비를 예를 들어 시험관내에서 IFN-감마 ELISPOT 검정법에 의해 검정된 바와 같이 0 pg/mL 내지 >0 pg/mL의 수준에서 자극하며, 예를 들어 유도한다.
- [1106] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래되며, 여기서, 포유류 세포는 면역억제제, 예를 들어 글루코코티코이드(예를 들어 텍사메타손), 세포정지제(예를 들어 메토트렉세이트), 항체(예를 들어 무로모나브(Muromonab)-CD3), 또는 이뮤노필린 조절제(예를 들어 시클로스포린(Ciclosporin) 또는 라파마이신)로 처리된 세포 배양물로부터의 것이다.
- [1107] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래되며, 여기서, 포유류 세포는 외인성 작용제, 예를 들어 치료제를 포함한다.
- [1108] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래되며, 여기서, 포유류 세포는 재조합 세포이다.
- [1109] 일부 구현예에서, 푸소좀은 바이러스 이뮤노에바신(immunoevin), 예를 들어 hCMV US2, 또는 US11을 발현하도록 유전적으로 변형된 포유류 세포로부터 유래된다.
- [1110] 일부 구현예에서, 푸소좀의 표면, 또는 푸소좀이 유래되는 포유류 세포의 표면은, 면역원성 및 면역-매개 청소(clearance)를 감소시키는 중합체, 예를 들어 생용적합성 중합체, 예를 들어 PEG를 이용하여 공유 또는 비-공유 변형된다.
- [1111] 일부 구현예에서, 푸소좀의 표면, 또는 푸소좀이 유래되는 포유류 세포의 표면은 시알산, 예를 들어 당중합체(glycopolymer)를 포함하는 시알산을 이용하여 공유 또는 비-공유 변형되며, 이는 NK-억제성 글리칸 에피토프를 함유한다.
- [1112] 일부 구현예에서, 푸소좀의 표면, 또는 푸소좀이 유래되는 포유류 세포의 표면은 ABO 혈액군을 제거하기 위해, 예를 들어 글리코시다제 효소, 예를 들어 α -N-아세틸갈락토스아미니다제로 효소적으로 처리된다.
- [1113] 일부 구현예에서, 푸소좀의 표면, 또는 푸소좀이 유래되는 포유류 세포의 표면은 수여자의 혈액 유형과 매칭되는 ABO 혈액군을 생성하기 위해, 예를 들어 이러한 혈액군의 발현을 유도하기 위해 효소적으로 처리된다.
- [1114] 면역원성을 평가하기 위한 매개변수
- [1115] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 실질적으로 면역원성이 아니거나 면역원성의 감소를 갖도록 변형된, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 사용하여 변형된 공급원 세포, 예를 들어 포유류 세포로부터 유래된다. 공급원 세포 및 푸소좀 조성물의 면역원성은 본원에 기재된 임의의 검정법에 의해 결정될 수 있다.
- [1116] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 생체내 이식편 생존율에서 증가, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 증가를 가진다. 일부 구현예에서, 이식편 생존율은 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 생체내 이식편 생존율을 측정하는 검정법에 의해 결정된다.
- [1117] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 기형종 형성에서 증가, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 증가를 가진다. 일부 구현예에서, 기형종 형성은 적절한 동물 모델에서, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 기형종 형성을 측정하는 검정법에 의해 결정된다.
- [1118] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 기형종 생존율에서 증가, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 증가를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기형종 생존율의 검정법에서 1일 이상 동안 생존한다. 일부 구현예에서, 기형종 생존율은 적절한 동물 모델에서, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같

이 기형종 생존율을 측정하는 검정법에 의해 결정된다. 일 구현예에서, 기형종 형성은 실시예에 기재된 바와 같이, 고정된 조직, 예를 들어 냉동되거나 포르말린 고정된 조직의 이미징 분석, 예를 들어 IHC 염색, 형광 염색 또는 H&E에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 고정된 조직은 하기 항체 중 임의의 하나 또는 모두를 이용하여 염색될 수 있다: 항-인간 CD3, 항-인간 CD4, 또는 항-인간 CD8.

[1119] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 이식편 또는 기형종 내로의 CD8+ T 세포 침윤에서 감소, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가진다. 일 구현예에서, CD8 T 세포 침윤은 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 CD8+ T 세포 침윤을 측정하는 검정법, 예를 들어 조직학적 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물로부터 유래되는 기형종은 조직학 조직 절편의 50x 이미지 필드(image field)의 0%, 0.1%, 1% 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에서 CD8+ T 세포 침윤을 가진다.

[1120] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 이식편 또는 기형종 내로의 CD4+ T 세포 침윤에서 감소, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가진다. 일부 구현예에서, CD4 T 세포 침윤은 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 CD4+ T 세포 침윤을 측정하는 검정법, 예를 들어 조직학적 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물로부터 유래되는 기형종은 조직학 조직 절편의 50x 이미지 필드의 0%, 0.1%, 1% 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에서 CD4+ T 세포 침윤을 가진다.

[1121] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 이식편 또는 기형종 내로의 CD3+ NK 세포 침윤에서 감소, 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가진다. 일 구현예에서, CD3+ NK 세포 침윤은 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 CD3+ NK 세포 침윤을 측정하는 검정법, 예를 들어 조직학적 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물로부터 유래되는 기형종은 조직학 조직 절편의 50x 이미지 필드의 0%, 0.1%, 1% 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에서 CD3+ NK 세포 침윤을 가진다.

[1122] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델 내로의 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포의 하나 이상의 이식 후의 체액성 반응과 비교하여, 적절한 동물 모델, 예를 들어 본원에 기재된 동물 모델 내로 유래된 푸소좀의 하나 이상의 이식 후의 체액성 반응에서 감소에 의해 측정된 바와 같이 면역원성의 감소를 가진다. 일부 구현예에서, 체액성 반응의 감소는 혈청 시료 내에서 항-세포 항체 역가, 예를 들어 항-푸소좀 항체 역가에 의해, 예를 들어 ELISA에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물이 투여된 동물로부터의 혈청 시료는 비변형된 세포가 투여된 동물로부터의 혈청 시료와 비교하여, 항-세포 항체 역가의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가진다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물이 투여된 동물로부터의 혈청 시료는 증가된 항-세포 항체 역가, 예를 들어 기준선으로부터 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30% 또는 40%만큼 증가된 항-세포 항체 역가를 가지며, 예를 들어, 기준선은 푸소좀 조성물의 투여 전 동일한 동물로부터의 혈청 시료를 지칭한다.

[1123] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 대식세포 식작용의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여 대식세포 식작용에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, 대식세포 식작용의 감소는 예를 들어 실시예 82에 기재된 바와 같이, 시험관내에서 식작용 지수(phagocytosis index)를 검정함으로써 결정된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 대식세포 식작용의 시험관내 검정법에서 대식세포와 함께 인큐베이션된 경우, 예를 들어 실시예 82의 검정법에 의해 측정된 바와 같이, 0, 1, 10, 100 이상의 식작용 지수를 가진다.

[1124] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 PBMC에 의한 세포독성-매개 세포 용해의 감소를 가지며, 예를 들어 실시예 83의 검정법을 사용하여 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포 또는 간엽 줄기세포와 비교하여, 세포 용해에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가진다. 구현예에서, 공급원 세포는 외인성 HLA-G를 발현한다.

[1125] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 NK-매개 세포 용해의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, NK-매개 세포 용해에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, NK-매개 세포 용해는 시험관내에서 크롬 방출 검정법 또는 유로

품 방출 검정법에 의해 검정된다.

- [1126] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 CD8+ T-세포-매개 세포 용해의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, CD8 T 세포-매개 세포 용해에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, CD8 T 세포-매개 세포 용해는 시험관내에서 크롬 방출 검정법 또는 유포품 방출 검정법에 의해 검정된다. 구현예에서, 활성화 및/또는 증식은 실시예 85에 기재된 바와 같이 측정된다.
- [1127] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 CD4+ T-세포 증식 및/또는 활성화의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, CD4 T 세포 증식은 예를 들어 실시예 86에 기재된 바와 같이, 시험관내에서 검정된다(예를 들어 변형된 또는 비변형된 포유류 공급원 세포, 및 CD4+T-세포와 CD3/CD28 Dynabead의 공동-배양 검정법).
- [1128] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 T-세포 IFN-감마 분비의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, T-세포 IFN-감마 분비에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, T-세포 IFN-감마 분비는 시험관내에서 예를 들어 IFN-감마 ELISPOT에 의해 검정된다.
- [1129] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 면역원성 사이토카인의 분비의 감소, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 면역원성 사이토카인의 분비에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 가지며, 여기서, 면역원성 사이토카인의 분비는 시험관내에서 예를 들어 ELISA 또는 ELISPOT을 사용하여 검정된다.
- [1130] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 면역억제성 사이토카인의 증가된 분비를 초래하며, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 면역억제성 사이토카인의 분비에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 증가를 초래하며, 여기서, 면역억제성 사이토카인의 분비는 시험관내에서 예를 들어 ELISA 또는 ELISPOT을 사용하여 검정된다.
- [1131] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 HLA-G 또는 HLA-E의 발현의 증가, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 HLA-G 또는 HLA-E의 발현의 증가를 가지며, 여기서, HLA-G 또는 HLA-E의 발현은 시험관내에서 유세포분석, 예를 들어 FACS를 사용하여 검정된다. 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 HLA-G 또는 HLA-E의 증가된 발현, 예를 들어 비변형된 세포와 비교하여, 예를 들어 HLA-G 또는 HLA-E의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 증가된 발현을 갖도록 변형된 공급원 세포로부터 유래되며, 여기서, HLA-G 또는 HLA-E의 발현은 시험관내에서 유세포분석, 예를 들어 FACS를 사용하여 검정된다. 일부 구현예에서, 증가된 HLA-G 발현을 갖는 변형된 세포로부터 유래된 푸소좁 조성물은 기형종 형성 검정법, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 기형종 형성 검정법에서 예를 들어 감소된 면역 세포 침윤에 의해 측정된 바와 같이 감소된 면역원성을 실증한다.
- [1132] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 T 세포 저해제 리간드(예를 들어 CTLA4, PD1, PD-L1)의 발현의 증가, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, T 세포 저해제 리간드의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 발현 증가를 가지며, 여기서, T 세포 저해제 리간드의 발현은 시험관내에서 유세포분석, 예를 들어 FACS를 사용하여 검정된다.
- [1133] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 공동-자극 리간드의 발현의 저하, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포와 비교하여, 공동-자극 리간드의 발현에서 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 저하를 가지며, 여기서, 공동-자극 리간드의 발현은 시험관내에서 유세포분석, 예를 들어 FACS를 사용하여 검정된다.
- [1134] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II의 발현의 저하, 예를 들어 기준 세포, 예를 들어 공급원 세포와 다르게 유사한 비변형된 세포 또는 HeLa 세포와 비교하여, MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 발현 저하를 가지며, 여기서, MHC 클래스 I 또는 II의 발현은 시험관내에서 유세포분석, 예를 들어 FACS를 사용하여 검정된다.
- [1135] 일부 구현예에서, 푸소좁 조성물은 실질적으로 비-면역원성인 세포 공급원, 예를 들어 포유류 세포 공급원으로 부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역원성은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정량화될 수 있다. 일부 구현

예에서, 포유류 세포 공급원은 하기 특징 중 임의의 하나, 모두 또는 조합을 포함한다:

- [1136] a. 여기서, 공급원 세포는 자가 세포 공급원으로부터 획득되며; 예를 들어 푸소좀 조성물을 받을, 예를 들어 투여받을 수여자로부터 획득된 세포이다;
- [1137] b. 여기서, 공급원 세포는 푸소좀 조성물을 받을, 예를 들어 투여받을 수여자, 예를 들어 본원에 기재된 수여자의 성별과 매칭되는, 예를 들어 성별과 유사한 동종이계 세포 공급원으로부터 획득된다;
- [1138] c. 여기서, 공급원 세포는 예를 들어 하나 이상의 대립유전자에서 수여자의 HLA와 매칭되는 HLA인 동종이계 세포 공급원으로부터 획득된다;
- [1139] d. 여기서, 공급원 세포는 HLA 동형접합체인 동종이계 세포 공급원으로부터 획득된다;
- [1140] e. 여기서, 공급원 세포는 MHC 클래스 I 및 II가 결여된(또는 기준 세포와 비교하여 감소된 수준을 갖는) 동종이계 세포 공급원으로부터 획득된다; 또는
- [1141] f. 여기서, 공급원 세포는 비제한적으로 줄기세포, 간엽 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 세르톨리 세포, 또는 망막 색소 상피 세포를 포함하는, 실질적으로 비-면역원성인 세포 공급원으로부터 획득된다.
- [1142] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물이 투여되는 대상체는 푸소좀과 반응성인 기준의 항체(예를 들어 IgG 또는 IgM)를 갖거나, 이러한 항체를 갖는 것으로 공지되거나, 이러한 항체에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물이 투여되는 대상체는 검출 가능한 수준의, 푸소좀과 반응성인 기준의 항체를 갖지 않는다. 항체에 대한 시험은 예를 들어 실시예 78에 기재되어 있다.
- [1143] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물을 받은 대상체는 푸소좀과 반응성인 항체(예를 들어 IgG 또는 IgM)를 갖거나, 이러한 항체를 갖는 것으로 공지되거나, 이러한 항체에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물을 (예를 들어 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 이상) 받은 대상체는 검출 가능한 수준의, 푸소좀과 반응성인 항체를 갖지 않는다. 구현예에서, 항체의 수준은 2개의 시점 사이에서 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 또는 50% 초과로 발생하지 않으며, 제1 시점은 푸소좀의 제1 투여 전이고, 제2 시점은 푸소좀의 하나 이상의 투여 후이다. 항체에 대한 시험은 예를 들어 실시예 79에 기재되어 있다.
- [1144] *부가적인 치료제*
- [1145] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 부가적인 작용제, 예를 들어 치료제와 함께, 대상체, 예를 들어 수여자, 예를 들어 본원에 기재된 수여자에게 공동-투여된다. 일부 구현예에서, 공동-투여되는 치료제는 면역억제제, 예를 들어 글루코코티코이드(예를 들어 텍사메타손), 세포정지제(예를 들어 메토트렉세이트), 항체(예를 들어 무로노맙-CD3), 또는 이뮤노필린 조정제(예를 들어 시클로스포린 또는 라파마이신)이다. 구현예에서, 면역억제제는 푸소좀의 면역-매개 청소를 저하시킨다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역자극제, 예를 들어 보조제, 인터루킨, 사이토카인, 또는 케모카인과 함께 공동-투여된다.
- [1146] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물 및 면역억제제는 동일한 때에 투여되며, 예를 들어 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역억제제의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 면역억제제의 투여 후에 투여된다.
- [1147] 일부 구현예에서, 면역억제제는 저분자, 예컨대 이부프로펜, 아세트아미노펜, 사이클로스포린, 타크롤리무스(tacrolimus), 라파마이신, 미코페놀레이트(mycophenolate), 사이클로포스파미드, 글루코코티코이드, 시롤리무스(silrolimus), 아자트리오피ン(azathiopine), 또는 메토트렉세이트이다.
- [1148] 일부 구현예에서, 면역억제제는 비제한적으로: 무로노맙(muronomab)(항-CD3), 다클리주맙(Daclizumab)(항-IL12), 바실릭시맙(Basiliximab), 인플릭시맙(Infliximab)(항-TNFα), 또는 리툭시맙(rituximab)(항-CD20)을 포함하는 항체 분자이다.
- [1149] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물과 면역억제제의 공동-투여는 푸소좀 조성물의 단독 투여와 비교하여, 대상체에서 푸소좀 조성물의 증강된 지속성을 초래한다. 일부 구현예에서, 공동-투여에서 푸소좀 조성물의 증강된 지속성은 단독으로 투여되는 경우 푸소좀 조성물의 지속성과 비교하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 길다. 일부 구현예에서, 공동-투여에서 푸소좀 조성물의 증강된 지속성은 단독으로 투여되는 경우 푸소좀 조성물의 생존율과 비교하여, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 또는 30일 이상 더 길다.

- [1150] **전달**
- [1151] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 단백질, 지질 또는 화학적 푸소젠) 또는 푸소젠 결합 파트너는 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 표적 세포 또는 조직에 전달된다.
- [1152] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 단백질, 지질 또는 화학적 푸소젠) 또는 푸소젠 결합 파트너는 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 비-표적 세포 또는 조직에 전달된다.
- [1153] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 단백질 또는 지질 푸소젠) 또는 푸소젠 결합 파트너를 인코딩하는 핵산은 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 표적 세포 또는 조직에 전달된다.
- [1154] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 단백질, 지질 또는 화학적 푸소젠) 또는 푸소젠 결합 파트너의 발현을 상향 조절하거나 하향조절하는 폴리펩타이드, 핵산, 리보뉴클레오타이드, 또는 저분자는 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 표적 세포 또는 조직에 전달된다.
- [1155] 일부 구현예에서, 푸소젠(예를 들어 단백질, 지질 또는 화학적 푸소젠) 또는 푸소젠 결합 파트너의 발현을 상향 조절하거나 하향조절하는 폴리펩타이드, 핵산, 리보뉴클레오타이드, 또는 저분자는 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 비-표적 세포 또는 조직에 전달된다.
- [1156] 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 조직은 푸소좀의 전달 전에, 전달과 동일한 때에, 또는 전달 후에 융합율을 증가시키기 위해 (예를 들어 스트레스 또는 세포 분열을 유도함으로써) 변형된다. 일부 비제한적인 예는 허혈의 유도, 화학치료법, 항생제, 방사선 조사, 독소, 염증, 염증성 분자, 항염증 분자, 산 상해, 염기 상해, 화상, 폴리에틸렌 글리콜, 신경전달물질, 골수독성 약물, 성장 인자, 또는 호르몬의 처리, 조직 절제, 기아 (starvation), 및/또는 운동을 포함한다.
- [1157] 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 조직은 표적 조직으로의 푸소좀 수송율을 증가시키기 위해 혈관확장제(예를 들어 산화질소(NO), 일산화탄소, 프로스타사이클린(PGI₂), 니트로글리세린, 펜톨아민) 또는 혈관수축제(예를 들어 안지오텐신(AGT), 엔도텔린(EDN), 노르에피네프린))로 처리된다.
- [1158] 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 조직은 화학 작용제, 예를 들어 화학치료제로 처리된다. 이러한 구현예에서, 화학치료제는 표적 세포 또는 조직의 푸소젠 활성을 증강시키는 손상을 상기 표적 세포 또는 조직에 유도한다.
- [1159] 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 조직은 물리적 스트레스, 예를 들어 전기융합(electrofusion)으로 처리된다. 이러한 구현예에서, 물리적 스트레스는 표적 세포 또는 조직의 푸소젠 활성을 증강시키기 위해 상기 표적 세포 또는 조직의 막을 탈안정화시킨다.
- [1160] 일부 구현예에서, 표적 세포 또는 조직은 푸소좀과의 융합을 증강시키기 위해 작용제로 처리될 수 있다. 예를 들어, 특이적인 뉴런 수용체는 푸소젠 특성을 증강시키기 위해 항-우울제로 자극될 수 있다.
- [1161] 본원에 기재된 푸소좀을 포함하는 조성물은 순환계, 간계(hepatic system), 신장계(renal system), 심폐계(cardio-pulmonary system), 중추신경계, 말초신경계, 근골격계, 림프계, 면역계, 감각 신경계(시각, 청각, 후각, 촉각, 미각), 소화계, 내분비계(지방 조직 대사 조절을 포함함), 및 생식계에 투여되거나 표적화될 수 있다.
- [1162] 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 세포 또는 조직, 예를 들어 인간 세포 또는 조직에게 생체외로 전달된다. 일부 구현예에서, 조성물은 (예를 들어 외상, 질병, 저산소증, 허혈 또는 다른 손상으로부터) 상해를 입은 상태에 있는 생체외 조직에 전달된다.
- [1163] 일부 구현예에서, 푸소좀 조성물은 생체외 이식편(예를 들어 조직 외식편 또는 이식을 위한 조직, 예를 들어 인간 정맥, 근골격 이식편, 예컨대 뼈 또는 힘줄, 각막, 피부, 심장판, 신경; 또는 단리된 또는 배양된 기관, 예를 들어 인간 내로 이식되는 기관, 예를 들어 인간 심장, 간, 폐, 신장, 췌장, 장, 흉선, 눈)에 전달된다. 조성물은 이식편의 생존력, 호흡 또는 다른 기능을 향상시킨다. 조성물은 이식 전에, 동안에 및/또는 후에 조직 또는 기관에 전달될 수 있다.
- [1164] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 대상체로부터 유래된 세포 또는 조직에 생체외 전달된다. 일부 구현예에서, 세포 또는 조직은 대상체에게 재투여된다(즉, 세포 또는 조직은 자가임).
- [1165] 푸소좀은 임의의 포유류(예를 들어 인간) 조직, 예를 들어 상피, 결합, 근육 또는 신경 조직 또는 세포, 및 이들의 조합으로부터의 세포와 융합될 수 있다. 푸소좀은 임의의 진핵(예를 들어 포유류) 기관계, 예를 들어, 심

혈관계(심장, 맥관구조); 소화계(식도, 위, 간, 담낭, 췌장, 장, 결장, 직장 및 항문); 내분비계(시상하부, 뇌하수체, 송과체 또는 송과선, 갑상선, 부갑상선, 부신); 배설계(신장, 수뇨관, 방광); 림프계(림프, 림프절, 림프관, 편도선, 아데노이드, 흉선, 비장); 외피계(피부, 모발, 손발톱); 근육계(예를 들어 골격근); 신경계(뇌, 척수, 신경); 생식계(난소, 자궁, 유선, 고환, 수정관, 정낭, 전립선); 호흡계(인두, 후두, 기관, 기관지, 폐, 횡격막); 골격계(뼈, 연골) 및 이들의 조합에 전달될 수 있다.

[1166] 구현예에서, 푸소좀은 대상체에게 투여 시, 조직, 예를 들어 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, 위장관, 신장, 고환, 난소, 뇌, 생식 기관, 중추신경계, 말초신경계, 골격근, 내피, 내이, 지방 조직(예를 들어 갈색 지방 조직 또는 백색 지방 조직) 또는 눈을 표적화하며, 예를 들어, 투여된 푸소좀 집단 내 적어도 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 푸소좀은 예를 들어 실시예 87 또는 100의 검정법에 의해, 24, 48, 또는 72시간 후 표적 조직에 존재한다.

[1167] 구현예에서, 푸소좀은 줄기세포 또는 전구 세포의 공급원으로부터의 세포, 예를 들어 골수 기질 세포, 골수 유래 성인 전구 세포(MAPC), 내피 전구 세포(EPC), 아세포, 뇌실하대에서 형성된 중간 전구 세포, 신경 줄기세포, 근육 줄기세포, 위성 세포, 간 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 골수 기질 세포, 상피 줄기세포, 배아 줄기세포, 간엽 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 전구 세포, 근육 전구 세포, 근아세포, 심장근아세포, 신경 전구 세포, 신경교 전구 세포, 뉴런 전구 세포, 간아세포와 융합할 수 있다.

[1168] 구현예에서, 표적 세포는 암세포가 아니며, 예를 들어 신경교아종 세포가 아니다. 구현예에서, 표적 세포는 줄기세포 또는 완전히 분화된 세포이다.

[1169] 예를 들어 부착 받침(*landing pad*) 구현예에 대한 푸소젠 결합 파트너

[1170] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 막-밀폐 조제물을 표적 세포에 전달하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 푸소젠, 예를 들어 마이오마리 단백질질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 푸소좀, 예를 들어 막-밀폐 조제물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 핵산은, 대상체에서 푸소좀의 표면 상에서 푸소젠이 발현되는 것을 허용하는 조건 하에, 세포 내에 존재하지 않거나 세포 내에서 발현되지 않는다(예를 들어 존재하지만 전사되지 않거나 번역되지 않음). 일부 구현예에서, 상기 방법은 작용제, 예를 들어 치료제, 및 푸소젠 결합 파트너를 포함하며, 선택적으로 담체, 예를 들어 막을 포함하는 조성물을, 푸소좀 상의 푸소젠과 푸소젠 결합 파트너의 융합을 허용하는 조건 하에, 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 담체는 막, 예를 들어 지질 이중층을 포함하며, 예를 들어 작용제는 지질 이중층 내에 배치된다. 일부 구현예에서, 지질 이중층은 표적 세포와 융합하며, 이로써, 작용제를 대상체 내의 표적 세포에 전달한다.

[1171] 일 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너는 표적 세포, 예를 들어 본원에 개시된 표적 세포의 막(예를 들어 지질 이중층)에 배치된 moiety, 예를 들어 단백질 분자이다. 일 구현예에서, 막은 세포 표면 막, 또는 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아, 리소좀, 또는 골지체의 아세포성 막일 수 있다. 일 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너는 (예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해) 내인성적으로 발현되거나 외인성적으로 발현될 수 있다. 일 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너는 막에서 다른 푸소젠 결합 파트너와 클러스터(cluster)할 수 있다.

[1172] 일 구현예에서, 표적 세포의 막에서 푸소젠 결합 파트너, 또는 복수의 푸소젠 결합 파트너의 존재는, 표적 세포 (예를 들어 본원에 기재된 세포) 상의 푸소젠 결합 파트너와 푸소좀(예를 들어 본원에 기재된 푸소좀) 상의 푸소젠 사이의 상호작용, 예를 들어 결합을 용이하게 할 수 있는 중간면(interface)을 생성한다. 일부 구현예에서, 푸소좀 상의 푸소젠은 표적 세포 상의, 예를 들어 표적 세포의 막(예를 들어 지질 이중층) 상의 푸소젠 결합 파트너와 상호작용하여, 예를 들어 상기 파트너에 결합하여, 푸소좀과 아세포성 세포소기관의 융합을 유도한다. 일부 구현예에서, 푸소젠은 미토콘드리아를 포함하는 아세포성 세포소기관 상의 부착 받침 상의 푸소젠 결합 파트너와 상호작용하여, 예를 들어 상기 파트너에 결합하여, 푸소좀과 표적 막의 융합을 유도한다.

[1173] 푸소젠 결합 파트너는 표적 세포, 하기 고찰된 임의의 방법에 의해 예를 들어 본원에 개시된 표적 세포에서 도입될 수 있다.

[1174] 일 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너를 표적 세포에 도입하는 방법은 대상체(예를 들어 본원에 기재된 대상체)로부터 표적 세포의 (예를 들어 성분채집술 또는 생검을 통한) 제거, 예를 들어 추출, 및 푸소젠 결합 파트너가 표적 세포의 막 상에서 발현되는 것을 허용하는 조건 하에 푸소젠 결합 파트너의 투여, 예를 들어 상기 파트너에의 노출을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체외에서 푸소젠 결합 파트너를 발현하는 표적 세포를 푸소젠을 포함하는 푸소좀과 접촉시켜, 푸소좀과 표적 세포막의 융합을 유도하는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 푸소좀에 융합되는 표적 세포는 대상체 내로, 예를 들어 정맥내로 재도입된다.

- [1175] 일 구현예에서, 푸소젠 결합 파트너를 발현하는 표적 세포는 대상체 내로, 예를 들어 정맥내로 재도입된다. 일 구현예에서, 상기 방법은 푸소좀 상의 푸소젠과 표적 세포 상의 푸소젠 결합 파트너의 상호작용, 예를 들어 결합, 및 푸소좀과 표적 세포막의 융합을 허용하기 위해, 푸소젠을 포함하는 푸소좀을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [1176] 일부 구현예에서, 표적 세포는 내인성 세포 표면 분자, 예를 들어 푸소젠 결합 파트너, 예를 들어 기관, 조직, 또는 세포 표적화 분자의 발현을 증가시키거나 저하시키기 위해 후성적 변형자, 예를 들어 저분자 후성적 변형자로 처리되며, 여기서, 세포 표면 분자는 단백질, 글리칸, 지질 또는 저분자량 분자이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 내인성 세포 표면 분자, 예를 들어 푸소젠 결합 파트너, 예를 들어 기관, 조직, 또는 세포 표적화 분자의 발현을 증가시키기 위해 유전적으로 변형되며, 여기서, 세포 표면 분자는 단백질, 글리칸, 지질 또는 저분자량 분자이다. 일 구현예에서, 유전적 변형은 내인성 세포 표면 분자, 예를 들어 푸소젠 결합 파트너의 전사 활성자의 발현을 저하시킬 수 있다.
- [1177] 일 구현예에서, 표적 세포는 외인성 세포 표면 분자, 예를 들어 푸소젠 결합 파트너를 발현하도록, 예를 들어 과발현하도록 유전적으로 변형되며, 여기서, 세포 표면 분자는 단백질, 글리칸, 지질 또는 저분자량 분자이다.
- [1178] 일부 구현예에서, 표적 세포는 세포에서 외인성 푸소젠의 발현, 예를 들어 이식유전자의 전달을 증가시키기 위해 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 핵산, 예를 들어 DNA, mRNA 또는 siRNA는 예를 들어 세포 표면 분자(단백질, 글리칸, 지질 또는 저분자량 분자)의 발현을 증가시키거나 저하시키기 위해 표적 세포로 이송된다. 일부 구현예에서, 핵산은 푸소젠 결합 파트너의 억제자, 예를 들어 shRNA, 또는 siRNA 구축물을 표적화한다. 일부 구현예에서, 핵산은 푸소젠 결합 파트너 억제자의 저해제를 인코딩한다.
- [1179] **사용 방법**
- [1180] 본원에 기재된 약제학적 조성물의 투여는 경구, 흡입, 경피 또는 비경구(정맥내, 종양내, 복강내, 근육내, 공동내(intracavity) 및 피하) 투여에 의해서일 수 있다. 푸소좀은 단독으로 투여되거나 약제학적 조성물로서 제제화될 수 있다.
- [1181] 푸소좀은 단위-용량 조성물, 예컨대 단위 용량 경구, 비경구, 경피 또는 흡입 조성물 형태로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 혼합에 의해 제조되며, 경구, 흡입, 경피 또는 비경구 투여를 위해 적합하게 적응되고, 이와 같이 정제, 캡슐, 경구 액체 조제물, 분말, 과립, 함당정제(lozenge), 재구성 가능한 분말, 주사 가능하며 주입 가능한 용액 또는 현탁액 또는 좌제 또는 에어로졸의 형태일 수 있다.
- [1182] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물의 전달은 세포 분화, 탈분화 또는 trans-분화를 유도하거나 차단할 수 있다. 표적 포유류 세포는 전구 세포일 수 있다. 대안적으로, 표적 포유류 세포는 분화된 세포일 수 있고, 세포 운명 변경은 만능성(pluripotent) 전구 세포로의 탈분화를 구동하거나 이러한 탈분화를 차단하는 것을 포함한다. 세포 운명의 변화가 요망되는 상황에서, 유효량의, 세포 운명 유도성 분자 또는 신호를 인코딩하는 본원에 기재된 푸소좀이, 세포 운명의 변경이 유도되는 조건 하에 표적 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀은 세포 하위집단을 제1 표현형으로부터 제2 표현형으로 재프로그래밍하는 데 유용하다. 이러한 재프로그래밍은 일시적이거나 영구적일 수 있다. 선택적으로, 상기 재프로그래밍은 표적 세포가 중간 표현형을 채택하도록 유도한다.
- [1183] 또한, 표적 세포 집단에서 세포 분화를 감소시키는 방법이 제공된다. 예를 들어, 조성물이 전구 세포의 분화를 감소시키는 조건 하에, 하나 이상의 전구 세포 유형을 함유하는 표적 세포 집단은 본원에 기재된 푸소좀 조성물과 접촉된다. 소정의 구현예에서, 표적 세포 집단은 상해를 입은 조직 또는 수술적 처치에 의해 영향을 받는 조직을 포유류 대상체에 함유한다. 전구 세포는 예를 들어 기질 전구 세포, 신경 전구 세포, 또는 간엽 전구 세포이다.
- [1184] 적재물을 포함하는 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 이러한 적재물을 세포 조직 또는 대상체에게 전달하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 푸소좀 조성물의 투여에 의한 적재물의 전달은 세포성 단백질 발현 수준을 변형시킬 수 있다. 소정의 구현예에서, 투여되는 조성물은, 폴리펩타이드가 전달되는 세포에서 실질적으로 부재하거나 감소되어 있는 기능성 활성을 제공하는 하나 이상의 적재물(예를 들어 폴리펩타이드 또는 mRNA)의 (세포에서의 발현, 세포에서의 전달, 또는 세포 내에서의 유도를 통한) 상향조절을 지시한다. 예를 들어, 결측(missing) 기능성 활성은 사실상 효소적, 구조적 또는 조절적일 수 있다. 관련 구현예에서, 투여되는 조성물은, 폴리펩타이드가 상향조절되는 세포에서 존재하지만 실질적으로 부족한 기능성 활성을 (예를 들어 상승적으로) 증가시키는 하나 이상의 폴리펩타이드의 상향조절을 지시한다. 소정의 구현예에서, 투여되는 조성물은, 폴리펩타이드,

siRNA, 또는 miRNA가 전달되는 세포에서 존재하거나 상향조절되어 있는 기능성 활성을 억제시키는 하나 이상의 적재물(예를 들어 폴리캡타이드, siRNA, 또는 miRNA)의 (세포에서의 발현, 세포에서의 전달, 또는 세포 내에서의 유도를 통한) 하향조절을 지시한다. 예를 들어, 상향조절된 기능성 활성은 사실상 효소적, 구조적 또는 조절적일 수 있다. 관련 구현예에서, 투여되는 조성물은, 폴리캡타이드가 하향조절되는 세포에서 존재하지만 실질적으로 상향조절되어 있는 기능성 활성을 (예를 들어 상승적으로) 저하시키는 하나 이상의 폴리캡타이드의 하향조절을 지시한다. 소정의 구현예에서, 투여되는 조성물은, 소정의 기능적 활성의 상향조절 및 다른 기능적 활성의 하향조절을 지시한다.

[1185] 구현예에서, 푸소좀 조성물(예를 들어 미토콘드리아 또는 DNA를 포함하는 푸소좀 조성물)은 표적 세포 상에서 효과를 매개하고, 상기 효과는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일, 2, 3, 또는 4주, 또는 1, 2, 3, 6, 또는 12개월 동안 지속된다. 일부 구현예(예를 들어, 푸소좀 조성물이 외인성 단백질을 포함함)에서, 상기 효과는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일, 2, 3, 또는 4주, 또는 1, 2, 3, 6, 또는 12개월 미만 동안 지속된다.

[1186] *생체의 적용*

[1187] 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 생체외에서 세포 또는 조직, 예를 들어 인간 세포 또는 조직에 전달된다. 구현예에서, 조성물은 생체외에서 세포 또는 조직의 기능을 향상시키며, 예를 들어 세포 생존력, 호흡, 또는 다른 기능(예를 들어 본원에 기재된 또 다른 기능)을 향상시킨다.

[1188] 일부 구현예에서, 조성물은 (예를 들어 외상, 질병, 저산소증, 허혈 또는 다른 손상으로부터) 상해를 입은 상태에 있는 생체의 조직에 전달된다.

[1189] 일부 구현예에서, 조성물은 생체의 이식편(예를 들어 조직 이식편 또는 이식을 위한 조직, 예를 들어 인간 정맥, 근육격 이식편, 예컨대 뼈 또는 힘줄, 각막, 피부, 심장판, 신경; 또는 단리된 또는 배양된 기관, 예를 들어 인간 내로 이식되는 기관, 예를 들어 인간 심장, 간, 폐, 신장, 췌장, 장, 흉선, 눈)에 전달된다. 조성물은 이식 전에, 동안에 및/또는 후에 조직 또는 기관에 전달될 수 있다.

[1190] 일부 구현예에서, 조성물은 세포, 예를 들어 세포 조제물에 전달되거나, 이에 투여되거나, 이와 접촉된다. 세포 조제물은 세포 치료법 조제물(인간 대상체에게 투여되고자 하는 세포 조제물)일 수 있다. 구현예에서, 세포 조제물은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포, 예를 들어 재조합 CAR을 발현하는 세포를 포함한다. CAR을 발현하는 세포는 예를 들어 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 세포일 수 있다. 구현예에서, 세포 조제물은 신경 줄기세포 조제물이다. 구현예에서, 세포 조제물은 간엽 줄기세포(MSC) 조제물이다. 구현예에서, 세포 조제물은 조혈모 줄기세포(HSC) 조제물이다. 구현예에서, 세포 조제물은 섬세포(islet cell) 조제물이다.

[1191] *생체내 용도*

[1192] 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 대상체, 예를 들어 포유류, 예를 들어 인간에게 투여될 수 있다. 이러한 구현예에서, 대상체는 특이적인 질병 또는 질환(예를 들어 본원에 기재된 질병 또는 질환)의 위험에 있을 수 있거나, 이의 증상을 갖고 있을 수 있거나, 이것이 있는 것으로 진단받거나 이를 갖는 것으로 식별될 수 있다.

[1193] 일부 구현예에서, 푸소좀 공급원은 푸소좀 조성물이 투여되는 동일한 대상체로부터의 것이다. 다른 구현예에서, 이들은 상이할 수 있다. 예를 들어, 푸소좀 공급원 및 수여자 조직은 자가(동일한 대상체로부터) 또는 이종성(상이한 대상체로부터)일 수 있다. 어느 경우든지, 본원에 기재된 푸소좀 조성물에 대한 공여자 조직은 수여자 조직과 상이한 조직 유형일 수 있다. 예를 들어, 공여자 조직은 근육 조직일 수 있고, 수여자 조직은 결합 조직(예를 들어 지방 조직)일 수 있다. 다른 구현예에서, 공여자 조직 및 수여자 조직은 동일하거나 상이한 유형이지만, 상이한 기관계로부터의 것일 수 있다.

[1194] 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 암, 자가면역 질병, 감염성 질병, 대사 질병, 신경퇴행성 질병, 또는 유전적 질병(예를 들어 효소 결핍)을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 재생이 필요하다.

[1195] 일부 구현예에서, 푸소좀은 막 융합을 저해하는 단백질의 저해제와 공동-투여된다. 예를 들어, 서프레신(Suppressyn)은 세포-세포 융합을 저해하는 인간 단백질이다(문헌[Sugimoto et al., "A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion" Scientific Reports 3:1462 DOI: 10.1038/srep01462]). 따라서, 일부 구현예에서, 푸소좀은 시프레신(syppressyn)의 저해제, 예를 들어 siRNA 또는 저해성 항체와 공동-투여된다.

- [1196] 비-인간 적용
- [1197] 본원에 기재된 조성물은 또한, 비제한적으로: 가축 또는 일하는 동물(마로, 소, 돼지, 닭 등), 애완동물 또는 동물원 동물(고양이, 개, 도마뱀, 새, 사자, 호랑이 및 곰 등), 수생(aquaculture) 동물(어류, 게, 새우, 굴 등), 식물 중(나무, 작물, 장식화 등), 발효 중(사카로미아세스(saccharomyces) 등)을 포함하는 여러 가지 다른 유기체의 세포 또는 조직 기능 또는 생리학적 특성을 유사하게 조정하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 푸소좀 조성물은 이러한 비-인간 공급원으로부터 제조되고, 비-인간 표적 세포 또는 조직 또는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [1198] 푸소좀 조성물은 표적에 대해 자가, 동종이계 또는 이종성일 수 있다.
- [1199] 본원에서 인용된 모든 참조문헌 및 공개문헌은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [1200] 하기 실시예는 본 발명의 일부 구현예를 추가로 예시하기 위해 제공되지만, 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니고; 이들의 예시적인 성질에 의해, 당업자에게 공지된 다른 절차, 방법 또는 기술이 대안적으로 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [1201] 실시예
- [1202] 실시예 1. 화학적 처리(PEG)를 통한 제핵 푸소좀 세포의 발생
- [1203] Mito-DsRed(미토콘드리아 특이적 표적화된 염료) 발현 공여자 HeLa 세포를 0.25% 트립신으로 트립신처리하고, 수합하고, 500xg에서 5분 동안 회전시키고, PBS에서 1회 세척하고, 계수하였다. 후속적으로, 10×10^6 세포를 3 ml의, 10 ug/ml 시토크알라신-B가 보충된 완전 MEM-알파(+10% FBS, + 1% 페니실린/스트렙토마이신, + 글루타민) 중 12.5% 피콜(ficoll)에서 15분 동안 재현탁시켰다. 세포를 제핵시키기 위해, 이들 세포를 하기 피콜 분획(상부로부터 하부까지)으로 구성된 불연속 피콜 구배(gradient)로 이송하였다: 2 ml 12.5% 피콜, 0.5 ml 15% 피콜, 0.5 ml 16% 피콜, 2 ml 17% 피콜 구배, 2 ml 25% 피콜. 모든 피콜 구배 분획을 10 ug/ml 시토크알라신-B가 보충된 완전 DMEM에서 제조하였다. 구배를 Beckman SW-40 초원심분리기, Ti-70 로터 상에서 107971xg에서 37°C에서 1시간 동안 회전시켰다. 원심분리 후, 제핵 HeLa 세포를 17% 피콜 분획의 12.5%, 15%, 16% 및 1/2로부터 수합하고, 완전 DMEM(+10% FBS, + 1% 페니실린/스트렙토마이신, + 글루타민)에서 재현탁시키고, 500xg에서 5분 동안 회전시켜, 펠렛화하였다. 제핵된 Mito-DsRed 공여자 세포를 DMEM에서 2회 세척하였다. 동시에, Mito-GFP(미토콘드리아 특이적 표적화된 염료) 발현 수여자 HeLa 세포를 트립신처리하고, 계수하고, 융합을 위해 준비하였다.
- [1204] 융합을 위해, 제핵 Mito-DsRed 공여자 HeLa 세포를 50% 폴리에틸렌 글리콜 용액(DMEM 완전 w/10% DMSO에서 제조된 50% PEG w/v)에서 37°C에서 1분 동안 Mito-GFP 수여자 HeLa 세포(각각 200,000)와 1:1 비로 조합하였다. 후속적으로, 세포를 10 ml 완전 DMEM에서 3회 세척하고, 35 mm 유리-바닥 사분면 이미징 디쉬(quadrant imaging dish) 상에 50k 세포/사분면의 밀도로 평판배양하였으며, 이때, 각각의 사분면은 1.9 cm^2 의 면적을 가졌다.
- [1205] 실시예 2. 화학적 처리(PEG)를 통한 유핵 푸소좀 세포의 발생
- [1206] Mito-DsRed(미토콘드리아 특이적 표적화된 염료) 발현 공여자 HeLa 세포를 0.25% 트립신으로 트립신처리하고, 수합하고, 500xg에서 5분 동안 회전시키고, PBS에서 1회 세척하고, 계수하였다. 후속적으로, 2×10^6 세포를 완전 DMEM(+10% FBS, + 1% 페니실린/스트렙토마이신, + 글루타민)에서 재현탁시키고, 계수하고, 융합을 위해 준비하였다.
- [1207] Mito-DsRed 공여자 세포를 DMEM에서 3회 세척하였다. 동시에, Mito-GFP(미토콘드리아 특이적 표적화된 염료) 발현 수여자 HeLa 세포를 트립신처리하고, 계수하고, 융합을 위해 준비하였다.
- [1208] 융합을 위해, Mito-DsRed 공여자 HeLa 세포를 50% 폴리에틸렌 글리콜 용액(DMEM 완전 w/10% DMSO에서 제조된 50% PEG w/v)에서 37°C에서 1분 동안 Mito-GFP 수여자 HeLa 세포(각각 200,000)와 1:1 비로 조합하였다. 후속적으로, 세포를 10 ml 완전 DMEM에서 3회 세척하고, 35 mm 유리-바닥 사분면 이미징 디쉬 상에 50k 세포/사분면의 밀도로 평판배양하였으며, 이때, 각각의 사분면은 1.9 cm^2 의 면적을 가졌다.
- [1209] 실시예 3. 외인성 푸소좀을 발현하는 HeLa 세포의 생성
- [1210] 이 실시예는 외인성 푸소좀을 발현하는 조직 배양 세포의 생성을 기재한다. 하기 실시예는 임의의 단백질계 푸소좀에 동일하게 적용 가능하고, 일차 세포(현탁액 중 또는 부착성) 및 조직에서의 생성에 동일하게 적용 가능

하다. 소정의 사례에서, 융합을 유도하는 데 필요한 푸소젠 쌍(푸소젠 및 푸소젠 결합 파트너로서 나열됨)이 사용될 수 있다.

[1211] 푸소젠 유전자, 융합 실패 1(EFF-1)을, pIRES2-AcGFP1 벡터(Clontech) 내로 클로닝하고, 그 후에, 이 구축물을, 리포펙타민 2000 형질감염 시약(Invitrogen)을 사용하여 HeLa 세포(CCL-2TM, ATCC) 내로 형질감염시킨다. 푸소젠 결합 파트너 유전자, 앵커-세포 융합 실패 1(AFF-1)을 pIRES2 DsRed-Express 2 벡터(Clontech) 내로 클로닝하고, 이 구축물을, 리포펙타민 2000 형질감염 시약(Invitrogen)을 사용하여 HeLa 세포(CCL-2TM, ATCC) 내로 형질감염시킨다. 형질감염된 HeLa 세포를 37°C, 5% CO₂에서, GlutaMAX(GIBCO), 10% 태아 소 혈청(GIBCO) 및 500 mg/mL 제오신(zeocin)이 보충된 돌베코스 모디파이드 이글 배지(DMEM; Dulbecco's Modified Eagle 배지)에서 유지시킨다. EFF-1 발현 세포를, 형광 활성화된 세포 소팅(FACS)을 소팅함으로써 분리하여, EFF-1 푸소젠을 발현하는 GFP+ HeLa 세포의 순수한 집단을 얻는다. AFF-1 발현 세포를, 형광 활성화된 세포 소팅(FACS)을 소팅함으로써 분리하여, AFF-1 푸소젠 결합 파트너를 발현하는 DSRED+ HeLa 세포의 순수한 집단을 얻는다.

[1212] 실시예 4. 화학적으로 증강된 푸소젠 제핵 세포를 통한 세포소기관 전달

[1213] 실시예 1에서 기재된 바와 같이 생성되고 융합된 푸소젠 세포(Mito-DsRed 공여자 제핵 세포 및 Mito-GFP 수여자 HeLa 세포)를, 이미징 디쉬에서 침착 후 24시간째에 Zeiss LSM 780 도립 공초점 현미경(inverted confocal microscope) 상에서 63X 배율에서 이미지화하였다. Mito-DsRed 단독 및 Mito-GFP 단독만 발현하는 세포를 별도로 이미지화하여, Mito-DsRed 및 Mito-GFP 둘 모두가 동시에 존재하고 획득되는 조건에서 2개의 채널 사이에 신호 중첩이 없음을 보장하는 방식으로 획득 세팅을 설정하였다. 관심의 10개 영역을 완전히 비편향된 방식으로 선택하였으며, 이때, 유일한 기준은 최소 10개의 세포가 각각의 ROI 내에 함유되는 것이며, 따라서, 최소 100개의 세포가 다운스트림 분석에 이용 가능하였다. 이들 이미지에서 주어진 픽셀은, 채널(mito-DsRed 및 mito-GFP)에 대한 픽셀의 강도가 모든 3개 ROI에 걸쳐 각각의 제각기 채널에 대한 10%의 최대 강도 값보다 크다면, 미토콘드리아에 대해 양성인 것으로 결정되었다.

[1214] 세포 내 >50%의 미토콘드리아(mito-GFP+ 또는 mito-Ds-Red+인 모든 픽셀에 의해 식별됨)가 상기 지시된 역치를 기반으로 mitoDs-Red와 mito-GFP 둘 모두에 대해 양성이라는 기준을 기반으로, 세포소기관 전달을 이용한 융합 사건을 식별하였으며, 이는, 이들 단백질질을 함유하는 세포소기관(이러한 경우 미토콘드리아)이 전달되었으며, 융합되었고, 이들의 함량이 섞였음을 나타낸다. 24-시간 시점에서, 다수의 세포가 도 7에서 나타난 바와 같이 융합을 통한 양성 세포소기관 전달을 나타내었다. 이는, 공여자와 수여자 HeLa 세포 사이의 융합을 통한 양성 세포소기관 전달의 이미지이다. 백색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 미토콘드리아와 수여자 미토콘드리아 사이에서의 중첩을 나타낸다. 회색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 세포소기관과 수여자 세포소기관이 중첩되지 않는 곳을 나타낸다.

[1215] 실시예 5. 화학적으로 증강된 푸소젠 유핵 세포를 통한 세포소기관 전달

[1216] 실시예 2에서 기재된 바와 같이 생성되고 융합된 푸소젠 세포(Mito-DsRed 공여자 제핵 세포 및 Mito-GFP 수여자 HeLa 세포)를, 이미징 디쉬에서 침착 후 24시간째에 Zeiss LSM 780 도립 공초점 현미경 상에서 63X 배율에서 이미지화하였다. Mito-DsRed 단독 및 Mito-GFP 단독만 발현하는 세포를 별도로 이미지화하여, Mito-DsRed 및 Mito-GFP 둘 모두가 동시에 존재하고 획득되는 조건에서 2개의 채널 사이에 신호 중첩이 없음을 보장하는 방식으로 획득 세팅을 설정하였다. 관심의 10개 영역을 완전히 비편향된 방식으로 선택하였으며, 이때, 유일한 기준은 최소 10개의 세포가 각각의 ROI 내에 함유되는 것이며, 따라서, 최소 100개의 세포가 다운스트림 분석에 이용 가능하였다. 이들 이미지에서 주어진 픽셀은, 채널(mito-DsRed 및 mito-GFP)에 대한 픽셀의 강도가 모든 3개 ROI에 걸쳐 각각의 제각기 채널에 대한 20%의 최대 강도 값보다 크다면, 미토콘드리아에 대해 양성인 것으로 결정되었다.

[1217] 세포 내 >50%의 미토콘드리아(mito-GFP+ 또는 mito-Ds-Red+인 모든 픽셀에 의해 식별됨)가 상기 지시된 역치를 기반으로 mitoDs-Red와 mito-GFP 둘 모두에 대해 양성이라는 기준을 기반으로, 세포소기관 전달을 이용한 융합 사건을 식별하였으며, 이는, 이들 단백질질을 함유하는 세포소기관(이러한 경우 미토콘드리아)이 전달되었으며, 융합되었고, 이들의 함량이 섞였음을 나타낸다. 24-시간 시점에서, 다수의 세포가 도 8에서 나타난 바와 같이 융합을 통한 양성 세포소기관 전달을 나타내었다. 이는, 공여자와 수여자 HeLa 세포 사이의 융합을 통한 양성 세포소기관 전달의 이미지이다. 백색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 미토콘드리아와 수여자 미토콘드리아 사이에서의 중첩을 나타낸다. 회색으로 표시된 세포내 영역은 공여자 세포소기관과 수여자 세포소기관이 중첩되지

않는 곳을 나타낸다.

- [1218] 실시예 6: 단백질 증강된 푸소젠 제핵 세포를 통한 미토콘드리아의 전달
- [1219] 실시예 3에서 기재된 바와 같이 생성되고 융합된 푸소젠 세포를, 이미징 디쉬에서 침착 후 24시간째에 Zeiss LSM 780 도립 공초점 현미경 상에서 63X 배율에서 이미지화하였다. Mito-DsRed 단독 및 Mito-GFP 단독만 발현하는 세포를 별도로 이미지화하여, Mito-DsRed 및 Mito-GFP 둘 모두가 동시에 존재하고 획득되는 조건에서 2개의 채널 사이에 신호 중첩이 없음을 보장하는 방식으로 획득 세팅을 설정한다. 관심의 10개 영역을 완전히 비편향된 방식으로 선택하였으며, 이때, 유일한 기준은 최소 10개의 세포가 각각의 ROI 내에 함유되는 것이며, 따라서, 최소 수의 세포가 다운스트림 분석에 이용 가능하다. 이들 이미지에서 주어진 픽셀은, 채널(mito-DsRed 및 mito-GFP)에 대한 픽셀의 강도가 모든 3개 ROI에 걸쳐 각각의 제각기 채널에 대한 10%의 최대 강도 값보다 크다면, 미토콘드리아에 대해 양성인 것으로 결정된다.
- [1220] 세포 내 >50%의 미토콘드리아(mito-GFP+ 또는 mito-Ds-Red+인 모든 픽셀에 의해 식별됨)가 상기 지시된 역치를 기반으로 mitoDs-Red와 mito-GFP 둘 모두에 대해 양성이라는 기준을 기반으로, 세포소기관 전달을 이용한 융합 사건을 식별하였으며, 이는, 이들 단백질을 함유하는 세포소기관(이러한 경우 미토콘드리아)이 전달되었으며, 융합되었고, 이들의 함량이 섞였음을 나타낼 것이다. 24-시간 시점에서, 다수의 세포가 융합을 통한 양성 세포소기관 전달을 나타내는 것으로 예상된다.
- [1221] 실시예 7: 핵산 전기천공을 통한 푸소좀의 발생
- [1222] 이 실시예는 푸소젠을 인코딩하는 핵산(예를 들어 mRNA 또는 DNA)과 함께 세포 또는 소낭의 전기천공을 통한 푸소좀 발생을 기재한다.
- [1223] 퓨로마이신 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 클로닝된 단편(예를 들어 수포성 구내염 바이러스로부터의 당단백질[VSV-G], Oxford Genetics # OG592)의 오픈 리딩 프레임과 함께 포함하는 트랜스포자제(transposase) 벡터(System Biosciences, Inc.)를, 전기천공기(electroporator)(Amaxa) 및 293T 세포주 특이적 핵 형질감염 키트(Lonza)를 사용하여 293T 내에 전기천공시킨다.
- [1224] 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 3~5일 동안 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 퓨로마이신을 이용하여 선별한 후, 그 후에 세포를 1xPBS, 얼음-냉각된 용해 완충제(150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% 소듐 데옥시클로레이트, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 프로테아제 저해제 카테일(Abcam, ab201117))로 세척하고, 1회 당 10~15초 동안 3회 초음파처리한 후, 16,000 x g에서 20분 동안 원심분리한다. 웨스턴 블롯을 회수된 상층액 분획 상에서 VSV-G에 특이적인 프로브를 이용하여 수행하여, 안정하게 형질감염된 세포 또는 대조군 세포로부터 제조된 푸소좀으로부터의 VSV-G의 비-막 특이적 농도를 결정하고, VSV-G 단백질의 표준과 비교한다.
- [1225] 구현예에서, 안정하게 형질감염된 세포로부터의 푸소좀은 안정하게 형질감염되지 않은 세포로부터 발생된 푸소좀보다 더 많은 VSV-G를 가질 것이다.
- [1226] 실시예 8: 단백질 전기천공을 통한 푸소좀의 발생
- [1227] 이 실시예는 푸소좀을 발생시키기 위한 푸소젠의 전기천공을 기재한다.
- [1228] 대략 5×10^6 세포 또는 소낭을, 전기천공 형질감염 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하는 전기천공에 사용한다. 마스터 믹스를 설정하기 위해, 24 μg 의 정제된 단백질 푸소젠을 재현탁 완충제(키트에서 제공됨)에 첨가한다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 인큐베이션한다. 한편, 세포 또는 소낭을 멸균 시험관에 이송하고, 500 X g에서 5분 동안 원심분리한다. 상층액을 흡인하고, 펠렛을 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 가 없는 1 ml의 PBS에 재현탁시킨다. 그 후에, 푸소젠이 있는 완충제를 사용하여, 세포 또는 소낭의 펠렛을 재현탁시킨다. 세포 또는 소낭 현탁액을 또한, 최적화 조건에 사용하고, 이러한 조건은 펄스 전압, 펄스 폭 및 펄스 수가 다양하다. 전기천공 후, 푸소젠과 함께 전기천공된 세포 또는 소낭을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.
- [1229] 예를 들어, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.
- [1230] 실시예 9: 소낭 형성 및 원심분리를 통한 푸소좀의 발생 및 단리
- [1231] 이 실시예는 소낭화 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생 및 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 단리될 수 있는 방

법 중 하나이다.

- [1232] 푸소좀을 하기와 같이 제조한다. 대략 4×10^6 HEK-293T 세포를 완전 배지(DMEM + 10% FBS + Pen/Strep)에서 10 cm 디쉬에 접종한다. 접종 후 1일째에, 15 μ g의, 플라스미드 또는 바이러스를 발현하는 푸소좀을 세포에 전달한다. 푸소좀 발현을 위해 충분한 시간 후, 배지를, 100 μ M ATP가 보충된 신선한 배지로 조심스럽게 대체한다. 상층액을 푸소좀 발현 후 48~72시간째에 수합하고, 0.45 μ m 필터를 통한 여과에 의해 정제하고, 150,000 x g에서 1시간 동안 초원심분리한다. 펠렛화된 물질을 얼음 냉각된 PBS에서 밤새 재현탁시킨다. 푸소좀을 실험을 위해 요망되는 완충제에 재현탁시킨다.
- [1233] 예를 들어, 문헌[Mangeot et al., Molecular Therapy, vol. 19 no. 9, 1656-1666, Sept. 2011]을 참조한다.
- [1234] 실시예 10: 거대 형질막 푸소좀의 발생 및 단리
- [1235] 이 실시예는 소낭화 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생 및 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 단리될 수 있는 방법 중 하나이다. 푸소좀을 하기와 같이 제조한다.
- [1236] 간략하게는, 푸소좀을 발현하는 HeLa 세포를 완충제(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7.4)에서 2회 세척하고, 용액(GPMV 완충제 중 1 mM DTT, 12.5 mM 파라포름알데하이드, 및 1 mM N-에틸말레이미드)에 재현탁시키고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 우선, 100 x g에서 10분 동안 원심분리함으로써 세포를 제거하고, 그 후에 20,000 x g에서 4°C에서 1시간 동안 푸소좀을 수합함으로써, 푸소좀을 세포로부터 정제한다. 푸소좀을 실험을 위해 요망되는 완충제에 재현탁시킨다.
- [1237] 예를 들어, 문헌[Sezgin E et al. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant membrane plasma vesicles. Nat. Protocols. 7(6):1042-51 2012]를 참조한다.
- [1238] 실시예 11: 푸소좀 고스트의 발생 및 단리
- [1239] 이 실시예는 저장성 처리 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생 및 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 생성될 수 있는 방법 중 하나이다.
- [1240] 우선, 푸소좀을, 푸소좀을 발현하는 간엽 줄기세포(10^9 세포)로부터 주로, 세포가 파열되고 푸소좀이 형성되는 저장성 처리를 사용함으로써 단리한다. 구체적인 구현예에 따르면, 세포를 저장성 용액, Tris-마그네슘 완충제(TM, 예를 들어 4°C에서 pH 7.4 또는 pH 8.6, HCl을 이용한 pH 조정)에 재현탁시킨다. 세포 팽윤을 위상차 현미경을 사용하여 모니터링한다. 일단 세포가 팽윤되고 푸소좀이 형성되면, 현탁액을 균질화기에 놓는다. 전형적으로, 세포 계수 및 표준 AOPI 염색을 통해 측정된 바와 같이, 약 95% 세포 파열이 충분하다. 그 후에, 막/푸소좀을 보존을 위해 수크로스(0.25 M 이상)에 놓는다. 대안적으로, 푸소좀은 세포를 용해시키기 위해 당업계에서 공지된 다른 접근법, 예컨대 온화한(mild) 초음파처리(Arkiv anatomii, gistologii i embriologii; 1979, Aug, 77(8) 5-13; PMID: 496657), 냉동-해동(Nature. 1999, Dec 2;402(6761):551-5; PMID: 10591218), 프렌치-프레스(French-press)(Methods in Enzymology, Volume 541, 2014, Pages 169-176; PMID: 24423265), 바늘-통과(needle-passaging)(www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/nuclear-protein-extraction.html) 또는 세제-함유 용액에서의 용해(www.thermofisher.com/order/catalog/product/89900)에 의해 형성될 수 있다.
- [1241] 접착을 피하기 위해, 푸소좀을 플라스틱 튜브에 넣고, 원심분리한다. 적층된(laminated) 펠렛이 생성되며, 여기서, 최상부의 더 밝은 회색 층(lamina)은 대체로 푸소좀을 포함한다. 그러나, 전체 펠렛을 가공하여, 수율을 증가시킨다. 원심분리(예를 들어 4°C에서 3,000 rpm에서 15분 동안) 및 세척(예를 들어 20 용적의 Tris 마그네슘/TM-수크로스 pH 7.4)을 반복할 수 있다.
- [1242] 다음 단계에서, 푸소좀 분획은 불연속 수크로스 밀도 구배 내 부유(floatation)에 의해 분리한다. 소량의 과량의 상층액을 방지하여, 세척된 펠렛을 남기고, 이러한 펠렛은 현재 푸소좀, 핵, 및 불완전하게 파열된 전체 세포를 포함한다. TM, pH 8.6 중 부가적인 60% w/w 수크로스를 현탁액에 첨가하여, 굴절계 상에서 45% 수크로스의 관독을 제공한다. 이 단계 후, 모든 용액은 TM pH 8.6이다. 15 ml의 현탁액을 SW-25.2 셀룰로스 니트레이트 튜브에 넣고, 40% 및 35% w/w 수크로스의 15 ml 층을 각각 첨가하고, 그 후에 5 ml의 TM-수크로스(0.25 M)를 첨가함으로써, 불연속 구배를 현탁액에 걸쳐 형성한다. 그 후에, 시료를 4°C, 20,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한다. 핵 침강은 펠렛을 형성하며, 불완전하게 파열된 전체 세포를 40%~45% 중간면에서 수합하고, 푸소좀을 35%~40% 중간면에서 수합한다. 다수의 튜브로부터의 푸소좀을 수합하고, 풀링(pool)시킨다.

- [1243] 예를 들어, 국제 특허 공개, W02011024172A2를 참조한다.
- [1244] 실시예 12: 압출을 통한 푸소솜의 발생
- [1245] 이 실시예는 막을 통한 압출에 의해 제조되는 푸소솜을 기재한다.
- [1246] 간략하게는, 푸소솜을 발현하는 조혈모 줄기세포를 프로테아제 저해제 각테일(Set V, Calbiochem 539137-1ML)을 함유하는 혈청-무함유 배지에서 1×10^6 세포/mL의 밀도에서 37°C 현탁액에 존재한다. 세포를 루어 락 주사기(luer lock syringe)를 이용하여 흡인하고, 일단 일회용 5 mm 주사기 필터를 통해 깨끗한 튜브 내로 통과시킨다. 막이 오염되고 막히게 되면, 막을 치워 놓고, 새로운 필터를 부착한다. 전체 세포 현탁액이 필터를 통과한 후, 5 ml의 혈청-무함유 배지를, 임의의 잔여 물질을 필터(들)를 통해 세척하는 과정에 사용되는 모든 필터에 통과시킨다. 그 후에, 용액을 여과물 내의 압출된 푸소솜과 조합한다.
- [1247] 푸소솜은 동일한 방법에 따라 계속된 압출에 의해 크기가 더 감소될 수 있으며, 이때 필터 공극 크기는 5 mm로부터 0.2 mm의 범위까지 점점 더 작아진다. 최종 압출이 완료된 경우, 현탁액을 원심분리(크기에 의해 다양화하는 데 필요한 시간 및 속도)에 의해 펠렛화하고, 배지에 재현탁시킨다.
- [1248] 부가적으로, 이러한 과정에는, 압출에 대한 기존의 세포골격 구조의 영향을 저하시키기 위해, 액틴 세포골격 저해제의 사용이 보충될 수 있다. 간략하게는, 1×10^6 세포/mL 현탁액을, 500 nM 라트룬쿨린 B(ab144291, Abcam, Cambridge, MA)가 있는 혈청-무함유 배지에서 인큐베이션하고, 5% CO₂의 존재 하에 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 프로테아제 저해제 각테일을 첨가하고, 세포를 루어 락 주사기 내로 흡인시키고, 이때 압출을 이전에 기재된 바와 같이 수행한다.
- [1249] 푸소솜을 펠렛화하고, PBS에서 1회 세척하여, 세포골격 저해제를 제거한 후, 배지에 재현탁시킨다.
- [1250] 실시예 13: 단백질을 이용한 화학적 처리를 통한 푸소솜의 발생
- [1251] 이 실시예는 푸소솜을 발생시키기 위한 푸소솜의 화학적-매개 전달을 기재한다. 대략 5×10^6 세포 또는 소낭을 푸소솜의 화학적-매개 전달에 사용한다. 세포 또는 소낭을 50 μ l의 Opti-MEM 배지에 현탁시킨다. 마스터 믹스를 설정하기 위해, 24 μ g의 정제된 단백질을 25 μ l의 Opti-MEM 배지와 혼합하고, 뒤이어 2 μ l의 지질형질감염 시약 3000을 함유하는 25 μ l의 Opti-MEM을 첨가한다. 플레이트를 부드럽게 선회시키고(swirl) 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션함으로써 세포 또는 소낭 및 푸소솜 용액을 혼합하며, 따라서 푸소솜은 세포 또는 소낭 막 내로 혼입될 것이다. 그 후에, 푸소솜을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.
- [1252] 또한, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.
- [1253] 실시예 14: 푸소솜-함유 리포솜의 처리를 통한 푸소솜의 발생
- [1254] 이 실시예는 푸소솜을 발생시키기 위한, 공급원 세포로의 푸소솜의 리포솜-매개 전달을 기재한다. 대략 5×10^6 세포 또는 소낭을 푸소솜의 리포솜-매개 전달에 사용한다. 세포 또는 소낭을 50 μ l의 Opti-MEM 배지에 현탁시킨다. 푸소솜 단백질을 n-옥틸 b-D-글루코피라노시드의 존재 하에 세포로부터 정제한다. n-옥틸 b-D-글루코피라노시드는 내재성 막 단백질을 용해시키는 데 사용되는 온화한 세제이다. 그 후에, 문헌[Top et al., *EMBO* 24: 2980-2988, 2005]에 기재된 바와 같이, n-옥틸 b-D-글루코피라노시드-현탁된 단백질을 n-옥틸 b-D-글루코피라노시드로 예비포화된 LUV와 혼합하고, 뒤이어 n-옥틸 b-D-글루코피라노시드를 제거함으로써, 푸소솜 단백질을 크기가 큰(400 nm 직경) 단일층 소낭(LUV)으로 재구성한다. 마스터 믹스를 설정하기 위해, 24 μ g의 총 푸소솜 단백질을 함유하는 리포솜 매스(mass)를 50 μ l의 Opti-MEM 배지와 혼합한다. 그 후에, 리포솜의 용액 및 공급원 세포 또는 소낭을 조합하고, 플레이트를 부드럽게 선회시키고, 푸소솜-함유 리포솜 및 공급원 세포 또는 소낭의 용해를 허용하는 조건 하에 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션함으로써 전체 용액을 혼합하며, 따라서 푸소솜 단백질은 공급원 세포 또는 소낭 막 내로 혼입될 것이다. 그 후에, 푸소솜을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.
- [1255] 또한, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.
- [1256] 실시예 15: 세포로부터 자유롭게 방출되는 푸소솜 미세소낭의 분리

- [1257] 이 실시예는 원심분리를 통한 푸소좀의 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 단리될 수 있는 방법 중 하나이다.
- [1258] 푸소좀을, 푸소좀을 발현하는 세포로부터 분별 원심분리에 의해 단리한다. 배양 배지(DMEM + 10% 태아 소 혈청)를 우선, $>100,000 \times g$ 에서 1시간 동안 원심분리에 의해 작은 입자로 정제한다. 그 후에, 정제된 배양 배지를 사용하여, 푸소좀을 발현하는 마우스 배아 섬유아세포를 성장시킨다. 상기 세포를 $200 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리에 의해 배양 배지로부터 분리한다. 상층액을 수합하고, $500 \times g$ 에서 10분 동안 2회, $2,000 \times g$ 에서 15분 동안 1회, $10,000 \times g$ 에서 30분 동안 1회, 및 $70,000 \times g$ 에서 60분 동안 1회 순차적으로 원심분리한다. 자유롭게 방출되는 푸소좀을 최종 원심분리 단계 동안 펠렛화하고, PBS에 재현탁시키고, $70,000 \times g$ 에서 재펠렛화시킨다. 최종 펠렛을 PBS에 재현탁시킨다.
- [1259] 또한, 문헌[Wubbolts R et al. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: Potential Implications for their Function and Multivesicular Body Formation. J. Biol. Chem. 278:10963-10972 2003]을 참조한다.
- [1260] 실시예 16: 푸소좀의 물리적 제핵
- [1261] 이 실시예는 세포골격 불활성화 및 원심분리를 통한 푸소좀의 제핵을 기재한다. 이것은 푸소좀이 변형될 수 있는 방법 중 하나이다.
- [1262] 푸소좀을, 푸소좀을 발현하는 포유류 일차 또는 불멸화된 세포주로부터 단리한다. 세포를, 액틴 골격 저해제의 처리 및 초원심분리에 의해 제핵시킨다. 간략하게는, C2C12 세포를 수합하고, 펠렛화하고 12.5% 피콜 400(F2637, Sigma, St. Louis MO) 및 500 nM 라트루쿨린 B(ab144291, Abcam, Cambridge, MA)를 함유하는 DMEM에 재현탁시키고, $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 에서 30분 동안 인큐베이션한다. 현탁액을, 5% CO_2 의 존재 하에 37°C 에서 밤새 평형화시킨 DMEM에 용해된 증가하는 농도의 피콜 400을 함유하는 초원심분리기 튜브 내로 조심스럽게 층화(layer)시킨다(15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 1개 층 당 3 mL). 피콜 구매를 Ti-70 로터(Beckman-Coulter, Brea, CA)에서 32,300 RPM, 37°C 에서 60분 동안 회전시킨다. 초원심분리 후, 16 ~ 18% 피콜인 것으로 확인된 푸소좀을 제거하고, DMEM으로 세척하고, DMEM에 재현탁시킨다.
- [1263] 실시예 35에 기재된 바와 같이 Hoechst 33342를 이용한 핵 함량의 염색을 수행하고, 뒤이어 유세포분석 및/또는 이미징을 사용하여, 핵의 분출(ejection)을 확인할 것이다.
- [1264] 실시예 17: 방사선 조사를 통한 푸소좀의 변형
- [1265] 하기 실시예는 감마선 조사를 이용한 푸소좀의 변형을 기재한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 감마선 조사는 DNA에서 이중 가닥 절단을 유발하고, 세포가 세포자멸사를 겪도록 구동할 수 있다.
- [1266] 우선, 푸소좀을 발현하는 세포를 조직 배양 플라스크 또는 플레이트 상에서 (예를 들어 세포를 배양하거나 평판 배양함으로써) 합류 밀도(confluent density) 미만에서 단층으로 배양한다. 그 후에, 배지를 합류 플라스크로부터 제거하고, 세포를 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 무함유 HBSS로 행구고, 트립신처리하여, 세포를 배양 매트릭스로부터 제거한다. 그 후에, 세포 펠렛을 페니실린/스트렙토마이신이 없는 10 mL의 조직-배양 배지에서 재현탁시키고, 100-mm 페트리 디쉬로 이송한다. 펠렛 내 세포의 수는, 150 cm^2 플라스크 상에서 10~15 합류 MEF 배양물로부터 수득될 세포 수와 동등해야 한다. 그 후에, 세포를 γ -방사선원으로부터 4000 rad에 노출시켜, 푸소좀을 발생시킨다. 그 후에, 푸소좀을 세척하고, 사용될 최종 완충제 또는 배지에 재현탁시킨다.
- [1267] 실시예 18: 화학적 처리를 통한 푸소좀의 변형
- [1268] 하기 실시예는 미토마이신 C 처리를 이용한 푸소좀의 변형을 기재한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 미토마이신 C 처리는 세포 주기를 불활성화시킴으로써 푸소좀을 변형시킨다.
- [1269] 우선, 푸소좀을 발현하는 세포를 조직 배양 플라스크 또는 플레이트 상에서 (예를 들어 세포를 배양하거나 평판 배양함으로써) 합류 밀도에서 단층으로부터 배양한다. 1 mg/mL 미토마이신 C 스탁 용액을 배지에 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도까지 첨가한다. 그 후에, 플레이트를 인큐베이터에 2 내지 3시간 동안 되돌려 놓는다. 그 후에, 배지를 합류 플라스크로부터 제거하고, 세포를 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 무함유 HBSS로 행구고, 트립신처리하여, 세포를 배양 매트릭스로부터 제거한다. 그 후에, 세포를 세척하고, 사용될 최종 완충제 또는 배지에 재현탁시킨다.
- [1270] 예를 들어, 문헌[Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation, Current Protocols in Molecular Biology. David A. Conner 2001]을 참조한다.

- [1271] 실시예 19: 푸소좀에서 전사 활성의 결여
- [1272] 이 실시예는 푸소좀 발생에 사용되는 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서의 전사 활성을 정량화한다. 일 구현예에서, 전사 활성은 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서 낮거나 존재하지 않을 것이다.
- [1273] 푸소좀은 치료제의 전달을 위한 틀(chassis)이다. 세포 또는 국소 조직 환경에 고효율로 전달될 수 있는 치료제, 예컨대 miRNA, mRNA, 단백질 및/또는 세포소기관을 사용하여, 수여자 조직에서 정상적으로 활성이 아니거나, 병리학적으로 낮거나 높은 수준에서 활성인 경로를 조절할 수 있을 것이다. 일 구현예에서, 푸소좀이 전사를 할 수 없거나, 푸소좀이 이들의 부모 세포보다 낮은 전사 활성을 갖는다는 관찰은, 핵 물질의 제거가 충분히 발생하였음을 실증할 것이다.
- [1274] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 그 후에, 푸소좀을 발생시키는 데 사용되는 충분한 수의 푸소좀 및 부모 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서, 20% 태아 소 혈청, 1x 페니실린/스트렙토마이신 및 형광-태깅 가능한 알킨-뉴클레오사이드 EU를 함유하는 DMEM에서 6 웰 저-부착 멀티웰 플레이트 내로 1 시간 동안 평판배양한다. 음성 대조군의 경우, 충분한 수의 푸소좀 및 부모 세포를 또한, 20% 태아 소 혈청, 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하나 알킨-뉴클레오사이드 EU가 없는 DMEM에서 멀티웰 플레이트에 평판배양한다.
- [1275] 1시간 인큐베이션 후, 시료를 이미징 키트(ThermoFisher Scientific)에 대한 제조업체의 설명서에 따라 가공한다. 음성 대조군을 포함하는 세포 및 푸소좀 시료를 1xPBS 완충제로 3회 세척하고, 1xPBS 완충제에 재현탁시키고, 여기를 위해 488 nm 아르곤 레이저 및 530+/-30 nm 방출을 사용하여 유세포분석(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의해 분석한다. BD FACSDiva 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용하였다. 광 산란 채널을 선형 이득(linear gain) 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다.
- [1276] 일 구현예에서, 음성 대조군에서 530+/-30 nm 방출에 의해 측정된 바와 같은 전사 활성은 알킨-뉴클레오사이드 EU의 생략으로 인해 무의미할 것이다. 일부 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포보다 약 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하의 전사 활성보다 작을 것이다.
- [1277] 또한, 문헌[Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Oct 14;105(41):15779-84. doi: 10.1073/pnas.0808480105. Epub 2008 Oct 7]을 참조한다.
- [1278] 실시예 20: DNA 복제 또는 복제 활성의 결여
- [1279] 이 실시예는 푸소좀에서의 DNA 복제를 정량화한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 세포와 비교하여 DNA를 낮은 비율로 복제할 것이다.
- [1280] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀 및 부모 세포 DNA 복제 활성은 형광-태깅 가능한 뉴클레오타이드(ThermoFisher Scientific # C10632)의 혼입에 의해 평가된다. 디메틸설폭사이드 중 EdU 스타크 용액의 제조 후, 푸소좀 및 동등한 수의 세포를 10 μM의 최종 농도에서 EdU와 함께 2시간 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 시료를 3.7% PFA를 사용하여 15분 동안 고정시키고, 1xPBS 완충제, pH 7.4로 세척하고, 1xPBS 완충제, pH 7.4 중 0.5% 세제 용액에서 15분 동안 투과시킨다.
- [1281] 투과화(permeabilization) 후, 0.5% 세제를 함유하는 PBS 완충제 중 현탁액 내의 푸소좀 및 세포를 1xPBS 완충제, pH 7.4로 세척하고, 21℃에서 반응 각테일, 1xPBS 완충제, CuSO₄(구성성분 F), 아자이드-플루오로 488, 1x 반응 완충제 첨가제에서 30분 동안 인큐베이션한다.
- [1282] 푸소좀 및 세포 DNA 복제 활성에 대한 음성 대조군을 상기와 동일하게 처리하지만 1x 반응 각테일에 아자이드-플루오 488이 없는 시료로 제조한다.
- [1283] 그 후에, 세포 및 푸소좀 시료를 1xPBS 완충제에서 세척하고 재현탁시키고, 유세포분석에 의해 분석한다. 유세포분석을 488 nm 아르곤 레이저 여기가 있는 FACS 세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 수행하고, 530+/-30 nm 방출 스펙트럼을 수합한다. FACS 분석 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용한다. 광 산란 채널을 선형 이득 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다. 상대 DNA 복제 활성을 각각의 시료에서 아자이드-플루오 488의 중앙값 강도에 기초하여 계산한다. 모든 사건을 포워드 및 사이드 스캐터에서 포착한다(대안적으로, 게이트는 푸소좀 집단만 선별하도록 적용될 수 있음). 푸소좀의 중앙값 형광 강도 값으로부터 제각기의 음성 대조군 시료의 중앙값 형광 강도

값을 제함(substract)으로써, 푸소좀에 대한 정규화된 형광 강도 값을 결정한다. 그 후에, DNA 복제 활성의 정량적인 측정을 발생시키기 위해, 푸소좀 시료에 대한 정규화된 상대 DNA 복제 활성을 제각기의 유핵 세포 시료에 대해 정규화한다.

[1284] 일 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포보다 적은 DNA 복제 활성을 가진다.

[1285] 또한, 문헌[Salic, 2415-2420, doi: 10.1073/pnas.0712168105]를 참조한다.

[1286] 실시예 21: 핵산 적재물을 이용하여 푸소좀을 변형시키기 위한 전기천공

[1287] 이 실시예는 핵산 적재물을 이용한 푸소좀의 전기천공을 기재한다.

[1288] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 10^9 푸소좀 및 1 μ g의 핵산, 예를 들어 RNA를 전기천공 완충제(수(water) 중 1.15 mM 포타슘 포스페이트 pH 7.2, 25 mM 포타슘 클로라이드, 60% 요오딕사놀(iodixanol) w/v)에서 혼합한다. 푸소좀을, 전기천공 시스템(BioRad, 165-2081)을 사용하여 단일 4 mm 큐벳을 사용하여 전기천공시킨다. 푸소좀 및 핵산을 400 V, 125 μ F 및 ∞ ohm에서 전기천공시키고, 상기 큐벳을 얼음에 즉시 이송한다. 전기천공 후, 푸소좀을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.

[1289] 예를 들어, 문헌[Kamerkar et al., Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, *Nature*, 2017]을 참조한다.

[1290] 실시예 22: 단백질 적재물을 이용하여 푸소좀을 변형시키기 위한 전기천공

[1291] 이 실시예는 단백질 적재물을 이용한 푸소좀의 전기천공을 기재한다.

[1292] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 5×10^6 푸소좀을 전기천공 형질 감염 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하는 전기천공에 사용한다. 마스터 믹스를 설정하기 위해, 24 μ g의 정제된 단백질 적재물을 재현탁 완충제에 첨가한다(키트에서 제공됨). 혼합물을 실온에서 10분 동안 인큐베이션한다. 한편, 푸소좀을 멸균 시험관에 이송하고, 500 X g에서 5분 동안 원심분리한다. 상층액을 흡인하고, 펠렛을 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 가 없는 1 ml의 PBS에 재현탁시킨다. 그 후에, 단백질 적재물을 갖는 완충제를 사용하여, 푸소좀의 펠렛을 재현탁시킨다. 그 후에, 푸소좀 현탁액을 최적화 조건에 사용하고, 이러한 조건은 펄스 전압, 펄스 폭 및 펄스 수가 다양하다. 전기천공 후, 푸소좀을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.

[1293] 예를 들어, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.

[1294] 실시예 23: 핵산 적재물로 변형시키기 위한 푸소좀의 화학적 처리

[1295] 이 실시예는 화학적 처리를 통한 푸소좀 내로의 핵산 적재물의 로딩을 기재한다.

[1296] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 10^6 푸소좀을 10,000 g에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠렛화한다. 그 후에, 펠렛화된 푸소좀을 20 μ g DNA와 함께 TE 완충제(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)에 재현탁시킨다. 푸소좀:DNA 용액을, 푸소좀 막(시약 B, Cosmo Bio Co., LTD, Cat# ISK-GN-001-EX)을 가로지르는 DNA 투과성을 증가시키기 위해 온화한 세제로 처리한다. 상기 용액을 다시 원심분리하고, 펠렛을, DNA 로딩된 푸소좀과 표적 수여자 세포(시약 C, Cosmo Bio Co., LTD, Cat# ISK-GN-001-EX) 사이의 친화성을 증가시키기 위해, 양으로-하전된 펩타이드, 예컨대 프로타민 설페이트가 있는 완충제에 재현탁시킨다. DNA 로딩 후, 로딩된 푸소좀을 사용 전에 얼음 상에 유지시킨다.

[1297] 또한, 문헌[Kaneda, Y., et al., New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets*, 2003]을 참조한다.

[1298] 실시예 24: 단백질 적재물로 변형시키기 위한 푸소좀의 화학적 처리

[1299] 이 실시예는 화학적 처리를 통한 푸소좀 내로의 단백질 적재물의 로딩을 기재한다.

[1300] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 10^6 푸소좀을 10,000 g에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠렛화한다. 그 후에, 펠렛화된 푸소좀을, 푸소좀과 적재물 단백질 (시약 A,

Cosmo Bio Co., LTD, Cat# ISK-GN-001-EX) 사이의 친화성을 증가시키기 위해, 양으로-하전된 펩타이드, 예컨대 프로타민 설페이트가 있는 완충제에 재현탁시킨다. 다음, 10 μ g의 적재물 단백질을 푸소솜 용액에 첨가하고, 푸소솜 막(시약 B, Cosmo Bio Co., LTD, Cat# ISK-GN-001-EX)을 가로지르는 단백질 투과성을 증가시키기 위해 온화한 세제로 처리한다. 상기 용액을 다시 원심분리하고, 펠렛을, 단백질 로딩된 푸소솜과 표적 수여자 세포(시약 C, Cosmo Bio Co., LTD, Cat# ISK-GN-001-EX) 사이의 친화성을 증가시키기 위해, 양으로-하전된 펩타이드, 예컨대 프로타민 설페이트가 있는 완충제에 재현탁시킨다. 단백질 로딩 후, 로딩된 푸소솜을 사용 전에 얼음 상에 유지시킨다.

[1301] 또한, 문헌[Yasouka, E., et al., Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. *J. Mol. Med.*, 2007]을 참조한다.

[1302] 실시예 25: 핵산 적재물로 변형시키기 위한 푸소솜의 형질감염

[1303] 이 실시예는 푸소솜 내로의 핵산 적재물(예를 들어 DNA 또는 mRNA)의 형질감염을 기재한다. 푸소솜을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다.

[1304] 5×10^6 푸소솜을 Opti-Mem에서 유지시킨다. 0.5 μ g의 핵산을 25 μ l의 Opti-MEM 배지와 혼합하고, 뒤이어 2 μ l의 지질 형질감염 시약 2000을 함유하는 25 μ l의 Opti-MEM을 첨가한다. 핵산, Opti-MEM, 및 지질 형질감염 시약의 혼합물을 실온에서 15분 동안 유지시키고, 그 후에 푸소솜에 첨가한다. 플레이트를 부드럽게 선회시키고 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션함으로써 전체 용액을 혼합한다. 그 후에, 푸소솜을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.

[1305] 또한, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.

[1306] 실시예 26: 단백질 적재물로 변형시키기 위한 푸소솜의 형질감염

[1307] 이 실시예는 푸소솜 내로의 단백질 적재물의 형질감염을 기재한다.

[1308] 푸소솜을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 5×10^6 푸소솜을 Opti-Mem에서 유지시킨다. 0.5 μ g의 정제된 단백질을 25 μ l의 Opti-MEM 배지와 혼합하고, 뒤이어 2 μ l의 지질 형질감염 시약 3000을 함유하는 25 μ l의 Opti-MEM을 첨가한다. 단백질, Opti-MEM, 및 지질 형질감염 시약의 혼합물 실온에서 15분 동안 유지시키고, 그 후에 푸소솜에 첨가한다. 플레이트를 부드럽게 선회시키고 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션함으로써 전체 용액을 혼합한다. 그 후에, 푸소솜을 PBS로 세척하고, PBS에 재현탁시키고, 얼음 상에 유지시킨다.

[1309] 또한, 문헌[Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *Journal of Biotechnology* 208: 44-53, 2015]를 참조한다.

[1310] 실시예 27: 지질 이중층 구조를 갖는 푸소솜

[1311] 이 실시예는 푸소솜의 조성물을 기재한다. 일 구현예에서, 푸소솜 조성물은 중앙부(center)에 내강이 있는 지질 이중층 구조를 포함할 것이다.

[1312] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 푸소솜의 지질 이중층 구조는 표적 세포와의 융합을 촉진하고, 푸소솜이 상이한 치료제를 로딩하는 것을 허용한다.

[1313] 푸소솜을 이전의 실시예에 기재된 방법을 사용하여 신선하게 제조한다. 양성 대조군은 선천적 세포주 (HEK293) 이고, 음성 대조군은 냉각 DPBS 및 막-붕괴된 HEK293 세포 조제물이며, 이는 36 게이지 바늘에 50회 동안 통과시킨 것이었다.

[1314] 시료를 에펜도르프 튜브에서 회전 하강시키고, 상층액을 조심스럽게 제거한다. 그 후에, 미리-가온된 고정제 용액(0.1M NaCl가 있는 0.05 M 카코딜레이트(cacodylate) 완충제 중 2.5% 글루타르알데하이드, pH 7.5; 사용 전에 37°C에서 30분 동안 유지시킴)을 시료 펠렛에 첨가하고, 실온에서 20분 동안 유지시킨다. 고정 후, 시료를 PBS로 2회 세척한다. 오스뮴 테트라옥사이드 용액을 시료 펠렛에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션한다. PBS로 1회 행군 후, 30%, 50%, 70% 및 90% 핵실렌 글리콜을 첨가하고, 각각 15분 동안 선회시키면서 세척한다. 그 후에, 100% 핵실렌 글리콜을 첨가하고, 이때, 각각 10분 동안 3회 선회시킨다.

[1315] 수지를 핵실렌 글리콜과 1:2 비로 조합하고, 그 후에, 시료에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한다.

인큐베이션 후, 용액을 100% 수지로 대체하고, 4~6시간 동안 인큐베이션한다. 이 단계를 신선한 100% 수지로 1회 이상 반복한다. 그 후에, 이를 100% 신선한 수지로 대체하고, 수준을 약 1 내지 2 mm 깊이까지 조정하고, 8~12시간 동안 베이킹(bake)한다. 에펜도르프 튜브를 절단하고, 시료와 함께 에폭시 캐스트(cast) 조각을 부가적인 16~24시간 동안 베이킹한다. 그 후에, 에폭시 캐스트를 작은 조각으로 절단하여, 세포가 있는 면을 표시(note)한다. 조각들을, 상업적인 5-분 에폭시 글루(glue)를 사용하여 절편용 블락으로 접착한다. 투과 전자 현미경(JOEL, USA)을 사용하여, 시료를 80 kV의 전압에서 이미징한다.

[1316] 일 구현예에서, 푸소좀은 양성 대조군 (HEK293 세포)과 유사한 지질 이중층 구조를 보여줄 것이고, DPBS 대조군에서는 어떠한 명확한 구조도 관찰되지 않는다. 일 구현예에서, 붕괴된 세포 조제물에서 어떠한 내강 구조도 관찰되지 않을 것이다.

[1317] 실시예 28: 푸소젠 발현의 검출

[1318] 이 실시예는 푸소좀에서 푸소젠 발현을 정량화한다.

[1319] 퓨로마이신 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임을 클로닝된 단편(예를 들어 수포성 구내염 바이러스로부터의 당단백질[VSV-G], Oxford Genetics # OG592)의 오픈 리딩 프레임과 함께 포함하는 트랜스포자제 벡터(System Biosciences, Inc.)를, 전기천공기(Amaxa) 및 293T 세포주 특이적 핵 형질감염 키트(Lonza)를 사용하여 293T 내에 전기천공시킨다.

[1320] 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 3~5일 동안 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 퓨로마이신을 이용하여 선별한 후, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해, 안정하게 발현하는 세포주로부터 또는 대조군 세포로부터 제조한다.

[1321] 그 후에 푸소좀을 1xPBS, 얼음-냉각된 용해 완충제(150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% 소듐 데옥시클로레이트, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 프로테아제 저해제 콕테일(Abcam, ab201117))로 세척하고, 1회 당 10~15초 동안 3회 초음파처리한 후, 16,000 x g에서 20분 동안 원심분리한다. 웨스턴 블롯을 회수된 상층액 분획 상에서 VSV-G에 특이적인 프로브를 이용하여 수행하여, 안정하게 형질감염된 세포 또는 대조군 세포로부터 제조된 푸소좀으로부터의 VSV-G의 비-막 특이적 농도를 결정하고, VSV-G 단백질의 표준과 비교한다.

[1322] 일 구현예에서, 안정하게 형질감염된 세포로부터의 푸소좀은 안정하게 형질감염되지 않은 세포로부터 발생된 푸소좀보다 더 많은 VSV-G를 가질 것이다.

[1323] 실시예 29: 푸소젠의 정량화

[1324] 이 실시예는 1개 푸소좀 당 푸소젠의 절대수의 정량화를 기재한다.

[1325] 푸소좀 조성물을, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 GFP 태깅된 푸소젠(VSV-G)을 발현하도록 조작하는 점을 제외하고는, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 또한, 음성 대조군 푸소좀을, 푸소젠이 없도록(VSV-G) 조작하거나 GFP가 존재하도록 조작한다.

[1326] 그 후에, GFP-태깅된 푸소젠 및 음성 대조군(들)을 갖는 푸소좀을, 하기와 같이 푸소젠의 절대수에 대해 검정한다. 상업적으로 획득된 제조함 GFP를 단계 희석시켜, 단백질 농도의 보정 곡선을 발생시킨다. 그 후에, 공지된 품질의 푸소좀의 시료 및 보정 곡선의 GFP 형광을, GFP 광 큐브(light cube)(469/35 여기 필터 및 525/39 방출 필터)를 사용하는 형광계수기에서 측정하여, 푸소좀 조제물에서 GFP 분자의 평균 몰농도를 계산한다. 그 후에, 몰농도를 GFP 분자의 수로 전환시키고, 1개 시료 당 푸소좀의 수로 나누어서, 1개 푸소좀 당 GFP-태깅된 푸소젠 분자의 평균 수를 달성하고, 따라서, 1개 푸소좀 당 푸소젠의 수의 상대 추정치를 제공한다.

[1327] 일 구현예에서, GFP 형광은, 어떠한 푸소젠 또는 GFP가 존재하지 않는 경우, 음성 대조군과 비교하여 GFP 태그를 갖는 푸소좀에서 더 높을 것이다. 일 구현예에서, GFP 형광은 존재하는 푸소젠 분자의 수에 비례한다.

[1328] 대안적으로, 개별적인 푸소좀을, 단일 세포 프랩(prepare) 시스템(Fluidigm)을 제조업체의 설명에 따라 사용하여 분리하고, qRT-PCR를, C_t 값에 기초하여 푸소젠 또는 GFP cDNA 수준을 정량화하도록 설계된 마스터 믹스 및 상업적으로 입수 가능한 프로브세트(Taqman)를 사용하여 수행한다. 푸소젠 유전자 또는 GFP 유전자의 클로닝된 단편과 동일한 서열의 RNA 표준을 합성(Ambio)에 의해 발생시키고, 그 후에, 단계 희석의 단일 세포 프랩 시스템 qRT-PCR 실험 반응에 첨가하여, 푸소젠 또는 GFP RNA의 C_t vs 농도의 표준 곡선을 구축한다.

[1329] 푸소좀으로부터의 C_t 값을 표준 곡선과 비교하여, 1개 푸소좀 당 푸소젠 또는 GFP RNA의 양을 결정한다.

[1330] 일 구현예에서, 푸소좀 및 GFP RNA는, 푸소좀 또는 GFP가 없는 경우, 음성 대조군과 비교하여 푸소좀을 발현하도록 조작된 푸소좀에서 더 높을 것이다.

[1331] 지질 이중층 구조를 이전에 기재된 바와 같이 분석하고, 본원의 다른 실시예에 기재된 바와 같이 지질 이중층 내 푸소좀을 LC-MS에 의해 정량화함으로써, 푸소좀을 지질 이중층에서 추가로 정량화할 수 있다.

[1332] 실시예 30: 푸소좀의 평균 크기의 측정

[1333] 이 실시예는 푸소좀의 평균 크기의 측정을 기재한다.

[1334] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀을, 상업적으로 입수 가능한 시스템 (iZON Science)을 사용하여 평균 크기를 측정한다. 시스템을 소프트웨어, 및 40 nm 내지 10 μ m 크기 범위 내에서 입자를 분석하도록 설계된 나노포어를 제조업체의 설명에 따라 사용한다. 푸소좀 및 부모 세포를, 포스페이트-완충 식염수(PBS)에서 0.01 내지 0.1 μ g 단백질/mL의 최종 농도 범위까지 재현탁시킨다. 다른 장비 세팅을 하기 표에서 나타낸 바와 같이 조정한다:

표 6: 푸소좀 측정 매개변수 및 세팅

측정 매개변수	세팅
압력	6
나노포어 유형	NP300
보정 시료	CPC400_6P
금본위(gold standard) 분석	없음
포착 보조제	없음

[1335] 모든 푸소좀을 단리 2시간 이내에 분석한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포보다 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 이내에서 크기를 가질 것이다.

[1337] 실시예 31: 푸소좀의 평균 크기 분포의 측정

[1338] 이 실시예는 푸소좀의 크기 분포의 측정을 기재한다.

[1339] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시키고, 예컨대 이전의 실시예에 기재된 상업적으로 입수 가능한 시스템을 사용하여 시험하여 입자의 평균 크기를 결정한다. 일 구현예에서, 중앙값 주위로 모인 10%, 50% 및 90%의 푸소좀에 대한 크기 역치를 부모 세포와 비교하여, 푸소좀 크기 분포를 평가한다.

[1340] 일 구현예에서, 푸소좀은 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%보다 적게, 또는 10%, 50%, 또는 90%의 시료 내에서 크기 분포에서 부모 세포의 가변성보다 적게 가질 것이다.

[1341] 실시예 32: 푸소좀의 평균 용적

[1342] 이 실시예는 푸소좀의 평균 용적의 측정을 기재한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 푸소좀의 크기(예를 들어 용적)의 다양화는, 이들 푸소좀을 별개의 적재물 로딩, 치료제 설계 또는 적용에 다재다능하도록 만들 수 있다.

[1343] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 제조한다. 양성 대조군은 HEK293 세포 또는 공지된 크기의 폴리스티렌 비드이다. 음성 대조군은 36 게이지 바늘을 대략 50회 통과한 HEK293 세포이다.

[1344] 이전의 실시예에 기재된 바와 같이, 투과 전자 현미경을 이용한 분석을 사용하여, 푸소좀의 크기를 결정한다. 푸소좀의 직경을 측정하고, 그 후에 용적을 계산한다.

[1345] 일 구현예에서, 푸소좀은 대략 50 nm 이상의 직경의 평균 크기를 가질 것이다.

[1346] 실시예 33: 푸소좀의 평균 밀도

[1347] 푸소좀 밀도를 문헌[Thery et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3:Unit 3.22]에 기재된 바와 같이 연속적인 수크로스 구배 원심분리 검정법을 통해 측정한다. 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 수득한다.

[1348] 우선, 수크로스 구배를 제조한다. 4 ml HEPES/수크로스 스타크 용액 및 1 ml HEPES 스타크 용액 또는 0.5 ml HEPES/수크로스 스타크 용액 및 4.5 ml HEPES 스타크 용액을 각각 혼합함으로써, 2 M 및 0.25 수크로스 용액을 발생시킨다. 이들 2개 분획을 구배 메이커(maker) 내로 로딩하고, 이때 모든 셔터를 자기 교반 막대가 있는 근위부

구획 내 2 M 수크로스 용액, 및 원위부 구획 내 0.25 M 수크로스 용액에서 닫는다. 상기 구배 메이커를 자기 교반 플레이트 상에 놓고, 근위부 구획과 원위부 구획 사이의 셔터를 열고, 자기 교반 플레이트를 켜다. HEPES 스타크 용액을 하기와 같이 제조한다: 2.4 g N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설폰산(HEPES; 20 mM 최종), 300 H₂O, 10 N NaOH를 이용하여 pH를 7.4까지 조정하고, H₂O를 이용하여 용적으로 최종적으로 500 ml까지 조정한다. HEPES/수크로스 스타크 용액을 하기와 같이 제조한다: 2.4 g 하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설폰산(HEPES; 20 mM 최종), 428 g 프로테아제-무함유 수크로스(ICN; 2.5 M 최종), 150 ml H₂O, 10 N NaOH를 이용하여 pH를 7.4까지 조정하고, H₂O를 이용하여 용적으로 최종적으로 500 ml까지 조정한다.

- [1349] 푸소좀을 2 ml의 HEPES/수크로스 스타크 용액에 재현탁시키고, SW 41 원심분리 튜브의 하부 상에 붓는다. 외부 튜빙을 SW 41 튜브에 2 ml의 푸소좀의 바로 위에 놓는다. 외부 셔터를 열고, 연속적인 2 M(하부) 내지 0.25 M(상부) 수크로스 구배를 푸소좀의 상부 상에 서서히 붓는다. 구배를 부움에 따라 SW 41 튜브는 낮아지며, 따라서, 튜빙(tubing)은 항상 액체의 상부보다 약간 위에 있다.
- [1350] 구배를 갖는 모든 튜브는 서로 균형을 이루거나, 동일한 중량의 수크로스 용액을 갖는 다른 튜브와 균형을 이룬다. 구배를 210,000 x g, 4°C에서, 저(low)로 설정된 브레이크를 갖는 SW 41 스윙링-버킷(swinging-bucket) 로터 내에서 밤새(≥14시간) 원심분리한다.
- [1351] 마이크로피펫터(micropipettor)를 이용하여, 상부로부터 하부까지 11개의 1-ml 분획을 수합하고, TLA-100.3 로터용의 3-ml 튜브에 놓는다. 시료를 따로 두고, 96-웰 플레이트의 개별 웰에서, 50 μ l의 각각의 분획을 사용하여 굴절률을 측정한다. 상기 플레이트를 접착 호일로 덮어, 증발을 방지하고, 실온에서 1시간 이하 동안 저장한다. 굴절계를 사용하여, 96-웰 플레이트에 비축된 물질로부터 10 내지 20 μ l의 각각의 분획의 굴절률(따라서, 수크로스 농도, 및 밀도)을 측정한다.
- [1352] 굴절률을 g/ml로 전환시키기 위한 표를 Beckman 웹사이트로부터 다운로드 가능한 초원심분리 카탈로그에서 입수 가능하다.
- [1353] 그 후에, 각각의 분획을 단백질 함량 분석을 위해 준비한다. 2 밀리리터의 20 mM HEPES, pH 7.4를 각각의 1-ml 구배 분획에 첨가하고, 위아래로 2 내지 3회 피펫팅함으로써 혼합한다. 각각의 튜브의 한쪽 면을 영구 마커로 표시하고, 상기 튜브를 TLA-100.3 로터에서 표시된 면을 위로 하여 놓는다.
- [1354] 희석된 분획을 갖는 3 ml-튜브를 110,000 x g, 4°C에서 1시간 동안 원심분리한다. TLA-100.3 로터는 6개의 튜브를 고정시켜서, 각각의 구배에 대해 2개의 원심분리를, 이들이 원심분리될 수 있을 때까지 4°C에서 유지된 다른 튜브와 함께 수행한다.
- [1355] 상층액을 각각의 3-ml 튜브로부터 흡인하여, 펠렛의 상부 상에 점적액을 나눈다. 펠렛은 대체로 가능하게는, 보이지 않지만, 이의 장소는 튜브 상의 표시로부터 추론될 수 있다. 보이지 않는(invisible) 펠렛을 재현탁시키고, 마이크로원심분리 튜브에 이송한다. 각각의 재현탁된 분획의 1/2을 또 다른 실시예에 기재된 비신조닌산 검정법에 의한 단백질 함량 분석에 사용한다. 이는 푸소좀 조제물의 다양한 구배 분획에 걸친 분포를 제공한다. 이 분포를 사용하여, 푸소좀의 평균 밀도를 결정한다. 제2의 1/2 용적 분획을 -80°C에 저장하고, 일단 단백질 분석이 분획에 걸친 푸소좀 분포를 드러내고 나면, 다른 목적(예를 들어 기능성 분석, 또는 면역단리에 의한 추가의 정제)에 사용한다.
- [1356] 일 구현예에서, 이 검정법을 사용하여, 푸소좀의 평균 밀도는 1.25 g/ml +/- 0.05 표준 편차일 것이다. 일 구현예에서, 푸소좀의 평균 밀도는 1~1.1, 1.05~1.15, 1.1~1.2, 1.15~1.25, 1.2~1.3, 또는 1.25~1.35의 범위에 있을 것이다. 일 구현예에서, 푸소좀의 평균 밀도는 1 미만이거나 1.35 초과일 것이다.
- [1357] *실시예 34: 푸소좀에서 세포소기관 함량의 측정*
- [1358] 이 실시예는 푸소좀에서 세포소기관의 검출을 기재한다.
- [1359] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 제조하였다. 소포체(ER) 및 미토콘드리아의 검출을 위해, 푸소좀 또는 C2C12 세포를 1 μ M ER 염색(E34251, Thermo Fisher, Waltham, MA) 및 1 μ M 미토콘드리아 염색(M22426, Thermo Fisher Waltham, MA)으로 염색하였다. 리소좀의 검출을 위해, 푸소좀 또는 세포를 50 nM 리소좀 염색(L7526, Thermo Fisher, Waltham, MA)으로 염색하였다.
- [1360] 염색된 푸소좀을 유세포분석기(Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에서 진행시키고, 형광 강도를 하기 표에 따라 각각의 염료에 대해 측정하였다. 비-염색된 푸소좀(음성 대조군) 및 염색된 세포(양성 대조군)에 대한 염색된

푸소좀의 형광 강도를 비교함으로써, 세포소기관의 존재에 대한 확증을 수행하였다.

[1361] 제핵-후 5시간째에 푸소좀은 소포체(도 1), 미토콘드리아(도 2) 및 리소좀(도 3)에 대해 양성으로 염색되었다.

표 7: 푸소좀 염색

염색	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
ER-트래커 그린	BL1	488	530/30
미토타래커 딥레드 FM	RL1	638	670/14
리소트래커(LysoTracker) 그린	BL1	488	530/30

[1362] 실시예 35: 푸소좀 내 핵 함량의 측정

[1363] 이 실시예는 푸소좀 내 핵 함량을 측정하는 일 구현예를 기재한다. 푸소좀이 핵을 함유하지 않음을 확증하기 위해, 상기 푸소좀을 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 및 $1 \mu\text{M}$ 칼세인AM(C3100MP, Thermo Fisher, Waltham, MA)으로 염색하고, 염색된 푸소좀을 Attune NXT 유세포분석기(Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에서 진행시켜, 각각의 염료의 형광 강도를 하기 표에 따라 결정한다. 일 구현예에서, 염색된 푸소좀의 평균 형광 강도를 염색되지 않은 푸소좀 및 염색된 세포와 비교함으로써, 세포기질(칼세인AM)의 존재 및 핵(Hoechst 33342)의 부재에 대한 확증을 수행할 것이다.

표 8: 유세포분석기 세팅

염색	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
칼세인 AM	BL1	488	530/30

[1364] 실시예 36: 핵 외피 함량의 측정

[1365] 이 실시예는 제핵 푸소좀 내 핵 외피 함량의 측정을 기재한다. 핵 외피는 세포의 세포질로부터 DNA를 단리한다.

[1366] 일 구현예에서, 정제된 푸소좀 조성물은 포유류 세포, 예컨대 HEK-293T(293 [HEK-293](ATCC® CRL-1573™)를 포함하며, 이는 본원에 기재된 바와 같이 제핵되었다. 이 실시예는 푸소좀 발생 후 잔존하는 온전한 핵막의 양을 측정하기 위해, 대용물(proxy)로서 상이한 핵막 단백질의 정량화를 기재한다.

[1369] 이 실시예에서, 10×10^6 HEK-293T, 및 10×10^6 HEK-293T로부터 제조된 동등한 양의 푸소좀을 3.7% PFA를 사용하여 15분 동안 고정시키고, 1xPBS 완충제, pH 7.4로 세척하고 동시에 투과시키고, 그 후에, 1% 소 혈청 알부민 및 0.5% Triton® X-100, pH 7.4를 함유하는 1xPBS 완충제를 사용하여 15분 동안 블라킹시킨다. 투과화 후, 푸소좀 및 세포를, 상이한 1차 항체, 예를 들어 (항-RanGAP1 항체[EPR3295](Abcam - ab92360), 항-NUP98 항체[EPR6678] - 핵공 마커(Abcam - ab124980), 항-핵공 복합체 단백질 항체[Mab414] - (Abcam- ab24609), 항-임포틴 7 항체(Abcam - ab213670)와 함께, 1% 소 혈청 알부민 및 0.5% Triton® X-100을 함유하는 1xPBS 완충제, pH 7.4에서 희석된 제조업체가 제안한 농도에서 4°C에서 12시간 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 푸소좀 및 세포를 1xPBS 완충제, pH 7.4로 세척하고, 이전에 명시된 1차 항체를 검출하는 적절한 형광 2차 항체와 함께 1% 소 혈청 알부민 및 0.5% 세제를 함유하는 1xPBS 완충제, pH 7.4에서 희석된 제조업체가 제안한 농도에서 21°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 푸소좀 및 세포를 1xPBS 완충제로 세척하고, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342를 함유하는 300 μL 의 1xPBS 완충제, pH 7.4에 재현탁시키고, 20 μm FACS 튜브를 통해 여과하고, 유세포분석에 의해 분석한다.

[1370] 동일한 염색 절차를 사용하지만 1차 항체를 첨가하지 않은 음성 대조군을 발생시킨다. 유세포분석을 488 nm 아른 레이저 여기가 있는 FACS 세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 수행하고, 530+/-30 nm 방출 스펙트럼을 수합한다. FACS 획득 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용한다. 광 산란 채널을 선형 이득 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다. 상대 온전한 핵막 함량을 각각의 시료에서 형광의 중앙값 강도에 기초하여 계산한다. 모든 사건은 포워드 및 사이드 스캐터에서 포착한다.

[1371] 푸소좀의 중앙값 형광 강도 값으로부터 제각기의 음성 대조군 시료의 중앙값 형광 강도 값을 제함으로써, 푸소좀에 대한 정규화된 형광 강도 값을 결정한다. 그 후에, 온전한 핵막 함량의 정량적인 측정을 발생시키기 위해,

푸소좀 시료에 대한 정규화된 형광을 제각기의 유핵 세포 시료에 대해 정규화한다.

- [1372] 일 구현예에서, 제핵 푸소좀은 유핵 부모 세포와 비교하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%보다 적은 형광 강도 또는 핵 외피 함량을 포함할 것이다.
- [1373] 실시예 37: 염색질 수준의 측정
- [1374] 이 실시예는 제핵 푸소좀 내 염색질의 측정을 기재한다.
- [1375] DNA를 염색질로 응축시켜, 이것이 핵 내부에 핏(fit)되는 것을 허용할 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 정제된 푸소좀 조성물은 낮은 수준의 염색질을 포함할 것이다.
- [1376] 이전에 기재된 임의의 방법에 의해 제조된 제핵 푸소좀 및 양성 대조군 세포(예를 들어 부모 세포)를, 히스톤 단백질 H3 또는 히스톤 단백질 H4에 특이적인 항체를 이용하는 ELISA를 사용하여 염색질 함량에 대해 검정한다. 히스톤은 염색질의 주된 단백질 구성성분이고, H3 및 H4가 지배적인 히스톤 단백질이다.
- [1377] 히스톤을 상업적인 키트(예를 들어 Abcam 히스톤 추출 키트(ab113476)) 또는 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 푸소좀 조제물 및 세포 조제물로부터 추출한다. 이들 분취물을 사용할 때까지 -80°C 에 저장한다. 정제된 히스톤 단백질(H3 또는 H4)을 검정법 완충제 용액에 1 내지 $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ 까지 희석시킴으로써, 표준의 단계 희석물을 제조한다. 검정법 완충제를 제조업체에 의해 공급된 키트(예를 들어 Abcam 히스톤 H4 총 정량화 키트(ab156909) 또는 Abcam 히스톤 H3 총 정량화 키트(ab115091))로부터 유래시킬 수 있다. 검정법 완충제를, 항-히스톤 H3 또는 항-H4 항체로 코팅된 48-웰 또는 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 시료 또는 표준 대조군을 상기 웰에 첨가하여, 각각의 웰의 총 용적으로 $50\text{ }\mu\text{l}$ 까지 되게 한다. 그 후에, 플레이트의 덮개를 덮고, 37°C 에서 90분 내지 120분 동안 인큐베이션한다.
- [1378] 인큐베이션 후, 상기 플레이트에 부착된 항-히스톤 항체에 의해 결합된 임의의 히스톤을 검출용으로 제조한다. 상층액을 흡인하고, 플레이트를 $150\text{ }\mu\text{l}$ 의 세척 완충제로 세척한다. 그 후에, 항-히스톤 H3 또는 항-H4 포착 항체를 포함하는 포착 완충제를 상기 플레이트에 $50\text{ }\mu\text{l}$ 의 용적에서 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가한다. 그 후에 플레이트를 오비탈 셰이커 상에서 실온에서 60분 동안 인큐베이션한다.
- [1379] 다음, 상기 플레이트를 흡인하고, 세척 완충제를 사용하여 6회 세척한다. 그 후에, 포착 항체에 의해 활성화된 신호 리포터 분자를 각각의 웰에 첨가한다. 플레이트의 덮개를 덮고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에 플레이트를 흡인하고, 세척 완충제를 사용하여 4회 세척한다. 정지 용액을 첨가함으로써, 반응을 중단시킨다. 플레이트 내 각각의 웰의 흡광도를 450 nm 에서 판독하고, 각각의 시료 내 히스톤의 농도를 450 nm 에서의 흡광도 대 표준 시료에서의 히스톤의 농도의 표준 곡선에 따라 계산한다.
- [1380] 일 구현예에서, 푸소좀 시료는 유핵 부모 세포의 히스톤 농도의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%보다 적게 포함할 것이다.
- [1381] 실시예 38: 푸소좀 내 DNA 함량의 측정
- [1382] 이 실시예는 유핵 대응물(counterpart)에 비한, 푸소좀 내 DNA의 양의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 유핵 대응물보다 적은 DNA를 가질 것이다. 총 DNA 또는 특이적인 하우스-키팅 유전자의 수준을 측정함으로써 핵산 수준을 결정한다. 일 구현예에서, 감소된 DNA 함량을 갖거나 DNA가 실질적으로 결여된 푸소좀은 유전자를 복제하거나, 분화시키거나 전사할 수 없을 것이며, 이는, 대상체에게 투여 시, 이들의 용량 및 기능이 변경되지 않음을 보장한다.
- [1383] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀 및 공급원 세포의 단백질에 의해 측정된 바와 동일한 질량의 조제물을 사용하여, 총 DNA(예를 들어 키트, 예컨대 Qiagen DNeasy 카탈로그 #69504를 사용함)를 분리시키고, 뒤이어 표준 분광분석 방법을 사용하여 DNA 농도를 결정하여, DNA(예를 들어 Thermo Scientific NanoDrop을 이용함)에 의한 광 흡광도를 평가한다.
- [1384] 일 구현예에서, 제핵 푸소좀 내 DNA의 농도는 부모 세포에서보다 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하 더 적을 것이다.
- [1385] 대안적으로, 특이적인 하우스-키팅 유전자, 예컨대 GAPDH의 농도를 반-정량적 실시간 PCR(RT-PCR; semi-quantitative real time PCR)을 이용하여 유핵 세포와 푸소좀 사이에서 비교할 수 있다. 총 DNA를 부모 세포로부터 분리하고, DNA 농도를 본원에 기재된 바와 같이 측정한다. RT-PCR을 하기 반응 주형을 사용하여 PCR 키트(Applied Bio시스템, 카탈로그 #4309155)를 이용하여 수행한다:

- [1386] SYBR 그린 마스터 믹스: 10 μ L
- [1387] 0.45 μ M 포워드 프라이머: 1 μ L
- [1388] 0.45 μ M 리버스 프라이머: 1 μ L
- [1389] DNA 주형: 10 ng
- [1390] PCR-등급 물: 변수
- [1391] 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 Integrated DNA Technologies로부터 획득한다. 하기 표는 프라이머 쌍 및 이들의 연관된 서열을 상술한다:

표 9: 프라이머 서열

표적	포워드 프라이머 서열 (5'→3')	리버스 프라이머 서열 (5'→3')
인간 nDNA (GAPDH)	GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC	GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG

- [1392]
- [1393] 하기 프로토콜에 따라 실시간 PCR 시스템(Applied Bio시스템)을 사용하여 증폭 및 검출을 수행한다:
- [1394] 변성, 94℃ 2분
- [1395] 하기 순서의 40 사이클:
- [1396] 변성, 94℃ 15초
- [1397] 어닐링, 신장, 60℃ 1분
- [1398] GAPDH DNA의 단계 희석을 이용하여 C_t 대 DNA 농도의 표준 곡선을 만들고, 특정한 양(ng)의 DNA에 대한 푸소좀 PCR 결과로부터 C_t 핵 값을 정규화하는 데 사용한다.
- [1399] 일 구현예에서, 제핵 푸소좀 내 GAPDH DNA의 농도는 부모 세포보다 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하 더 작을 것이다.
- [1400] 실시예 39: 푸소좀 내 miRNA 함량의 측정
- [1401] 이 실시예는 푸소좀 내 microRNA(miRNA)의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 miRNA를 포함한다.
- [1402] MiRNA는, 다른 활성 중에서도, 메신저 RNA(mRNA)가 단백질로 번역되는 속도를 조절하는 조절 요소이다. 일 구현예에서, miRNA를 운반하는 푸소좀을 사용하여, miRNA를 표적 부위에 전달할 수 있다.
- [1403] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀 또는 부모 세포로부터의 RNA를 이전에 기재된 바와 같이 제조한다. 적어도 하나의 miRNA 유전자를 www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml에서 Sanger Center miRNA Registry로부터 선별한다. miRNA를 문헌[Chen *et al*, *Nucleic Acids Research*, 33(20), 2005]에 기재된 바와 같이 제조한다. 모든 TaqMan miRNA 검정법은 Thermo Fisher(A25576, Waltham, MA)로부터 입수 가능하다.
- [1404] qPCR을 miRNA cDNA 상에서 제조업체의 사양에 따라 수행하고, C_t 값을 본원에 기재된 바와 같이 실시간 PCR 시스템을 사용하여 발생시키고 분석한다.
- [1405] 일 구현예에서, 푸소좀의 miRNA 함량은 이들의 부모 세포의 miRNA 함량보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상일 것이다.
- [1406] 실시예 40: 푸소좀에서 내인성 RNA 또는 합성 RNA의 발현의 정량화
- [1407] 이 실시예는 변경된 발현을 갖는 내인성 RNA, 또는 푸소좀에서 발현되는 합성 RNA의 수준의 정량화를 기재한다.
- [1408] 푸소좀에 대한 세포 기능을 매개하는 내인성 또는 합성 RNA의 발현을 변경시키도록 푸소좀 또는 부모 세포를 조작한다.
- [1409] 트랜스포자제 벡터(System Biosciences, Inc.)는 퓨로마이신 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임을 단백질 작용제의 클로닝된 단편의 오픈 리딩 프레임과 함께 포함한다. 상기 벡터를 전기천공기(Amaxa) 및 293T 세포주 특이적 핵 형질감염 키트(Lonza)를 사용하여 293T 내로 전기천공시킨다.

- [1410] 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 퓨로마이신을 이용하여 3~5일 동안 선별 후, 푸소좀을, 안정하게 발현하는 세포주로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다.
- [1411] 개별적인 푸소좀을 단리하고, 1개 푸소좀 당 단백질 작용제 또는 RNA를 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 정량화한다.
- [1412] 일 구현예에서, 푸소좀은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 10^3 , 5.0×10^3 , 10^4 , 5.0×10^4 , 10^5 , 5.0×10^5 , 10^6 , 5.0×10^6 이상의 RNA를 가질 것이다.
- [1413] 실시예 41: 푸소좀에서 지질 조성물의 측정
- [1414] 이 실시예는 푸소좀의 지질 조성물의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀의 지질 조성물은, 이것이 유래되는 세포와 유사하다. 지질 조성물은 푸소좀 및 세포의 중요한 생물물리학적 매개변수, 예컨대 크기, 정전기 상호작용, 및 콜로이드 거동에 영향을 준다.
- [1415] 지질 측정은 질량 분광분석에 기초한다. 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다.
- [1416] 질량 분광분석-기반 지질 분석을 기재된 바와 같이(문헌[Sampaio, et al., Proc Natl Acad Sci, 2011, Feb 1;108(5):1903-7]) 지질 분석 서비스(Dresden, Germany)에서 수행한다. 지질을 2-단계 클로로포름/메탄을 절차(문헌[Ejsing, et al., Proc Natl Acad Sci, 2009, Mar 17;106(7):2136-41])를 사용하여 추출한다. 시료를 카디오리핀 16:1/15:0/15:0/15:0(CL), 세라마이드 18:1:2/17:0(Cer), 디아실글리세롤 17:0/17:0(DAG), 헥소실세라마이드 18:1:2/12:0(HexCer), 리소포스파티데이트 17:0(LPA), 리소-포스파티딜콜린 12:0(LPC), 리소-포스파티딜에탄올아민 17:1(LPE), 리소-포스파티딜글리세롤 17:1(LPG), 리소-포스파티딜이노시톨 17:1(LPI), 리소-포스파티딜세린 17:1(LPS), 포스파티데이트 17:0/17:0(PA), 포스파티딜콜린 17:0/17:0(PC), 포스파티딜에탄올아민 17:0/17:0(PE), 포스파티딜글리세롤 17:0/17:0(PG), 포스파티딜이노시톨 16:0/16:0(PI), 포스파티딜세린 17:0/17:0(PS), 콜레스테롤 에스테르 20:0(CE), 스펅고미엘린 18:1:2/12:0:0(SM) 및 트리아실글리세롤 17:0/17:0/17:0(TAG)의 내부 지질 표준 혼합물을 이용하여 스파이크한다.
- [1417] 추출 후, 유기상을 주입 플레이트로 이송하고, 속도 진공 농축기에서 건조한다. 제1 단계 건조 추출물을 클로로포름/메탄올/프로판올 중 7.5 mM 암모늄 아세테이트(1:2:4, V:V:V)에 재현탁시키고, 제2 단계 건조 추출물을 클로로포름/메탄올 중 메틸아민의 33% 에탄올 용액(0.003:5:1; V:V:V)에 재현탁시킨다. 모든 액체 취급 단계를, 피펫팅에 대한 항-액적 조절 특징(Hamilton Robotics)을 갖는 유기 용매에 대한 로봇 플랫폼(robotic platform)을 사용하여 수행한다.
- [1418] 시료를 이온 공급원(Advion Biosciences)이 장착된 질량 분광광도계(Thermo Scientific) 상에서 직접 주입에 의해 분석한다. 시료를, 단일 획득에서 MS를 위해 $Rm/z=200=280000$ 및 탠덤 MS/MS 실험을 위해 $Rm/z=200=17500$ 의 분해능(resolution)을 갖는 양이온 모드와 음이온 모드 둘 모두에서 분석한다. MS/MS는 1 Da 증분에서 스캐닝된 상응하는 MS 질량 범위를 포괄하는 포함 목록에 의해 촉발된다(문헌[Surma, et al., Eur J lipid Sci Technol, 2015, Oct;117(10):1540-9]). MS 데이터와 MS/MS 데이터 둘 모두를 조합하여, CE, DAG 및 TAG 이온을 암모늄 부가물로서; PC, PC O-를 아세테이트 부가물로서; 그리고 CL, PA, PE, PE O-, PG, PI 및 PS를 탈양자화된 음이온로서 모니터링한다. MS만 사용하여, LPA, LPE, LPE O-, LPI 및 LPS를 탈양자화된 음이온으로서; Cer, HexCer, SM, LPC 및 LPC O-를 아세테이트로서 모니터링한다.
- [1419] 데이터를 하기 참조문헌(문헌[Herzog, et al., Genome Biol, 2011, Jan 19;12(1):R8; Herzog, et al., PLoS One, 2012, Jan;7(1):e29851])에 기재된 바와 같은 인-하우스(in-house) 개발된 지질 식별 소프트웨어를 이용하여 분석한다. 5 초과와 신호-대-노이즈(signal-to-noise) 비, 및 상응하는 블랭크 시료에서보다 5-배 더 높은 신호 강도를 갖는 지질 식별만 추가의 데이터 분석을 위해 간주된다.
- [1420] 푸소좀 지질 조성물을 부모 세포의 지질 조성물과 비교한다. 일 구현예에서, 푸소좀 및 부모 세포는 부모 세포에서 식별된 지질 중 50% 초과가 푸소좀에 존재한다면 유사한 지질 조성물을 가질 것이고, 이들 식별된 지질 중에서, 푸소좀 내 수준은 부모 세포에서 상응하는 지질 수준의 25% 초과일 것이다.
- [1421] 실시예 42: 푸소좀에서 단백질 조성물의 측정
- [1422] 이 실시예는 푸소좀의 단백질 조성물의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀의 단백질 조성물은, 이들이 유래되는 세포와 유사할 것이다.

- [1423] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀을 용해 완충제(50 mM Tris pH 8.0 중 7 M 우레아, 2 M 티오우레아, 4%(w/v) Chaps)에 재현탁시키고, 실온에서 15분 동안 이파금 보텍싱(vortexing)하면서 인큐베이션한다. 그 후에, 혼합물을 얼음 배쓰 내에서 5분 동안 초음파처리에 의해 용해시키고, 13,000 RPM에서 5분 동안 회전 침강시킨다. 단백질을 침강을 비색 검정법(Pierce)에 의해 결정하고, 각각의 시료의 단백질을 새 튜브에 이송하고, 용적을 50 mM Tris pH 8로 동일화시킨다.
- [1424] 단백질을 65℃에서 10 mM DTT를 이용하여 15분 동안 환원시키고, 암실에서 실온에서 15 mM 요오도아세타미드를 이용하여 30분 동안 알킬화시킨다. 단백질을 6 용적의 냉각된(-20℃) 아세톤의 점진적인 첨가에 의해 침전시키고, -80℃에서 밤새 인큐베이션한다. 단백질 펠렛을 냉각된(-20℃) 메탄올로 3회 세척한다. 단백질을 50 mM Tris pH 8.3에 재현탁시킨다.
- [1425] 다음, 트립신/lysC를, 37℃에서 제1의 4시간 분해를 위해 단백질에 교반하면서 첨가한다. 시료를 50 mM Tris pH 8로 희석시키고, 0.1% 소듐 테옥시클로레이트를 분해를 위해 더 많은 트립신/lysC와 함께 37℃에서 교반하면서 첨가한다. 분해를 중단시키고, 2% v/v 포름산의 첨가에 의해 소듐 테옥시클로레이트를 제거한다. 시료를 보텍싱시키고, 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리에 의해 정제한다. 펩타이드를 역상 고체상 추출(SPE)에 의해 정제하고, 건조 침강시킨다. 시료를 수(water) 중 20 μ l의 3% DMSO, 0.2% 포름산에서 재구성하고, LC-MS에 의해 분석한다.
- [1426] 정량적 측정을 갖기 위해, 단백질 표준을 또한, 장비 상에서 진행시킨다. 표준 펩타이드(Pierce, 등물, LC-MS 등급, #88342)를 4, 8, 20, 40 및 100 fmol/ μ l까지 희석시키고, LC-MS/MS에 의해 분석한다. 1개 단백질 당 5개의 최상의 펩타이드(3 MS/MS 전이/펩타이드)의 평균 AUC(곡선 아래 면적)를 각각의 농도에 대해 계산하여, 표준 곡선을 발생시킨다.
- [1427] 획득을, 25 μ m iD 모세관을 갖는 전기분무(electrospray) 중간면이 장착되고 마이크로-초고성능 액체 크로마토그래피(μ UHPLC)(Eksigent, Redwood City, CA, USA)와 커플링된 고 분해능 질량 분광광도계(ABSciex, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행한다. 분석 소프트웨어를 사용하여, 데이터 처리 및 획득을 위해 장비를 제어한다. 공급원 전압을 5.2 kV까지 설정하고, 225℃에서 유지시키고, 커튼 가스(curtain gas)를 27 psi로 설정하고, 12 psi에서 가스 1, 및 10 psi에서 가스 2이다. 획득을, 단백질 데이터베이스에 대해 정보 의존적 획득(IDA) 모드에서, 그리고 시료에 대해 SWATH 획득 모드에서 수행한다. 분리를 60℃에서 유지된, 0.3 μ m i.d., 2.7 μ m 입자, 150 mm 길이의 역상 컬럼(Advance Materials Technology, Wilmington, DE) 상에서 수행한다. 시료를 루프 과충전(loop overfilling)에 의해 5 μ L 루프 내로 주입한다. 120분(시료) LC 구배를 위해, 이동상은 하기를 포함한다: 3 μ L/min의 유속에서 용매 A(수 중 0.2% v/v 포름산 및 3% DMSO v/v) 및 용매 B(EtOH 중 0.2% v/v 포름산 및 3% DMSO).
- [1428] 단백질의 절대 정량화를 위해, 1개 단백질 당 5개 최상의 펩타이드(1개 펩타이드 당 3 MS/MS 이온)의 AUC의 합계를 사용하여 표준 곡선(5점(point), $R^2 > 0.99$)을 발생시킨다. 시료의 분석을 위한 데이터베이스를 발생시키기 위해, DIAUmpire 알고리즘을 12개 시료 각각 상에서 진행시키고, 출력 MGF 파일과 함께 1개의 데이터베이스로 조합한다. 이 데이터베이스를 소프트웨어(ABSciex)와 함께 사용하여, 5 전이/펩타이드 및 5 펩타이드/단백질 최대를 사용하여 각각의 시료에서 단백질을 정량화한다. 컴퓨터화된 점수가 1.5보다 우수하거나 1% 미만의 FDR을 가졌다면, 펩타이드는 적당하게 측정되는 것으로 간주된다. 적당하게 측정된 펩타이드 각각의 AUC의 합계를 표준 곡선 상에서 맵핑하고, fmol로서 보고한다.
- [1429] 그 후에, 생성된 단백질 정량화 데이터를 분석하여, 하기와 같이 단백질 수준 및 단백질의 공지된 클래스의 비율을 분석한다: 효소를 효소 위원회(EC) 번호를 이용하여 주석이 달린 단백질로서 식별하고; ER 연관된 단백질을, 미토콘드리아가 아니라 ER의 유전자 종양학(GO; <http://www.geneontology.org>) 세포성 구획 분류를 가진 단백질로서 식별하며; 엑소좀 연관된 단백질을, 미토콘드리아가 아니라 엑소좀의 유전자 종양학 세포성 구획 분류를 가진 단백질로서 식별하고; 미토콘드리아 단백질을, MitoCarta 데이터베이스에서 미토콘드리아로서 식별된 단백질로서 식별한다(문헌[Calvo et al., NAR 2015 | doi:10.1093/nar/gkv1003]). 이들 범주 각각의 몰비를, 각각의 시료 내 모든 식별된 단백질의 몰 양의 합계로 나눈, 각각의 클래스 내 모든 단백질의 몰 양의 합계로서 결정한다.
- [1430] 푸소좀 단백질 조성물을 부모 세포의 단백질 조성물과 비교한다. 일 구현예에서, 푸소좀과 부모 세포 사이에서 유사한 단백질 조성물은, 식별된 단백질 중 50% 초과가 푸소좀에 존재한다면 관찰될 것이고, 이들 식별된 단백질 중에서, 상기 수준은 부모 세포에서 상응하는 단백질 수준의 25% 초과이다.

- [1431] 실시예 43: 1개 푸소좀 당 내인성 또는 합성 단백질 수준의 정량화
- [1432] 이 실시예는 푸소좀에서 내인성 또는 합성 단백질 적재물의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 내인성 또는 합성 단백질 적재물을 포함한다.
- [1433] 푸소좀 또는 부모 세포는 내인성 단백질의 발현을 변경시키거나, 치료적 또는 신규 세포 기능을 매개하는 합성 적재물을 발현하도록 조작된다.
- [1434] 트랜스포자제 벡터(System Biosciences, Inc.)은, 퓨로마이신 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임, 선택적으로 그린 형광 단백질(GFP)의 오픈 리딩 프레임에 번역적으로 융합된, 단백질 작용제의 클로닝된 단편의 오픈 리딩 프레임과 함께 포함한다. 상기 벡터를 전기천공기(Amaxa) 및 293T 세포주 특이적 핵 형질감염 키트(Lonza)를 사용하여 293T 내로 전기천공시킨다.
- [1435] 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 퓨로마이신을 이용하여 3-5일 동안 선별 후, 푸소좀을, 안정하게 발현하는 세포주로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다.
- [1436] 내인성 단백질의 변경된 발현 수준, 또는 GFP에 융합되지 않은 합성 단백질의 발현 수준을 상기 기재된 바와 같이 질량 분광분석에 의해 정량화한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 10^3 , 5.0×10^3 , 10^4 , 5.0×10^4 , 10^5 , 5.0×10^5 , 10^6 , 5.0×10^6 이상의 단백질 작용제 분자를 가질 것이다.
- [1437] 대안적으로, 정제된 GFP를 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 단계 희석시켜, 단백질 농도의 표준 곡선을 발생시킨다. 푸소좀의 시료 및 표준 곡선의 GFP 형광을, GFP 광 큐브(469/35 여기 필터 및 525/39 방출 필터)를 사용하는 형광계수기(BioTek)에서 측정하여, 푸소좀 내 GFP 분자의 평균 몰농도를 계산한다. 그 후에, 몰농도를 GFP 분자의 수로 전환시키고, 1개 시료 당 푸소좀의 수로 나누어서, 1개 푸소좀 당 단백질 작용제 분자의 평균 수를 달성한다.
- [1438] 일 구현예에서, 푸소좀은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 10^3 , 5.0×10^3 , 10^4 , 5.0×10^4 , 10^5 , 5.0×10^5 , 10^6 , 5.0×10^6 이상의 단백질 작용제 분자를 가질 것이다.
- [1439] 실시예 44: 푸소좀에서 엑소좀 단백질의 마커의 측정
- [1440] 이 검정법은, 시료 조제물의 단백질 구성의 정량화를 기재하고, 엑소좀의 특이적인 마커인 것으로 공지된 단백질의 비율을 정량화한다.
- [1441] 푸소좀을 펠렛화하고, 표준 생물학적 시료 취급 절차에 따라 단백질 분석 센터로 냉동시켜 운송한다.
- [1442] 단백질 추출 및 분석을 위해 푸소좀을 해동시킨다. 우선, 이들 푸소좀을 용해 완충제(50 mM Tris pH 8.0 중 7 M 우레아, 2 M 티오우레아, 4% (w/v) chaps)에 재현탁시키고, 실온에서 15분 동안 이따금 보텍싱하면서 인큐베이션한다. 그 후에, 혼합물을 얼음 배스 내에서 5분 동안 초음파처리하여 용해시키고, 13,000 RPM에서 5분 동안 회전 침강시킨다. 총 단백질 함량을 비색 검정법(Pierce)에 의해 결정하고, 각각의 시료로부터 100 μ g의 단백질을 새 튜브에 이송하고, 용적을 50 mM Tris pH 8로 조정한다.
- [1443] 단백질을 65°C에서 10 mM DTT를 이용하여 15분 동안 환원시키고, 암실에서 실온에서 15 mM 요오도아세타미드를 이용하여 30분 동안 알킬화시킨다. 그 후에, 단백질을 6 용적의 냉각된(-20°C) 아세톤의 점진적인 첨가에 의해 침전시키고, -80°C에서 밤새 인큐베이션한다.
- [1444] 단백질을 펠렛화하고, 냉각된(-20°C) 메탄올로 3회 세척하고, 50 mM Tris pH 8에서 재현탁시킨다. 다음, 3.33 μ g의 트립신/lysC를, 37°C에서 제1의 4시간 분해를 위해 단백질에 교반하면서 첨가한다. 시료를 50 mM Tris pH 8로 희석시키고, 0.1% 소듐 데옥시클로레이트를, 분해를 위해 또 다른 3.3 μ g의 트립신/lysC와 함께 37°C에서 교반하면서 첨가한다. 분해를 중단시키고, 2% v/v 포름산의 첨가에 의해 소듐 데옥시클로레이트를 제거한다. 시료를 보텍싱시키고, 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리에 의해 정제한다.
- [1445] 단백질을 역상 고체상 추출(SPE)에 의해 정제하고, 건조 침강시킨다. 시료를 수 중 20 μ l의 3% DMSO, 0.2% 포름산에서 재구성하고, 이전에 기재된 바와 같이 LC-MS에 의해 분석한다.
- [1446] 생성된 단백질 정량화 데이터를 분석하여, 공지된 엑소좀 마커 단백질의 단백질 수준 및 비율을 결정한다. 구체적으로: 테트라스페닌 과 단백질(CD63, CD9, 또는 CD81), ESCRT-관련 단백질(TSG101, CHMP4A-B, 또는 VPS4B),

Alix, TSG101, MHC1, MHCII, GP96, 액티닌-4, 미토피린, 신테닌-1, TSG101, ADAM10, EHD4, 신테닌-1, TSG101, EHD1, 플로틸린-1, 열-충격 70-kDa 단백질(HSC70/HSP73, HSP70/HSP72). 측정된 모든 단백질에 대한 이들 엑소좀 마커 단백질의 물비를, 각각의 시료 내 모든 식별된 단백질의 물 양의 합계로 나눈 상기 기재된 각각의 특이적인 엑소좀 마커 단백질의 물 양으로서 결정하고, 퍼센트로서 표현한다.

- [1447] 유사하게는, 측정된 모든 단백질에 비한 모든 엑소좀 마커 단백질의 물비를, 각각의 시료 내 모든 식별된 단백질의 물 양의 합계로 나눈 상기 열거된 모든 특이적인 엑소좀 마커 단백질의 물 양으로서 결정하고, 전체의 퍼센트로서 표현한다.
- [1448] 일 구현예에서, 이러한 접근법을 사용하여, 시료는 5% 미만의 임의의 개별적인 엑소좀 마커 단백질 및 15% 미만의 총 엑소좀 마커 단백질을 포함할 것이다.
- [1449] 일 구현예에서, 임의의 개별적인 엑소좀 마커 단백질은 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, , 또는 10% 미만으로 존재할 것이다.
- [1450] 일 구현예에서, 모든 엑소좀 마커 단백질의 합계는 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만일 것이다.
- [1451] *실시예 45: 푸소좀에서 GAPDH의 측정*
- [1452] 이 측정법은 푸소좀에서 글리세르알데하이드 3-포스페이트 탈하이드로게나제(GAPDH)의 수준, 및 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 GAPDH의 상대 수준의 정량화를 기재한다.
- [1453] GAPDH를 부모 세포 및 푸소좀에서, GAPDH에 대한 표준의 상업적으로 입수 가능한 ELISA(ab176642, Abcam)를 제조업체의 지시에 따라 측정한다.
- [1454] 총 단백질 수준을 유사하게는, GAPDH를 측정하는 데 사용되는 동일한 용적의 시료에서 이전에 기재된 바와 같이 비신초닌산 측정법을 통해 측정한다. 구현예에서, 이 측정법을 사용하여, 총 단백질 당 GAPDH의 수준은 < 100 ng GAPDH/ μ g 총 단백질일 것이다. 유사하게는, 구현예에서, 부모 세포로부터의 총 단백질에 비해 푸소좀에서 GAPDH 수준의 저하는 10% 초과인 것이다.
- [1455] 일 구현예에서, 조제물 내 GAPDH 함량 ng GAPDH/ μ g 총 단백질은 500 미만, 250 미만, 100 미만, 50 미만, 20 미만, 10 미만, 5 미만 또는 1 미만일 것이다.
- [1456] 일 구현예에서, 부모 세포로부터 조제물까지 총 단백질 당 GAPDH ng/ μ g의 저하는 1% 초과, 2.5% 초과, 5% 초과, 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과 또는 90% 초과일 것이다.
- [1457] *실시예 46: 푸소좀에서 칼넥신의 측정*
- [1458] 이 측정법은 푸소좀에서 칼넥신(CNX)의 수준, 및 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 CNX의 상대 수준의 정량화를 기재한다.
- [1459] 칼넥신을 출발 세포 및 조제물에서, 칼넥신에 대한 표준 상업적으로 입수 가능한 ELISA(MBS721668, MyBioSource)를 제조업체의 지시에 따라 사용하여 측정한다.
- [1460] 총 단백질 수준을 유사하게는, 칼넥신을 측정하는 데 사용되는 동일한 용적의 시료에서 이전에 기재된 바와 같이 비신초닌산 측정법을 통해 측정한다. 구현예에서, 이 측정법을 사용하여, 총 단백질 당 칼넥신의 수준은 < 100 ng 칼넥신/ μ g 총 단백질일 것이다. 유사하게는, 구현예에서, 부모 세포로부터 푸소좀까지 총 단백질에 비해 칼넥신 수준의 증가는 10% 초과인 것이다.
- [1461] 일 구현예에서, 조제물 내 칼넥신 함량 ng 칼넥신/ μ g 총 단백질은 500 미만, 250 미만, 100 미만, 50 미만, 20 미만, 10 미만, 5 미만 또는 1 미만일 것이다.
- [1462] 일 구현예에서, 부모 세포로부터 조제물까지 총 단백질 당 칼넥신 ng/ μ g의 저하는 1% 초과, 2.5% 초과, 5% 초과, 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과 또는 90% 초과일 것이다.
- [1463] *실시예 47: 불용성 단백질 질량에 대한 가용성 단백질 함량의 비교*
- [1464] 이 실시예는 푸소좀에서 단백질 질량의 가용성:불용성 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀에서 단

백질 질량의 가용성:불용성 비는 유핵 세포와 유사할 것이다.

- [1465] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀 조제물을 시험하여, 표준 비신초닌산 검정법(BCA)(예를 들어 상업적으로 입수 가능한 Pierce™ BCA 단백질 검정법 키트를 사용함, Thermo Fischer product# 23225)을 사용하여 가용성 : 불용성 단백질 비를 결정한다. 제조된 푸소좀 또는 부모 세포를 PBS에 1×10^7 세포 또는 푸소좀/mL의 농도로 현탁시키고, 1600 g에서 원심분리하여, 푸소좀 또는 세포를 펠렛화함으로써, 가용성 단백질 시료를 제조한다. 상층액을 가용성 단백질 분획으로서 수합한다.
- [1466] 펠렛 내 푸소좀 또는 세포를, 2% 트리톤-X-100을 갖는 PBS에서 격렬한 피펫팅 및 보텍싱에 의해 용해시킨다. 용해된 분획은 불용성 단백질 분획을 나타낸다.
- [1467] 표준 곡선을, 1개 웰 당 0 내지 20 μ g의 BSA의 공급된 BSA를 사용하여 발생시킨다(3별 중복). 측정되는 양이 표준의 범위 내에 있도록 푸소좀 또는 세포 조제물을 희석시킨다. 푸소좀 조제물을 3별 중복으로 분석하고, 평균 값을 사용한다. 가용성 단백질 농도를 불용성 단백질 농도로 나누어서, 가용성:불용성 단백질 비를 산출한다.
- [1468] 일 구현예에서, 푸소좀 가용성:불용성 단백질 비는 부모 세포와 비교하여, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 이내일 것이다.
- [1469] 실시예 48: 푸소좀에서 LPS의 측정
- [1470] 이 실시예는 부모 세포와 비교하여, 푸소좀에서 리포다당류(LPS)의 수준의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 LPS를 가질 것이다.
- [1471] LPS는 박테리아 막의 구성성분이고 내재 면역 반응의 강력한 유도자이다.
- [1472] LPS 측정은 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 질량 분광분석에 기초한다.
- [1473] 일 구현예에서, 5%, 1%, 0.5%, 0.01%, 0.005%, 0.0001%, 0.00001% 이하보다 적은, 푸소좀의 지질 함량이 LPS일 것이다.
- [1474] 실시예 49: 푸소좀에서 단백질에 대한 지질의 비
- [1475] 이 실시예는 푸소좀에서 단백질 질량에 대한 지질 질량의 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 유핵 세포와 유사한, 단백질 질량에 대한 지질 질량의 비를 가질 것이다.
- [1476] 총 지질 함량을, 이전의 실시예에 나열된 지질체학(lipidomics) 데이터에서 식별된 모든 지질의 몰 함량의 합계로서 계산한다. 푸소좀의 총 단백질 함량을 본원에 기재된 바와 같이 비신초닌산 검정법을 통해 측정한다.
- [1477] 대안적으로, 단백질에 대한 지질의 비는 특이적인 단백질에 대한 특이적인 지질 화학종의 비로서 기재될 수 있다. 특이적인 지질 화학종을 이전의 실시예에서 생성된 지질체학 데이터로부터 선별한다. 특이적인 단백질은 이전의 실시예에서 생성된 단백질 데이터로부터 선별된다. 선별된 지질 화학종과 단백질의 상이한 조합을 사용하여, 특이적인 지질:단백질 비를 정의한다.
- [1478] 실시예 50: 푸소좀에서 DNA에 대한 단백질의 비
- [1479] 이 실시예는 푸소좀에서 DNA 질량에 대한 단백질 질량의 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 세포보다 훨씬 더 큰, DNA 질량에 대한 단백질 질량의 비를 가질 것이다.
- [1480] 푸소좀 및 세포의 총 단백질 함량을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 측정한다. 푸소좀 및 세포의 DNA 질량을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 측정한다. 그 후에, 총 단백질 함량을 총 DNA 함량으로 나눔으로써, 총 핵산에 대한 단백질의 비를 결정하여, 전형적인 푸소좀 조제물에 대한 주어진 범위 내에서 비를 산출한다.
- [1481] 대안적으로, 반-정량적 실시간 PCR(RT-PCR)을 사용하여 핵산 수준을 특이적인 하우스-키팅 유전자, 예컨대 GAPDH의 수준으로서 정의함으로써, 핵산에 대한 단백질의 비를 결정한다.
- [1482] 그 후에, 총 단백질 함량을 총 GAPDH DNA 함량으로 나눔으로써, 전형적인 푸소좀 조제물에 대한 단백질:핵산 비의 특이적인 범위를 정의하여, GAPDH 핵산에 대한 단백질의 비를 결정한다.
- [1483] 실시예 51: 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비
- [1484] 이 실시예는 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸

소즘은 부모 세포와 비교하여, 더 큰, DNA 부모에 대한 지질의 비를 가질 것이다.

- [1485] 이러한 비는 총 지질 함량(상기 실시예에서 나열됨) 또는 특이적인 지질 화학종으로서 정의된다. 특이적인 지질 화학종의 경우, 범위는 선별된 특이적인 지질 화학종에 의존한다. 특이적인 지질 화학종을 이전에 기재된 실시예에서 생성된 지질체학 데이터로부터 선별한다. 핵산 함량을 이전에 기재된 실시예에 기재된 바와 같이 결정한다.
- [1486] 핵산 함량으로 정규화된 선별된 지질 화학종의 상이한 조합을 사용하여, 특정 푸소즘 조제물의 특징인 특이적인 지질:핵산 비를 정의한다.
- [1487] *실시예 52: 푸소즘 상에서 표면 마커의 분석*
- [1488] 이 검정법은 푸소즘 상에서 표면 마커의 식별을 기재한다.
- [1489] 푸소즘을 펠렛화하고, 표준 생물학적 시료 취급 절차에 따라 단백질 분석 센터로 냉동시켜 운송한다.
- [1490] 푸소즘 상에서 표면 마커의 존재 또는 부재를 식별하기 위해, 이들 푸소즘을 포스파티딜 세린 및 CD40 리간드에 대항한 마커로 염색시키고, FACS 시스템(Becton Dickinson)을 사용하는 유세포분석에 의해 분석한다. 표면 포스파티딜세린의 검출을 위해, 분석물을 아넥신 V 검정법(556547, BD Biosciences)을 제조업체에 의해 기재된 바와 같이 이용하여 분석한다.
- [1491] 간략하게는, 푸소즘을 냉각된 PBS로 2회 세척하고, 그 후에, 1X 결합 완충제에서 1×10^6 푸소즘/ml의 농도로 재현탁시킨다. 10%의 재현탁액을 5 ml 배양 튜브로 이송하고, 5 μ l의 FITC 아넥신 V를 첨가한다. 세포를 부드럽게 보텍싱하고, 암실에서 실온(25°C)에서 15분 동안 인큐베이션한다.
- [1492] 병행하여, 별개의 10%의 재현탁액을, 비-염색된 대조군로서 작용하는 상이한 튜브에 이송한다. 1X 결합 완충제를 각각의 튜브에 첨가한다. 시료를 유세포분석에 의해 1시간 이내에 분석한다.
- [1493] 일부 구현예에서, 이 검정법을 사용하여, 염색된 푸소즘 집단의 평균은 비-염색된 세포의 평균보다 높은 것으로 결정될 것이고, 이는 푸소즘이 포스파티딜 세린을 포함함을 시사할 것이다.
- [1494] 유사하게는, CD40 리간드에 대해, 하기 모노클로날 항체를 또 다른 10%의 세척된 푸소즘: PE-CF594 마우스 항-인간 CD154 클론 TRAP1(563589, BD Pharmigen)에 제조업체의 지시에 따라 첨가한다. 간략하게는, 포화된 양의 항체를 사용한다. 병행하여, 별개의 10%의 푸소즘을, 비-염색된 대조군으로 작용하기 위해 상이한 튜브에 이송한다. 상기 튜브를 400 X g, 실온에서 5분 동안 원심분리한다. 상층액을 경사분리하고, 펠렛을 유세포분석 세척 용액으로 2회 세척한다. 0.5 ml의 1% 파라포름알데하이드 고정제를 각각의 튜브에 첨가한다. 각각을 간략하게는 보텍싱하고, 유세포분석기 상에서 분석할 때까지 4°C에 저장한다.
- [1495] 일 구현예에서, 이 검정법을 사용하여, 염색된 푸소즘 집단의 평균은 비-염색된 세포의 평균보다 높을 것이고, 이는 푸소즘이 CD40 리간드를 포함함을 시사할 것이다.
- [1496] *실시예 53: 푸소즘에서 바이러스 캡시드 단백질의 분석*
- [1497] 이 검정법은 시료 조제물의 구성의 분석을 기재하고, 바이러스 캡시드 공급원으로부터 유래된 단백질의 비율을 평가한다.
- [1498] 푸소즘을 펠렛화하고, 표준 생물학적 시료 취급 절차에 따라 단백질 분석 센터로 냉동시켜 운송한다.
- [1499] 단백질 추출 및 분석을 위해 푸소즘을 해동시킨다. 우선, 이들 푸소즘을 용해 완충제(50 mM Tris pH 8.0 중 7 M 우레아, 2 M 티오우레아, 4% (w/v) chaps)에 재현탁시키고, 실온에서 15분 동안 이따금 보텍싱하면서 인큐베이션한다. 그 후에, 혼합물을 얼음 배스 내에서 5분 동안 초음파처리에 의해 용해시키고, 13,000 RPM에서 5분 동안 회전 침강시킨다. 총 단백질 함량을 비색 검정법(Pierce)에 의해 결정하고, 각각의 시료로부터 100 μ g의 단백질을 새 튜브에 이송하고, 용적을 50 mM Tris pH 8로 조정한다.
- [1500] 단백질을 65°C에서 10 mM DTT를 이용하여 15분 동안 환원시키고, 암실에서 실온에서 15 mM 요오도아세타미드를 이용하여 30분 동안 알킬화시킨다. 그 후에, 단백질을 6 용적의 냉각된(-20°C) 아세톤의 점진적인 첨가에 의해 침전시키고, -80°C에서 밤새 인큐베이션한다.
- [1501] 단백질을 펠렛화하고, 냉각된(-20°C) 메탄올로 3회 세척하고, 50 mM Tris pH 8에서 재현탁시킨다. 다음, 3.33 μ g의 트립신/lysC를, 37°C에서 제1의 4시간 분해를 위해 단백질에 교반하면서 첨가한다. 시료를 50 mM Tris pH 8로 희석시키고, 0.1% 소듐 데옥시클로레이트를, 분해를 위해 또 다른 3.3 μ g의 트립신/lysC와 함께 37°C에서

교반하면서 첨가한다. 분해를 중단시키고, 2% v/v 포름산의 첨가에 의해 소듐 테옥시클로레이트를 제거한다. 시료를 보텍싱시키고, 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리에 의해 정제한다.

- [1502] 단백질을 역상 고체상 추출(SPE)에 의해 정제하고, 건조 침강시킨다. 시료를 수 중 20 μ l의 3% DMSO, 0.2% 포름산에서 재구성하고, 이전에 기재된 바와 같이 LC-MS에 의해 분석한다.
- [1503] 측정된 모든 단백질에 비해 바이러스 캡시드 단백질의 물비를, 각각의 시료 내 모든 식별된 단백질의 물 양의 합계로 나눈 모든 바이러스 캡시드 단백질의 물 양으로서 결정하고, 퍼센트로서 표현한다.
- [1504] 일 구현예에서, 이러한 접근법을 사용하여, 시료는 10% 미만의 바이러스 캡시드 단백질을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 시료는 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 바이러스 캡시드 단백질을 포함할 것이다.
- [1505] 실시예 54: 표적 세포와의 융합의 측정
- [1506] 이 실시예는 비-표적 세포와 비교하여, 표적 세포와의 푸소좀 융합의 정량화를 기재한다.
- [1507] 일 구현예에서, 표적 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포의 세포기질로의, 푸소좀의 내강 내에 운반된 적재물의 세포-특이적인 전달을 허용한다. 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을 하기와 같이 표적 세포와의 융합율에 대해 검정한다.
- [1508] 이 실시예에서, 푸소좀은 마이오마커를 HEK293T 세포의 형질막에 발현하는 이러한 HEK293T 세포를 포함한다. 또한, 푸소좀은 mTagBFP2 형광 단백질 및 Cre 리컴비나제를 발현한다. 표적 세포는 마이오마커와 마이오믹서 둘 모두를 발현하는 근아세포 세포이고, 비-표적 세포는 마이오마커 또는 마이오믹스 중 어느 것도 발현하지 않는 섬유아세포 세포이다. 마이오마커-발현 푸소좀은, 비-표적 세포가 아니라 마이오마커와 마이오믹서 둘 모두를 발현하는 표적 세포와 융합하는 것으로 예측된다(문헌[Quinn et al., 2017, Nature Communications, 8, 15665. doi.org/10.1038/ncomms15665] [Millay et al., 2013, Nature, 499(7458), 301-305. doi.org/10.1038/nature12343]). 표적 세포 유형과 비-표적 세포 유형 둘 모두는 마우스로부터 단리되고, Cre에 의한 재조합 시 tdTomato 발현을 켜는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-정지-LoxP-tdTomato" 카세트를 안정하게 발현시키며, 이는 융합을 나타낸다.
- [1509] 표적 또는 비-표적 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 평판배양한다. 표적 세포와 비-표적 세포 둘 모두를 상이한 융합 군에 대해 평판배양한다. 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre 리컴비나제 단백질 및 마이오마커를 발현하는 푸소좀을 DMEM 배지 내 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용한다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 돕는다.
- [1510] 푸소좀 적용 후 4시간째에 출발하여, 세포 웰을 필드 또는 웰 내 RFP-양성 세포 대 GFP-양성 세포를 양성적으로 (positively) 식별하기 위해 이미지화한다.
- [1511] 이 실시예에서, 세포 플레이트를, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화한다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 우선, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 주어진 웰 내 총 세포 집단을 결정한다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는데 사용된다. 염색 후, Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체한다.
- [1512] Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 표적 및 비-표적 세포 웰의 이미지를 획득한다.
- [1513] RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정한다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화한다. 웰을 4시간마다 이미지화하여, 융합 활성 속도에 대한 시간-경과 데이터를 획득한다.
- [1514] GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, 형광 현미경이 구비된 소프트웨어 또는 다른 소프트웨어를 이용하여 수행한다(문헌[Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007]).

- [1515] 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘(subtraction algorithm)을 사용하여 예비-가공한다. 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정한다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 사용하여 역치를 설정하고, 너무 작거나 너무 큰 Hoechst-양성 세포를 배제한다.
- [1516] 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치를 설정하고, 전체 GFP 및 RFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 GFP 및 RFP-양성 세포를 식별한다. 표적 또는 비-표적 수여자 세포를 함유하는 대조군 웰에서 식별된 RFP-양성 세포의 수를, (비-특이적인 Loxp 재조합을 차감시키기 위해) 푸소좀을 함유하는 웰 내 RFP-양성 세포의 수로부터 차감하는 데 사용한다. 그 후에, RFP-양성 세포(융합된 수여자 세포)의 수를 각각의 시점에서의 GFP-양성 세포(융합되지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, 수여자 세포 집단 내 푸소좀 융합율을 정량화한다. 상기 비율(rate)을 수여자 세포에게 적용된 푸소좀의 주어진 용량으로 정규화한다. 표적화된 융합율(표적화된 세포로의 푸소좀 융합율)에 대해, 표적화된 융합율을 정량화하기 위해, 비-표적 세포에 대한 융합율을 표적 세포에 대한 융합율로부터 차감시킨다.
- [1517] 일 구현예에서, 푸소좀과 표적 세포의 평균 융합율은 표적 세포 융합에 대해 1시간 당 0.01-4.0 RFP/GFP 세포의 범위에 있거나, 비-표적 수여자 세포와 푸소좀보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상일 것이다. 일 구현예에서, 적용된 푸소좀이 없는 그룹은 1시간 당 <0.01 RFP/GFP 세포의 백그라운드율을 보여줄 것이다.
- [1518] 실시예 55: 막 단백질질을 전달하기 위한 시험관내 융합
- [1519] 이 실시예는 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합을 기재한다. 일 구현예에서, 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포로의 활성 막 단백질의 전달을 초래한다.
- [1520] 이 실시예에서, 센다이 바이러스 HVJ-E 단백질을 발현하는 HEK293T 세포로부터 푸소좀을 발생시킨다(문헌[Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22(October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12]). 일 구현예에서, 푸소좀이, 주로 근육 및 지방 조직에서 확인되고 세포 내로의 글루코스의 인슐린-조절 수송을 책임지는 막 단백질, GLUT4를 발현하도록 발생시킨다. GLUT4가 있는 푸소좀 및 GLUT4가 없는 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 임의의 방법에 의해 기재된 바와 같이 HEK293T 세포로부터 제조한다.
- [1521] 그 후에, 근육 세포, 예컨대, C2C12 세포를, GLUT4를 발현하는 푸소좀, GLUT4를 발현하지 않는 푸소좀, PBS(음성 대조군), 또는 인슐린(양성 대조군)으로 처리한다. C2C12 세포 상에서 GLUT4의 활성을 형광 2-데옥시글루코스 유사체, 2-[N-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아솔-4-일)아미노]-2-데옥시글루코스(2-NBDG)의 흡수에 의해 측정한다. C2C12 세포의 활성을, 이전의 실시예에 기재된 방법을 사용하여 현미경을 통해 평가한다.
- [1522] 일 구현예에서, GLUT4를 발현하는 푸소좀 및 인슐린으로 처리된 C2C12 세포는, PBS 또는 GLUT4를 발현하지 않는 푸소좀으로 처리된 C2C12 세포와 비교하여, 증가된 형광을 실증하는 것으로 예상된다.
- [1523] 또한, 문헌[Yang et al., *Advanced Materials* 29, 1605604, 2017]을 참조한다.
- [1524] 실시예 56: 막 단백질질의 생체내 전달
- [1525] 이 실시예는 생체내에서 세포와의 푸소좀 융합을 기재한다. 일 구현예에서, 생체내에서 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포로의 활성 막 단백질의 전달을 초래한다.
- [1526] 이 실시예에서, 푸소좀을 이전의 실시예에서와 같이 센다이 바이러스 HVJ-E 단백질을 발현하는 HEK293T 세포로부터 발생시킨다. 일 구현예에서, 푸소좀을, 막 단백질, GLUT4를 발현하도록 발생시킨다. GLUT4가 있는 푸소좀 및 GLUT4가 없는 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 임의의 방법에 의해 기재된 바와 같이 HEK293T 세포로부터 제조한다.
- [1527] BALB/c-nu 마우스에게, GLUT4를 발현하는 푸소좀, GLUT4를 발현하지 않는 푸소좀, 또는 PBS(음성 대조군)를 투여한다. 마우스의 전경골 근육에 푸소좀 또는 PBS를 근육내 주사한다. 푸소좀 투여 직전, 마우스를 12시간 동안 단식시키고, 양전자 방출 단층촬영(PET 이미징)을 가능하게 하는 글루코스의 유사체인 [^{18}F] 2-플루오로-2-데옥시- α -글루코스(^{18}F -FDG)를 주사한다. 마우스에게 마취(2% 이소플루란) 하에 꼬리 정맥을 통해 ^{18}F -FDG를 주사한다. PET 이미징을 나노척도 이미징 시스템(1T, Mediso, Hungary)을 사용하여 수행한다. 이미징을 푸소좀 투여 후 4 시간째에 수행한다. 이미징 직후, 마우스를 안락사시키고, 전경골 근육을 칭량한다. 3D 이미징 시스템을 완전 검출기(full detector) 모드에서 사용하여 PET 이미지를 재구성하며, 이때, 높은 규칙화(regularization) 및 8

반복(iteration) 상에서 모두 교정(correction)한다. 재구성된 이미지의 관심 3-차원 용적(VOI) 분석을, 이미징 소프트웨어 패키지(Mediso, Hungary)를 사용하고 표준 흡수 값(SUV) 분석을 적용함으로써 수행한다. 2 mm 구체(sphere) 직경으로 고정된 VOI를 전경골 근육 부위에 대해 도시한다. 각각의 VOI 부위의 SUV를 하기 식에 따라 계산한다: $SUV = (Bq/cc \times \text{체중으로서 측정된, 관심 용적에서의 방사성 활성}) / \text{주사된 방사성 활성}$.

[1528] 일 구현예에서, GLUT4를 발현하는 푸소좀을 투여한 마우스는, PBS 또는 GLUT4를 발현하지 않는 푸소좀을 투여한 마우스와 비교하여, VOI에서 증가된 방사성 활성 신호를 실증하는 것으로 예상된다.

[1529] 또한, 문헌[Yang et al., *Advanced Materials* 29, 1605604, 2017]을 참조한다.

[1530] 실시예 57: 혈관으로부터의 유출 측정

[1531] 이 실시예는 시험관내 미세유체 시스템을 이용하여 시험된 바와 같이 내피 단층을 가로지르는 푸소좀 유출의 정량화를 기재한다(문헌[J.S Joen et al., 2013, journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056910]).

[1532] 세포는 맥관구조로부터 주변 조직 내로 침출된다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 유출은 푸소좀이 혈관의 조직에 도달하는 한가지 방식이다.

[1533] 시스템은 3개의 독립적으로 다룰 말한(addressable) 배지 채널을 포함하며, 이들 채널은 ECM-모방 겔이 주사될 수 있는 챔버에 의해 분리된다. 간략하게는, 미세유체 시스템은 몰딩된(molded) PDMS(폴리-디메틸 실록산; Silgard 184; Dow Chemical, MI)를 갖고 있으며, 이를 통해 접근 포트를 뚫고(bored), 커브 글래스에 결합시켜, 미세유체 채널을 형성한다. 채널 단면 치수는 1 mm(폭) x 120 μm(높이)이다. 매트릭스 접착을 증가시키기 위해, PDMS 채널을 PDL(폴리-D-라이신 하이드로브로마이드; 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 용액으로 코팅시킨다.

[1534] 다음, 콜라겐 유형 I(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 용액 (2.0 mg/ml)을 포스페이트-완충 식염수(PBS; Gibco) 및 NaOH와 함께 4개의 별개의 충전 포트(filling port)를 통해 장치의 겔 영역 내로 주사하고, 30분 동안 인큐베이션하여, 하이드로겔을 형성한다. 겔이 중합된 경우, 내피 세포 배지(공급업체, 예컨대 Lonza 또는 Sigma로부터 획득됨)를 채널 내로 즉시 피펫팅하여, 겔의 탈수를 방지한다. 배지의 흡인 시, 희석된 하이드로겔(BD science) 용액(3.0 mg/ml)을 세포 채널 내로 도입하고, 과량의 하이드로겔 용액을 냉각된 배지를 사용하여 세척한다.

[1535] 내피 세포를 중간 채널 내로 도입하고, 침강되어 내피를 형성하도록 허용한다. 내피 세포 접종 후 2일째에, 푸소좀 또는 대식세포 세포(양성 대조군)를, 내피 세포가 완전 단층을 형성한 동일한 채널 내로 도입한다. 푸소좀을 도입하며, 따라서 이들 푸소좀이 단층에 접촉하고 상기 단층을 가로질러 겔 영역 내로 이전한다. 배양물을 습윤화된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO₂에서 유지시킨다. 푸소좀의 GFP-발현 버전을 사용하여, 살아 있는-세포 이미징을 형광 현미경을 통해 가능하게 한다. 이튿날, 세포를 고정하고, 챔버 내에서 DAPI 염색을 사용하여 핵에 대해 염색하고, 다수의 관심 영역을 공초점 현미경을 사용하여 이미지화하여, 얼마나 많은 푸소좀이 내피 단층을 통과하였는지 결정한다.

[1536] 일 구현예에서, DAPI 염색은, 푸소좀 및 양성 대조군 세포가 접종 후 내피 장벽을 통과할 수 있음을 시사할 것이다.

[1537] 실시예 58: 화학주성 세포 이동성의 측정

[1538] 이 실시예는 푸소좀 화학주성의 정량화를 기재한다. 세포는 화학주성을 통해 화학 구배 쪽으로 또는 화학 구배로부터 멀리 이동할 수 있다. 일 구현예에서, 화학주성은 푸소좀이 상해 부위까지 귀소하거나 병원체를 추적할 수 있게 허용할 것이다. 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 정제된 푸소좀 조성물을 하기과 같이 이의 화학주성 능력에 대해 검정한다.

[1539] 충분한 수의 푸소좀 또는 대식세포 세포(양성 대조군)를 제조업체가 제공한 프로토콜에 따라 마이크로-슬라이드 웰 내 DMEM 배지에 로딩한다 (ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8032X_Chemotaxis/IN_8032X_Chemotaxis.pdf). 푸소좀을 37℃ 및 5% CO₂에서 1시간 동안 방치하여, 부착시킨다. 세포 부착 후, DMEM(음성 대조군), 또는 MCP1 화학주성제를 함유하는 DMEM을 중심 채널의 인접 저장고 내로 로딩하고, 푸소좀을 Zeiss 도립 와이드필드 현미경을 사용하여 2시간 동안 연속적으로 이미지화한다. 이미지를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석한다(Rasband,

W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007). 각각의 관찰된 푸소좀 또는 세포에 대한 이동 코-오디네이션(co-ordination) 데이터를 수동 추적 플러그인(plugin)(Fabrice Cordelieres, Institut Curie, Orsay, France)을 이용하여 획득한다. 화학주성 플롯 및 이동 속도를, 화학주성 및 이동 툴(ibidi)을 이용하여 결정한다.

[1540] 일 구현예에서, 푸소좀의 평균 누적 거리 및 이동 속도는 케모카인에 대한 양성 대조군 세포의 반응보다 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 이내에 있을 것이다. 케모카인에 대한 세포의 반응은 예를 들어 문헌[Howard E. Gendelman et al., *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(1): 47-59, 2009]에 기재되어 있다.

[1541] 실시예 59: 귀소 잠재력의 측정

[1542] 이 실시예는 상해 부위로의 푸소좀의 귀소를 기재한다. 세포는 원위부 부위로부터 이동하며 및/또는 특이적인 부위에서 누적될 수 있으며, 예를 들어 부위로 귀소할 수 있다. 전형적으로, 상기 부위는 상해 부위이다. 일 구현예에서, 푸소좀은 상해 부위로 귀소하며, 예를 들어 상해 부위로 이동하거나 상해 부위에서 누적될 것이다.

[1543] 8 주령의 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratories)에게 멸균 식염수 중 노텍신(NTX; notexin)(Accurate Chemical & Scientific Corp), 미오톡신(myotoxin)을 30G 바늘을 사용하여 우측 전경골(TA) 근육 내로 2 μ g/mL의 농도에서 근육내(IM) 주사에 의해 투약한다. 화학적 제모제를 45초 동안 사용하고, 뒤이어 물로 3회 헹구어서 전경골(TA) 근육에 걸친 피부 영역을 제모함으로써, 상기 전경골(TA) 근육에 걸친 피부를 준비한다. 이 농도는, 근섬유의 최대 퇴행, 뿐만 아니라 이들의 위성 세포, 운동 축삭 및 혈관내의 최소 손상을 보장하도록 선택된다.

[1544] NTX 주사 후 제1일에, 마우스는 파이어플라이 루시페라제를 발현하는 푸소좀 또는 세포의 IV 주사를 받는다. 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 파이어플라이 루시페라제를 안정하게 발현하는 세포로부터 푸소좀을 생성한다. 생물발광 이미징 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여, 주사 후 0, 1, 3, 7, 21 및 28일에 생물발광의 전체 동물 이미지를 취득한다.

[1545] 이미징 전 5분째에, 루시페라제를 가시화하기 위해, 마우스는 150 mg/kg 용량의 생물발광 기질(Perkin Elmer)의 복강내 주사를 받는다. 이미징 시스템을 보정하여, 모든 장치 세팅을 보상한다. 레이디언스 광자(Radiance Photon)를 사용하여 생물발광 신호를 측정하고, 이때, 총 유속을 측정된 값으로서 사용한다. 값을 광자/초(second)로 제공하기 위해, ROI의 신호를 서라운드(surrounding)함으로써, 관심 영역(ROI)을 발생시킨다. ROI를, NTX로 처리된 TA 근육 상과 대측(contralateral) TA 근육 상 둘 모두에서 평가하고, NTX-처리된 TA 근육과 NTX-비처리된 TA 근육 사이의 광자/초의 비를 NTX-처리된 근육으로의 귀소의 측정치로서 계산한다.

[1546] 일 구현예에서, 푸소좀 및 세포에서 NTX-처리된 TA 근육과 NTX-비처리된 TA 근육 사이의 광자/초의 비는 1보다 클 것이며, 이는 상해에서 루시페라제-발현 푸소좀의 부위 특이적인 누적을 시사할 것이다.

[1547] 예를 들어, 문헌[Plant et al., *Muscle Nerve* 34(5): 577-85, 2006]을 참조한다.

[1548] 실시예 60: 식세포 활성의 측정

[1549] 이 실시예는 푸소좀의 식세포 활성을 실증한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 식세포 활성을 가지며, 예를 들어 식작용을 할 수 있다. 세포는 식작용에서 포식 입자를 고용하여, 박테리아 또는 사멸된 세포와 같은 외래 침입자의 격리 및 파괴를 가능하게 한다.

[1550] 부분적인 또는 완전한 핵 불활성화를 갖는 포유류 대식세포로부터의 푸소좀을 포함하는, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 정제된 푸소좀 조성물은 병원체 생물입자를 통해 검정되는 식작용을 할 수 있었다. 이러한 측정은 형광 식작용 검정법을 하기 프로토콜에 따라 사용함으로써 수행하였다.

[1551] 대식세포(양성 대조군) 및 푸소좀을 별개의 공초점 유리 바닥 디쉬에서 수합 직후, 평판배양하였다. 대식세포 및 푸소좀을 DMEM+10%FBS+1%P/S에서 1시간 동안 인큐베이션하여 부착시켰다. 플루오레신-표지된 *E. coli* K12 및 비-플루오레신-표지된 *에스케리키아 콜라이*(*Escherichia coli*) K-12(음성 대조군)를 대식세포/푸소좀에 제조업체의 프로토콜에서 제시된 바와 같이 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션하였다. tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf. 2시간 후, 트립판 블루를 첨가함으로써, 자유(free) 형광 입자를 린칭하였다. 포식된 입자에 의해 방출되는 세포내 형광을 공초점 현미경에 의해 488 여기에서 이미지화하였다. 식세포 양성 푸소좀의 수를 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

- [1552] 생물입자 도입 후 2시간째에 식세포성 푸소좀의 평균 수는 적어도 30%였고, 양성 대조군 대식세포에서 30% 초과였다.
- [1553] 실시예 61: 세포막 또는 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 능력의 측정
- [1554] 이 실시예는 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 푸소좀의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 예를 들어 중추 신경계로의 전달을 위해 혈액 뇌 장벽을 가로지르며, 예를 들어 혈액 뇌 장벽에 들어가고 나올 것이다.
- [1555] 8 주령의 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratories)에게, 파이어플라이 루시퍼라제를 발현하는 푸소좀 또는 백혈구(양성 대조군)를 정맥내로 주사한다. 푸소좀은 파이어플라이 루시퍼라제를 안정하게 발현하는 세포 또는 루시퍼라제를 발현하지 않는 세포로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 생물발광 이미징 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여, 푸소좀 또는 세포 주사 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 및 24시간째에 생물발광의 전체-동물 이미지를 수득한다.
- [1556] 이미징 전 5분째에, 루시퍼라제를 가시화하기 위해, 마우스는 150 mg/kg 용량의 생물발광 기질(Perkin Elmer)의 복강내 주사를 받는다. 이미징 시스템을 보정하여, 모든 장치 세팅을 보상한다. 생물발광 신호를 측정하고, 이때, 총 유속을 측정된 값으로서 사용한다. 값을 광자/초로 제공하기 위해, ROI의 신호를 서라운딩함으로써, 관심 영역(ROI)을 발생시킨다. 선별된 ROI는 뇌를 포함하는 영역 주변의 마우스의 머리이다.
- [1557] 일 구현예에서, ROI에서의 광자/초는 루시퍼라제를 발현하지 않는 음성 대조군 푸소좀보다 루시퍼라제를 발현하는 세포 또는 푸소좀이 주사된 동물에서 더 클 것이며, 이는 뇌 내에서 또는 뇌 주변에서 루시퍼라제-발현 푸소좀의 누적을 시사할 것이다.
- [1558] 실시예 62: 단백질 분비에 대한 잠재력의 측정
- [1559] 이 실시예는 푸소좀에 의한 분비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 분비, 예를 들어 단백질 분비를 할 수 있을 것이다. 세포는 분비를 통해 물질을 폐기하거나 배출시킬 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀은 이들의 환경에서 분비를 통해 화학적으로 상호작용하고 소통할 것이다.
- [1560] 주어진 속도에서 단백질을 분비하는 푸소좀의 능력을, ThermoFisher Scientific(카탈로그 #16158)로부터의 Gaussia 루시퍼라제 플래쉬 검정법을 사용하여 결정한다. 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 마우스 배아 섬유아세포 세포(양성 대조군) 또는 푸소좀을 성장 배지 내에서 인큐베이션하고, 우선 푸소좀을 1600 g에서 5분 동안 펠렛화하고 그 후에 상층액을 수합함으로써 배지 시료를 15분마다 수합한다. 수합된 시료를 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 피펫팅한다. 그 후에, 검정법 완충제의 작업(working) 용액을 제조업체의 설명에 따라 제조한다.
- [1561] 간략하게는, 콜렌테라진(colenterazine), 루시페린 또는 발광 분자를 플래쉬 검정법 완충제와 혼합하고, 혼합물을, 시료를 함유하는 96 웰 플레이트의 각각의 웰 내로 피펫팅한다. 세포 또는 푸소좀이 결합된 음성 대조군 웰은, 백그라운드 Gaussia 루시퍼라제 신호를 결정하기 위해 성장 배지 또는 검정법 완충제를 포함한다. 또한, 발광 신호를 1시간 당 Gaussia 루시퍼라제 분비의 분자로 전환시키기 위해, 정제된 Gaussia 루시퍼라제(Athena Enzyme Systems, 카탈로그 #0308)의 표준 곡선을 만든다.
- [1562] 상기 플레이트를, 500 msec 통합을 사용하여 발광에 대해 검정한다. 백그라운드 Gaussia 루시퍼라제 신호를 모든 시료로부터 차감하고, 그 후에, 선형 최상-적합(best-fit) 곡선을 Gaussia 루시퍼라제 표준 곡선에 대해 계산한다. 시료 관독이 표준 곡선 내에서 적합화하지 않으면, 이들은 적절하게 희석되고 재-검정된다. 이 검정법을 사용하여, Gaussia 루시퍼라제를 주어진 범위 내의 속도(분자/시)에서 분비하는 푸소좀 능력을 결정한다.
- [1563] 일 구현예에서, 푸소좀은 양성 대조군 세포보다 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상의 속도로 단백질을 분비할 수 있다.
- [1564] 실시예 63: 신호 전달 잠재력의 측정
- [1565] 이 실시예는 푸소좀에서 신호 전달의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 신호 전달을 할 수 있다. 세포는 신호 전달로서 공지된 과정에서 신호전달 캐스케이드, 예컨대 인산화를 통해 세포외 환경으로부터 분자 신호를 보내고 받을 수 있다. 부분적인 또는 완전한 핵 불활성화를 갖는 포유류 세포로부터의 푸소좀을 포함하는, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 정제된 푸소좀 조성물은 인슐린에 의해 유도되는 신호 전달을 할 수 있다. AKT 인산화 수준, 인슐린 수용체 신호전달 캐스케이드에서 주요(key) 경로, 및 인슐린에 반응하는 글루코스 흡수를 측정함으로써, 인슐린에 의해 유도되는 신호 전달을 평가한다.

- [1566] AKT 인산화를 측정하기 위해, 세포, 예를 들어 마우스 배아 섬유아세포(MEF)(양성 대조군), 및 푸소좀을 48-웰 플레이트에 평판배양하고, 습윤화된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO₂에서 2시간 동안 방치한다. 세포 부착 후, 인슐린(예를 들어 10 nM에서), 또는 인슐린이 없는 음성 대조군 용액을, 세포 또는 푸소좀을 함유하는 웰에 30 분 동안 첨가한다. 30분 후, 단백질 용해물을 푸소좀 또는 세포로부터 제조하고, 포스포-AKT 수준을, 인슐린 자극된 시료 및 대조군 비자극된 시료에서 웨스턴 블로팅에 의해 측정한다.
- [1567] 인슐린 또는 음성 대조군 용액에 반응하여 글루코스 흡수를 측정하며, 이는 표지된 글루코스(2-NBDG)를 사용함으로써 글루코스 흡수 절편에서 설명된다. (문헌[S. Galic et al., Molecular Cell Biology 25(2): 819-829, 2005]).
- [1568] 일 구현예에서, 푸소좀은 인슐린에 반응하여 AKT 인산화 및 글루코스 흡수를 음성 대조군을 능가하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상만큼 증강시킬 것이다.
- [1569] *실시예 64: 세포막을 가로질러 글루코스를 수송하는 능력의 측정*
- [1570] 이 실시예는 살아 있는 세포에서 글루코스 흡수를 모니터링하는 데 사용될 수 있고 따라서 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송을 측정하는 2-NBDG(2-(N-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노)-2-데옥시글루코스) 형광 글루코스 유사체의 수준의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 이러한 검정법은 글루코스 흡수 수준 및 푸소좀의 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송을 측정하는 데 사용될 수 있다.
- [1571] 푸소좀 조성물을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 그 후에, 충분한 수의 푸소좀을 글루코스, 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM에서 37℃ 및 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 2시간의 글루코스 기아 기간 후, 배지는, 상기 배지가 글루코스, 20% 태아 소 혈청, 1x 페니실린/스트렙토마이신 및 20 μM 2-NBDG(ThermoFisher)가 없는 DMEM을 포함하도록 변하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 추가적인 2시간 동안 인큐베이션한다.
- [1572] 2-NBDG 대신에 동일한 양의 DMSO를 첨가하는 점을 제외하고는, 음성 대조군 푸소좀을 동일하게 처리한다.
- [1573] 그 후에, 푸소좀을 1xPBS로 3회 세척하고, 적절한 완충제에 재현탁시키고, 96 웰 이미징 플레이트로 이송한다. 그 후에, 2-NBDG 형광을, GFP 광 큐브(469/35 여기 필터 및 525/39 방출 필터)를 사용하는 형광계수기에서 측정하여, 푸소좀 막을 가로질러 수송되고 푸소좀에서 1시간의 로딩 기간에서 누적된 2-NBDG의 양을 정량화한다.
- [1574] 일 구현예에서, 2-NBDG 형광은 음성(DMSO) 대조군과 비교하여, 2-NBDG 처리된 푸소좀에서 더 높을 것이다. 525/39 방출 필터를 이용한 형광 측정은 존재하는 2-NBDG 분자의 수와 상관관계가 있을 것이다.
- [1575] *실시예 65: 푸소좀의 내강은 수용액과 혼화성이다*
- [1576] 이 실시예는 푸소좀 내강과 수용액, 예컨대 물의 혼화성을 평가한다.
- [1577] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 제조한다. 대조군은 저장성 용액, 고장성 용액 또는 등장성 용액과의 투석 막이다.
- [1578] 푸소좀, 양성 대조군(등장성 용액) 및 음성 대조군(저장성 용액)을 저장성 용액(150 mOsmol)과 함께 인큐베이션한다. 각각의 시료를 수용액에 노출시킨 후, 세포 크기를 현미경 하에 측정한다. 일 구현예에서, 저장성 용액에서 푸소좀 및 양성 대조군 크기는 음성 대조군과 비교하여 증가한다.
- [1579] 푸소좀, 양성 대조군(등장성 용액) 및 음성 대조군(고장성 용액)을 고장성 용액(400 mOsmol)과 함께 인큐베이션한다. 각각의 시료를 수용액에 노출시킨 후, 세포 크기를 현미경 하에 측정한다. 일 구현예에서, 고장성 용액에서 푸소좀 및 양성 대조군 크기는 음성 대조군과 비교하여 저하할 것이다.
- [1580] 푸소좀, 양성 대조군(저장성 또는 고장성 용액) 및 음성 대조군(등장성)을 등장성 용액(290 mOsmol)과 함께 인큐베이션한다. 각각의 시료를 수용액에 노출시킨 후, 세포 크기를 현미경 하에 측정한다. 일 구현예에서, 등장성 용액에서 푸소좀 및 양성 대조군 크기는 음성 대조군과 비교하여 실질적으로 동일한 채로 남아 있을 것이다.
- [1581] *실시예 66: 세포기질에서 에스테라제 활성의 측정*
- [1582] 이 실시예는 푸소좀에서 대사 활성의 대리물로서 에스테라제 활성의 정량화를 기재한다. 푸소좀에서 세포기질 에스테라제 활성을 칼세인-AM 염색의 정량적 평가에 의해 결정한다(문헌[Bratosin et al., Cytometry 66(1): 78-84, 2005]).

- [1583] 막-투과성 염료, 칼세인-AM(Molecular Probes, Eugene OR USA)를, 디메틸설폭사이드 중 10 mM의 스타크 용액으로서, 그리고 PBS 완충제, pH 7.4 중 100 mM의 작업 용액으로서 제조한다. 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 푸소좀 또는 양성 대조군 부모 마우스 배아 섬유아세포 세포를 PBS 완충제에 현탁시키고, 칼세인-AM 작업 용액(칼세인-AM 중 최종 농도: 5 mM)과 함께 37℃, 암실에서 30분 동안 인큐베이션하고, 그 후에, 칼세인 형광 보유의 즉각적인 유세포 분석을 위해 PBS 완충제에서 회석시킨다.
- [1584] 푸소좀 및 대조군 부모 마우스 배아 섬유아세포 세포를 문헌[*Jacob et al., Cytometry* 12(6): 550-558, 1991]에 기재된 바와 같이 사포닌을 이용하여 세포 에스테라제 활성화에 대한 음성 대조군으로서 실험 투과시킨다. 푸소좀 및 세포를, 0.05% 소듐 아자이드를 함유하는 PBS 완충제, pH 7.4 중 1% 사포닌 용액에서 15분 동안 인큐베이션한다. 형질막 투과화의 가역적인 성질로 인해, 사포닌을 추가의 염색 및 세척 단계에 사용되는 모든 완충제에 포함시킨다. 사포닌 투과화 후, 푸소좀 및 세포를, 0.1% 사포닌 및 0.05% 소듐 아자이드를 함유하는 PBS 완충제에 현탁시키고, 칼세인-AM과 함께 5 mM의 최종 농도까지 인큐베이션하고(37℃ 암실에서 45분 동안), 0.1% 사포닌 및 0.05% 소듐 아자이드를 함유하는 동일한 PBS 완충제로 3회 세척하고, 유세포분석에 의해 분석한다. 유세포 분석을 488 nm 아르곤 레이저 여기기를 갖는 FACS 세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 상에서 수행하고, 방출을 530+/-30 nm에서 수합한다. FACS 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용한다. 광 산란 채널을 선형 이득 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다. 상대 에스테라제 활성을 각각의 시료에서 칼세인-AM의 강도에 기초하여 계산한다. 모든 사건을 포워드 및 사이드 스캐터에서 포착한다(대안적으로, 게이트는 푸소좀 집단만 선별하도록 적용될 수 있음). 제각기의 음성 대조군 사포닌-처리된 시료의 FI 값을 차감시킴으로써, 푸소좀에 대한 형광 강도(FI) 값을 결정한다. 세포기질 에스테라제 활성화에 대한 정량적 측정을 발생시키기 위해, 푸소좀 시료에 대한 정규화된 에스테라제 활성을 제각기의 양성 대조군 세포 시료에 대해 정규화한다.
- [1585] 일 구현예에서, 푸소좀 조제물은 양성 대조군 세포와 비교하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 이내의 에스테라제 활성을 가질 것이다.
- [1586] 또한, 문헌[Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*. 2005 Jul;66(1):78-84; and Jacob BC, Favre M, Bensa JC. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1991;12:550-558]을 참조한다.
- [1587] 실시예 67: 푸소좀에서 아세틸콜린에스테라제 활성화의 측정
- [1588] 아세틸콜린에스테라제 활성을 이전에 기재된 절차에 따라 그리고 키트(MAK119, SIGMA)를 제조업체의 권고에 따라 사용하여 측정한다(문헌[Ellman, et al., *Biochem. Pharmacol.* 7, 88, 1961]).
- [1589] 간략하게는, 푸소좀을 PBS, pH 7 중 0.1 mM 5,5-디티오-비스(2-니트로벤조산)과 혼합된, PBS, pH 8 중 1.25 mM 아세틸티오콜린에 현탁시킨다. 인큐베이션을 실온에서 수행하지만, 푸소좀 및 기질 용액을 37℃에서 10분 동안 미리-가온시킨 후, 광학 밀도 판독을 시작한다.
- [1590] 흡광도에서의 변화를 플레이트 판독기 분광광도계(ELX808, BIO-TEK 장비, Winooski, VT, USA)를 450 nm에서 10분 동안 모니터링한다. 별개로, 정규화를 위해 비신초닌산 검정법을 통한 푸소좀의 단백질 함량을 결정하기 위해 시료를 사용한다. 이 검정법을 사용하여, 푸소좀은 <100 AChE 활성 단위/ μ g 단백질을 갖는 것으로 결정된다.
- [1591] 일 구현예에서, AChE 활성 단위/ μ g 단백질 값은 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 또는 1000 미만일 것이다.
- [1592] 실시예 68: 대사 활성 수준의 측정
- [1593] 이 실시예는 푸소좀에서 시트레이트 신타제 활성의 측정의 정량화를 기재한다.
- [1594] 시트레이트 신타제는 트리카르복실산(TCA) 사이클 내에서, 옥살로아세테이트(OAA)와 아세틸-CoA 사이의 반응을 촉매하여 시트레이트를 발생시키는 효소이다. 아세틸-CoA의 가수분해 시, 티올기를 갖는 CoA(CoA-SH)의 방출이 존재한다. 티올기는 화학적 시약, 5,5-디티오비스-(2-니트로벤조산)(DTNB)과 반응하여, 5-티오-2-니트로벤조산(TNB)을 형성하며, 이는 412 nm에서 분광광도적으로 측정될 수 있는 황색 생성물이다(그린 2008). 상업적으로 입수 가능한 키트, 예컨대 Abcam 인간 시트레이트 신타제 활성 검정법 키트(Product #ab119692)는 이러한 측정을 수행하는 데 필요한 모든 시약을 제공한다.
- [1595] 검정법을 제조업체의 권고에 따라 수행한다. 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와

같은 푸소좀을 수합하고, 이들 푸소좀을 얼음 상에서 추출 완충제(Abcam) 내에서 20분 동안 용해시킴으로써 푸소좀 시료 용해물을 제조한다. 원심분리 후, 상층액을 수합하고, 단백질 함량을 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher Scientific)에 의해 평가하고, 조제물은 하기 정량화 프로토콜이 개시될 때까지 얼음 상에 잔존한다.

[1596] 간략하게는, 푸소좀 용해물 시료를 제공된 마이크로플레이트 웰에서 1X 인큐베이션 완충제(Abcam)에 희석시키고, 이때, 1 세트의 웰은 1X 인큐베이션 완충제만 받는다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 300 rpm에서 шей킹하면서 4시간 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 완충제를 웰로부터 흡인하고, 1X 세척 완충제를 첨가한다. 이러한 세척 단계를 1회 더 반복한다. 그 후에, 1X 활성 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 상기 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서, 판독 사이에 шей킹하면서 흡광도를 412 nm에서 30분 동안 20초마다 측정함으로써 분석한다.

[1597] 백그라운드 값(1X 인큐베이션 완충제만 있는 웰)을 모든 웰로부터 차감시키고, 시트레이트 신타제 활성을, 로딩된 푸소좀 용해물 시료 1 μg 당 1분 당 흡광도의 변화로서 표현한다($\Delta\text{mOD@412nm/min/ug}$ 단백질). 동역학(kinetic) 측정의 100~400초로부터의 선형 부분만 사용하여, 활성을 계산한다.

[1598] 일 구현예에서, 푸소좀 조제물은 대조군 세포와 비교하여, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 내에서 신타제 활성을 가질 것이다.

[1599] 예를 들어, 문헌[Green HJ et al. Metabolic, enzymatic, and transporter response in human muscle during three consecutive days of exercise and recovery. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295: R1238-R1250, 2008]을 참조한다.

[1600] 실시예 69: 호흡 수준의 측정

[1601] 이 실시예는 푸소좀에서 호흡 수준의 측정의 정량화를 기재한다. 세포에서 호흡 수준은 대사를 작동시키는(power) 산소 소모율의 측정일 수 있다. 푸소좀 호흡율은 Seahorse 세포의 유속 분석기(Agilent)에 의해 산소 소모율에 대해 측정된다(Zhang 2012).

[1602] 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 푸소좀 또는 세포를 96-웰 Seahorse 마이크로플레이트(Agilent)에 접종한다. 마이크로플레이트를 간략하게 원심분리하여, 푸소좀 및 세포를 웰의 하부에서 펠렛화한다. 성장 배지를 제거하고, 25 mM 글루코스 및 2 mM 글루타민(Agilent)을 함유하는 저-완충 DMEM 최소 배지로 대체하고, 상기 마이크로플레이트를 37°C에서 60분 동안 인큐베이션하여, 온도 및 pH 평형을 허용함으로써, 산소 소모율 검정법을 개시한다.

[1603] 그 후에, 접착성 푸소좀 및 세포 바로 주변에서 배지 내 세포의 산소 및 pH의 변화를 측정하는 세포의 유속 분석기(Agilent)에서 상기 마이크로플레이트를 검정한다. 정상(steady) 상태 산소 소모율(기저 호흡율) 및 세포의 산산화 속도를 수득한 후, ATP 신타제를 저해하는 올리고마이신(5 μM) 및 미토콘드리아를 언커플링시키는 양성자 이오노포어 FCCP(카르보닐 시아나이드 4-(트리플루오로메톡시) 페닐하이드라존; 2 μM)를 마이크로플레이트의 각각의 웰에 첨가하여, 최대 산소 소모율 값을 수득한다.

[1604] 최종적으로, 5 μM 안티마이신 A(미토콘드리아 복합체 III의 저해제)를 첨가하여, 호흡 변화가 주로 미토콘드리아 호흡으로 인한 것임을 확인한다. 안티마이신 A 첨가 후 최소 산소 소모율을 모든 산소 소모율 측정으로부터 차감시켜, 비-미토콘드리아 호흡 구성성분을 제거한다. 올리고마이신(기저로부터 산소 소모율의 적어도 25% 이하) 또는 FCCP(올리고마이신 후 산소 소모율의 적어도 50% 증가)에 적절하게 반응하지 않는 세포 시료를 분석으로부터 배제한다. 그 후에, 푸소좀 호흡 수준을 pmol O₂/min/1e4 푸소좀으로서 측정한다.

[1605] 그 후에, 이 호흡 수준을 제각기의 세포 호흡 수준으로 정규화한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 제각기의 세포 시료와 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상의 호흡 수준을 가질 것이다.

[1606] 예를 들어, 문헌[Zhang J, Nuebel E, Wisidagama DRR, et al. Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. Nature protocols. 2012;7(6):10.1038/nprot.2012.048. doi:10.1038/nprot.2012.048]을 참조한다.

[1607] 실시예 70: 푸소좀의 포스파티딜세린 수준의 측정

[1608] 이 실시예는 푸소좀의 표면으로의 아넥신-V 결합 수준의 정량화를 기재한다.

[1609] 사멸중인 세포는 세포 표면 상에 포스파티딜세린을 제시할 수 있으며, 이는 프로그래밍된 세포 사멸 경로에서 세포자멸사의 마커이다. 아넥신-V는 포스파티딜세린에 결합하며, 따라서, 아넥신-V 결합은 세포에서 생존력에 대한 대용물이다.

[1610] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 생성하였다. 세포자멸사 신호의 검출을 위해, 푸소좀 또는 양성 대조군 세포를 5% 아넥신 V 플루어 594(A13203, Thermo Fisher, Waltham, MA)를 이용하여 염색하였다. 각각의 그룹(하기 표에 상술됨)은 세포자멸사-유도자, 메나디온으로 처리된 실험 아암(arm)을 포함하였다. 메나디온을 100 μ M 메나디온에서 4시간 동안 첨가하였다. 모든 시료를 유세포분석기(Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에서 진행시키고, 형광 강도를 561 nm의 파장에서 VL1 레이저 및 585/16 nm의 방출 필터를 이용하여 측정하였다. 모든 그룹에서 아넥신 V의 형광 강도를 비교함으로써, 세포의 포스파티딜 세린의 존재를 정량화하였다.

[1611] 음성 대조군 비-염색된 푸소좀은 아넥신 V 염색에 대해 양성이지 않았다.

[1612] 일 구현예에서, 푸소좀은 메나디온에 반응하여 세포 표면 상에서 포스파티딜세린 제시를 상향조절할 수 있었으며, 이는, 비-메나디온 자극 푸소좀이 세포자멸사를 겪지 않고 있음을 나타내었다. 일 구현예에서, 메나디온으로 자극된 양성 대조군 세포는 메나디온으로 자극되지 않은 푸소좀보다 더 높은 수준의 아넥신 V 염색을 실증하였다.

표 10: 아넥신 V 염색 매개변수

실험 아암	아넥신 V 신호의 평균 형광 강도(및 표준 편차)
비-염색된 푸소좀 (음성 대조군)	941 (937)
염색된 푸소좀	11257 (15826)
염색된 푸소좀 + 메나디온	18733 (17146)
염색된 대식세포 + 메나디온 (양성 대조군)	14301 (18142)

[1613]

실시예 71: 근접분비-신호전달 수준의 측정

[1614]

이 실시예는 푸소좀에서 근접분비-신호전달의 정량화를 기재한다.

[1615]

[1616] 세포는 근접분비 신호전달을 통해 세포-접촉 의존적 신호전달을 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀에서 근접분비 신호전달의 존재는, 푸소좀이 이들의 바로 주변에서 세포를 자극시키고, 세포를 억제시키고, 일반적으로 세포와 소통할 수 있음을 실증할 것이다.

[1617]

부분적인 또는 완전한 핵 불활성화를 갖는 포유류 골수 기질 세포(BMSC)로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 푸소좀은 대식세포에서 근접분비 신호전달을 통해 IL-6 분비를 촉발한다. 일차 대식세포 및 BMSC를 공동-배양한다. 골수-유래 대식세포를 우선 6-웰 플레이트 내에 접종하고, 24시간 동안 인큐베이션하고, 그 후에, 일차 마우스 BMSC-유래 푸소좀 또는 BMSC 세포(양성 대조군 부모 세포)를 10% FBS를 갖는 DMEM 배지에서 대식세포 상에 놓는다. 상층액을 상이한 시점(2, 4, 6, 24시간)에서 수합하고, ELISA 검정법에 의해 IL-6 분비에 대해 분석한다(문헌[Chang J. et al., 2015]).

[1618]

일 구현예에서, BMSC 푸소좀에 의해 유도된 근접분비 신호전달의 수준을 배지 내에서 대식세포-분비된 IL-6 수준의 증가에 의해 측정한다. 일 구현예에서, 근접분비 신호전달의 수준은 양성 대조군 골수 기질 세포(BMSC)에 의해 유도된 수준보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상일 것이다.

[1619]

실시예 72: 측분비-신호전달 수준의 측정

[1620]

이 실시예는 푸소좀에서 측분비 신호전달의 정량화를 기재한다.

[1621]

세포는 측분비 신호전달을 통해 국소 미세환경에서 다른 세포와 소통할 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀은 측분비 신호전달을 할 수 있을 것이며, 예를 들어 이들의 국소 환경에서 세포와 소통할 수 있을 것이다. 일 구현예에서, 하기 프로토콜에 따라 측분비-유래 분비를 통해 내피 세포에서 Ca^{2+} 신호전달을 촉발하는 푸소좀의 능력은 칼슘 지시약, 플루오-4 AM을 통해 Ca^{2+} 신호전달을 측정할 것이다.

[1622]

실험 플레이트를 제조하기 위해, 무린 폐 미세혈관 내피 세포(MPMVEC)를 0.2% 젤라틴 코팅된 25 mm 유리 바닥 96 웰 플레이트 상에 평판배양한다(80% 합류도). MPMVEC를 2% BSA 및 0.003% 플루론산을 5 μ M 플루오-4 AM(Invitrogen) 최종 농도와 함께 함유하는 ECM에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하여, 플루오-4 AM의 로딩을

허용한다. 로딩 후, MPMVEC를, 설핀피라존을 함유하는 실험 이미징 용액(0.25% BSA를 함유하는 ECM)으로 세척하여, 염료 손실을 최소화한다. 플루오-4의 로딩 후, 500 μ l의 미리-가온된 실험 이미징 용액을 플레이트에 첨가하고, 상기 플레이트를 Zeiss 공초점 이미징 시스템에 의해 이미지화한다.

- [1623] 별개의 튜브에서, 신선하게 단리된 무린 대식세포를 배양 배지(DMEM+10% FBS) 중 1 μ g/ml LPS로 처리하거나, LPS로 처리하지 않는다(음성 대조군). 자극 후, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 대식세포로부터 발생시킨다.
- [1624] 그 후에, 푸소좀 또는 부모 대식세포(양성 대조군)를, 2% BSA 및 0.003% 플루론산을 함유하는 ECM에서 세포 트랙커 레드, CMTPX(Invitrogen)를 이용하여 표지한다. 그 후에, 푸소좀 또는 부모 대식세포를 세척하고, 실험 이미징 용액에 재현탁시킨다. 표지된 푸소좀 및 대식세포를 공초점 플레이트에서 플루오-4 AM 로딩된 MPMVEC 상에 첨가한다.
- [1625] 그린 및 레드 형광 신호를, 플루오-4 AM 및 세포 트랙커 레드 형광에 대해 각각 488 및 561 nm에서의 여기를 이용하는 아르곤 이온 레이저 공급원을 갖는 Zeiss 공초점 이미징 시스템을 사용하여 10~20분 동안 3초마다 기록한다. 플루오-4 형광 강도 변화를 이미징 소프트웨어(문헌[Mallilankaraman, K. et al., *J Vis Exp.* (58): 3511, 2011])를 사용하여 분석한다. 음성 대조군 푸소좀 및 세포 그룹에서 측정된 플루오-4 강도의 수준을 LPS-자극 푸소좀 및 세포 그룹으로부터 차감시킨다.
- [1626] 일 구현예에서, 푸소좀, 예를 들어 활성화된 푸소좀은 양성 대조군 세포 그룹보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상인, 플루오-4 형광 강도의 증가를 유도할 것이다.
- [1627] 실시예 73: 이동성을 위해 액틴을 중합하는 능력의 측정
- [1628] 이 실시예는 푸소좀에서 세포골격 구성성분, 예컨대 액틴의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 세포골격 구성성분, 예컨대 액틴을 포함하고, 액틴 중합을 할 수 있다.
- [1629] 세포는 이동성 및 다른 세포질 과정을 위해 세포골격 구성성분인 액틴을 포함한다. 세포골격은 이동성 구동력을 생성하고, 움직임 과정의 조화를 이루게 하는 데 필수적이다.
- [1630] C2C12 세포를 본원에 기재된 바와 같이 제핵시켰다. 12.5% 및 15% 피콜 층으로부터 수득된 푸소좀을 폴링하고, '라이트(Light)'로 표지하는 한편, 16% 내지 17% 층으로부터의 푸소좀을 폴링하고 '미디엄(Medium)'으로 표지하였다. 푸소좀 또는 세포(부모 C2C12 세포, 양성 대조군)를, DMEM + 글루타맥스 + 10% 태아 소 혈청(FBS)에 재현탁시키고, 24-웰 초저 부착 플레이트(#3473, Corning Inc, Corning, NY)에 평판배양하고, 37°C + 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 시료를 주기적으로(5.25시간, 8.75시간, 26.5시간) 취하고, 165 μ M 로다민 팔로이딘(음성 대조군은 염색하지 않았음)으로 염색하고, FC 레이저 YL1(585/16 필터를 이용하여 561 nm)가 있는 유세포분석기(#A24858, Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에서 측정하여, F-액틴 세포골격 함량을 측정하였다. 푸소좀 내 로다민 팔로이딘의 형광 강도를 비-염색된 푸소좀 및 염색된 부모 C2C12 세포와 함께 측정하였다.
- [1631] 푸소좀 형광 강도는 모든 시점에서 음성 대조군보다 더 컸으며(도 4), 푸소좀은 부모 C2C12 세포와 유사한 속도로 액틴을 중합할 수 있었다.
- [1632] 부가적인 세포골격 구성성분, 예컨대 하기 표에 열거된 것들을 상업적으로 입수 가능한 ELISA 시스템(Cell Signaling Technology 및 MyBioSource)을 통해 제조업체의 설명에 따라 측정한다.

표 11: 세포골격 구성성분

측정된 세포골격 단백질	상업적인 키트 유형	키트 ID
액틴	경로 스캔 총 B-액틴 샌드위치 ELISA 키트	Cell Signaling, 7880
Arp2/3	인간 액틴 관련 단백질 2/3 복합체 하위단위(APRC2) ELISA 키트	MyBioSource, MBS7224740
포르민	포르민 결합 단백질 1 (FNBP1), ELISA 키트	MyBioSource, MBS9308864
코로닌	인간 코로닌 1A ELISA 키트	MyBioSource, MBS073640
디스트로핀	인간 디스트로핀 ELISA 키트	MyBioSource MBS722223
케라틴	인간 케라틴 5 ELISA 키트	MyBioSource, MBS081200
미오신	인간 미오신 IG (MYO1G) ELISA 키트	MyBioSource, MBS9312965
튜불린	인간 튜불린 베타 3 ELISA 키트	MyBioSource, MBS097321

[1633]

[1634]

그 후에, 100 μ L의 적절하게-희석된 용해물을, 마이크로웰 스트립(microwell strip)으로부터의 적절한 웰에 첨가한다. 상기 마이크로웰을 테이프로 밀봉하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 밀봉 테이프를 제거하고, 내용물을 폐기한다. 각각의 마이크로웰을 200 μ L의 1X 세척 완충제를 이용하여 4회 세척한다. 각각의 개별적인 세척 후, 플레이트를 흡착제 천 상으로 적층시켜, 잔여 세척 용액을 각각의 웰로부터 제거한다. 그러나, 웰은 실험 동안 임의의 시점에서 완전히 건조되지 않는다.

[1635]

다음, 100 μ L의 재구성된 검출 항체(그린)를, 음성 대조군 웰을 제외한 각각의 개별적인 웰에 첨가한다. 그 후에, 웰을 밀봉하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션을 완료한 후, 세척 절차를 반복한다. 100 μ L의 재구성된 HRP-연결된 2차 항체(레드)를 각각의 웰에 첨가한다. 상기 웰을 테이프로 밀봉하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 밀봉 테이프를 제거하고, 세척 절차를 반복한다. 그 후에, 100 μ L의 TMB 기질을 각각의 웰에 첨가한다. 그 후에, 웰을 테이프로 밀봉하고, 37°C에서 10분 동안 인큐베이션한다. 일단 이러한 최종 인큐베이션이 완료되고 나면, 100 μ L의 정지 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 수 초 동안 부드럽게 셰이킹한다.

[1636]

정지 용액을 첨가한 지 30분 이내에 검정법의 분광광도적 분석을 수행한다. 웰의 밑면(underside)을 린트(lint)-무함유 조직으로 닦고(wipe), 그 후에 흡광도를 450 nm에서 관독한다. 일 구현예에서, 검출 항체를 이용하여 염색시킨 푸소좀 시료는 450 nm에서 음성 대조군 푸소좀 시료보다 더 많은 광을 흡수하고, 검출 항체를 이용하여 염색된 세포 시료보다 더 적은 양의 광을 흡수할 것이다.

[1637]

실시예 74: 평균 막 전위의 측정

[1638]

이 실시예는 푸소좀의 미토콘드리아 막 전위의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 미토콘드리아 막을 포함하는 푸소좀은 미토콘드리아 막 전위를 유지할 것이다.

[1639]

미토콘드리아 대사 활성을 미토콘드리아 막 전위에 의해 측정할 수 있다. 푸소좀 조제물의 막 전위를, 미토콘드리아 막 전위를 평가하기 위한 상업적으로 입수 가능한 염료, TMRE(TMRE: 테트라메틸 로다민, 에틸 에스테르, 퍼클로레이트, Abcam, Cat# T669)를 사용하여 정량화한다.

[1640]

푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀 또는 부모 세포를 성장 배지(10% 태아 소 혈청을 갖는 페놀-레드 무함유 DMEM)에서 6개 분취물(비처리된 및 FCCP-처리된 3벌 중복)에서 희석시킨다. 시료의 1개 분취물을, 미토콘드리아 막 전위를 해소(eliminate)시키고 TMRE 염색을 방지하는 언커플링제(uncoupler)인 FCCP와 함께 인큐베이션한다. FCCP-처리된 시료에 대해, 2 μ M FCCP를 시료에 첨가하고, 5분 동안 인큐베이션한 후 분석한다. 그 후에, 푸소좀 및 부모 세포를 30 nM TMRE로 염색시킨다. 각각의 시료에 대해, 비-염색된(TMRE 없음) 시료를 또한, 병행하여 제조한다. 시료를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 시료를 488 nm 아르곤 레이저를 갖는 유세포분석기 상에서 분석하고, 여기 및 방출을 c530+/-30 nm에서 수

합한다.

- [1641] 막 전위 값(밀리볼트, mV)을 TMRE의 강도에 기초하여 계산한다. 모든 사건을 포워드 및 사이드 스캐터에서 포착한다(대안적으로, 소량의 데브리(debris)를 배제하기 위해 게이트를 적용할 수 있음). 비처리된 시료와 FCCP-처리된 시료의 기하 평균으로부터 비-염색된 시료의 형광 강도의 기하 평균을 차감시킴으로써, 비처리된 시료와 FCCP-처리된 시료 둘 모두에 대한 형광 강도(FI) 값을 정규화한다. TMRE 형광(TMRE는 네른스트 방식으로 미토콘드리아에 누적되기 때문에)에 기초하여 푸소좀 또는 세포의 미토콘드리아 막 전위를 결정하는 데 사용될 수 있는 변형된 네른스트 방정식(Nernst equation)(하기 참조)과 함께 정규화된 형광 강도 값을 사용하여 각각의 조제물에 대한 막 전위 상태를 계산한다.
- [1642] 푸소좀 또는 세포막 전위를 하기 식에 따라 계산한다: $(mV) = -61.5 * \log(FI_{\text{비처리된-정규화된}}/FI_{\text{FCCP-처리된-정규화된}})$. 일 구현예에서, C2C12 마우스 근아세포 세포로부터의 푸소좀 조제물 상에서 이 검정법을 사용하여, 푸소좀 조제물의 막 전위 상태는 부모 세포보다 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 이내에 있을 것이다. 일 구현예에서, 막 전위의 범위는 약 -20 내지 -150 mV이다.
- [1643] 실시예 75: 대상체에서 지속성 반감기의 측정
- [1644] 이 실시예는 푸소좀 반감기의 측정을 기재한다.
- [1645] 푸소좀은 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 Gaussia 루시페라제를 발현하는 세포로부터 유래되고, 완충된 용액 중 순수한, 1:2, 1:5 및 1:10 희석물이 제조된다. 푸소좀이 결여된 완충된 용액을 음성 대조군으로서 사용한다.
- [1646] 각각의 용량을 3마리의 8 주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratories)에게 정맥내로 투여한다. 혈액을 푸소좀의 정맥내 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 및 72시간째에 안와 정맥으로부터 수합한다. 실험의 종료 시 동물을 CO₂ 흡입에 의해 안락사시킨다.
- [1647] 혈액을 실온에서 20분 동안 원심분리한다. 혈청 시료를 생물분석때까지 -80℃에서 즉시 냉동시킨다. 그 후에, 각각의 혈액 시료를 사용하여, 상기 시료를 Gaussia 루시페라제 기질(Nanolight, Pinetop, AZ)과 혼합한 후, Gaussia 루시페라제 활성 검정법을 수행한다. 간략하게는, 콜렌테라진, 루시페린 또는 발광 분자를 플래쉬 검정법 완충제과 혼합하고, 혼합물을 96웰 플레이트에서 혈액 시료를 함유하는 웰 내로 피펫팅한다. 혈액이 결여된 음성 대조군 웰은 백그라운드 Gaussia 루시페라제 신호를 결정하기 위해 검정법 완충제를 함유한다.
- [1648] 또한, 발광 신호를 1시간 당 Gaussia 루시페라제 분자의 분비로 전환시키기 위해, 양성-대조군 정제된 Gaussia 루시페라제(Athena Enzyme Systems, 카탈로그 #0308)의 표준 곡선을 제조한다. 상기 플레이트를, 500 msec 통합을 사용하여 발광에 대해 검정한다. 백그라운드 Gaussia 루시페라제 신호를 모든 시료로부터 차감하고, 그 후에, 선형 최상-적합 곡선을 Gaussia 루시페라제 표준 곡선에 대해 계산한다. 시료 판독이 표준 곡선 내에서 적합화하지 않으면, 이들은 적절하게 희석되고 재-검정된다. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 및 72시간째에 취해진 시료로부터의 루시페라제 신호를 표준 곡선에 외삽한다. 제거 속도 상수(elimination rate constant) $k_e(h^{-1})$ 를 1-구획 모델의 하기 방정식을 사용하여 계산한다: $C(t) = C_0 \times e^{-k_{ext}t}$, 여기서, $C(t)(ng/mL)$ 는 시간 t (h)에서의 푸소좀의 농도이고, C_0 는 시간 = 0에서의 푸소좀의 농도(ng/mL)이다. 제거 반감기 $t_{1/2,e}(h)$ 를 $\ln(2)/k_e$ 로서 계산한다.
- [1649] 일 구현예에서, 푸소좀은 음성 대조군 세포보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상의 반감기를 가질 것이다.
- [1650] 실시예 76: 순환에서 푸소좀의 보유의 측정
- [1651] 이 실시예는 순환 내로의 푸소좀 전달 및 기관에서의 보유의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀을 순환 내로 전달하고, 기관 부위에서 포착되지 않고 보유되지 않는다.
- [1652] 일 구현예에서, 말초 순환 내로 전달된 푸소좀은 표적 부위에 높은 효율로 도달하기 위해, 망상-내피 시스템(RES)에 의한 포착 및 보유를 피한다. RES는 고형 기관, 예컨대 비장, 림프절 및 간에 체류하는 세포, 주로 대식세포의 시스템을 포함한다. 이들 세포는 통상 "오래된(old)" 세포, 예컨대 적혈구 세포를 제거하는 임무를 가진다.
- [1653] 푸소좀은 CRE 리컴비나제를 발현하는 세포(작용제), 또는 CRE를 발현하지 않는 세포(음성 대조군)로부터 유래된

다. 이들 푸소좀은 실시예 62에서와 같이 생체내 주사를 위해 제조된다.

- [1654] 수여자 마우스는 loxp-루시퍼라제 게놈 DNA 유전자좌를 가지며, 이러한 유전자좌는 푸소좀에 의해 전달된 mRNA로부터 만들어진 CRE 단백질에 의해 변형되어, 루시퍼라제(JAX#005125)의 발현을 차단하지 못한다. 루시퍼라제는 살아 있는 동물에서 생물발광 이미징에 의해 검출될 수 있다. 이 실시예에 대한 양성 대조군은, 그 자체의 게놈으로부터 대식세포 및 단핵구 세포에서 동일한 단백질을 독점적으로 발현하는 마우스 계통(strain)과 짝지어진 수여자 마우스의 자손이다(Cx3cr1-CRE JAX#025524). 이러한 짝지움으로부터의 자손은 각각의 대립유전자 중 하나를 갖는다(loxp-루시퍼라제, Cx3cr1-CRE).
- [1655] 푸소좀을, CRE 단백질에 의해 작용된 경우 루시퍼라제의 발현을 초래하는 유전적 유전자좌를 갖는 마우스 내로 꼬리 정맥 주사(IV, 실시예 #48)를 통해 말초 순환 내에 주사한다. RES의 비-특이적 포착 기전은, 푸소좀으로부터 대식세포 내로 CRE 단백질의 일부를 방출시키는 성질을 가져서 게놈 재조합을 초래하는 식세포이다. IVIS 측정(실시예 62에 기재된 바와 같음)은, 비-푸소젠이 누적 및 용해를 조절하는 장소를 식별한다. 비장, 림프절 및 간에서의 누적은 푸소좀의 비-특이적인 RES-매개 포착을 시사할 것이다. IVIS를 푸소좀 주사-후 24, 48 및 96시간째에 수행한다.
- [1656] 마우스를 안락사시키고, 장(gut)에서 비장, 간 및 주요 림프 사슬(major lymphatic chain)을 수합한다.
- [1657] 게놈 DNA를 이들 기관으로부터 분리하고, 재조합된 게놈 DNA 잔여물에 대한 정량적 폴리머라제 연쇄 반응을 받게 한다. 대안적인 게놈 유전자좌(CRE에 의해 표적화되지 않음)를 또한 정량화하여, 시료 내 세포의 수의 측정치를 제공한다.
- [1658] 구현예에서, 낮은 생물발광 신호는 동물, 구체적으로 간 및 비장 부위 전체에 걸쳐 작용제와 음성 대조군 둘 모두에 대해 관찰될 것이다. 구현예에서, 양성 대조군은 간(음성 대조군 및 작용제)에서 증가된 신호를 보여줄 것이고, 비장에서 높은 신호 및 림프절과 일관된 분포를 보여줄 것이다.
- [1659] 일 구현예에서, 이들 조직의 게놈 PCR 정량화는, 검사된 모든 조직에서 양성 대조군 내의 대안적인 유전자를 능가하는 재조합 신호의 높은 비율을 시사할 것인 한편, 작용제 및 음성 대조군에 대해, 재조합의 수준은 모든 조직에서 무시할 만할 것이다.
- [1660] 일 구현예에서, 이 실시예의 결과는, 비-푸소젠 대조군이 RES에 의해 보유되지 않고 광범위한 분포를 달성하고 높은 생체이용률을 나타낼 수 있을 것임을 시사할 것이다.
- [1661] 실시예 77: 면역억제를 갖는 푸소좀 수명
- [1662] 이 실시예는 면역억제성 약물과 함께 공동-투여되는 경우, 푸소좀 조성물의 면역원성의 정량화를 기재한다.
- [1663] 면역 반응을 자극하는 치료제는 이따금, 수여자에 대해 치료 효능을 감소시키거나 독성을 유발할 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀은 실질적으로 비-면역원성일 것이다.
- [1664] 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같은 푸소좀의 정제된 조성물을 면역억제성 약물과 함께 공동-투여하고, 면역원성 특성을 생체내에서 푸소좀의 수명에 의해 검증한다. 루시퍼라제로 표지된 충분한 수의 푸소좀을 타크롤리무스(tacrolimus)(TAC, 4 mg/kg/일; Sigma Aldrich)와 함께, 또는 비히클(음성 대조군), 또는 임의의 부가적인 작용제 없이(양성 대조군) 정상적인 마우스의 비복근 근육 내로 국소 주사한다. 그 후에, 마우스는 주사-후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 및 72시간째에 생체내 이미징을 받는다.
- [1665] 간략하게는, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, D-루시페린을 체중 1 킬로그램 당 375 mg의 용량으로 복강내 투여한다. 이미징 시, 동물을 빛이 통하지 않는 챔버에 놓고, 동물 내로 이식된 루시퍼라제-발현 푸소좀으로부터 방출된 광자를 수합하며, 이때, 통합 시간은 생물발광 방출 강도에 따라 5초 내지 5분이다. 동일한 마우스를 상기 제시된 다양한 시점에서 반복적으로 스캐닝한다. BLI 신호를 1초 당 광자의 단위(총 유속)로 정량화하고, log [광자/초]로서 제시한다. 강도와 TAC가 있는 푸소좀 주사 및 TAC가 없는 푸소좀 주사를 비교함으로써, 데이터를 분석한다.
- [1666] 구현예에서, 검정법은 최종 시점에서 푸소좀 단독 군 및 비히클 군에 비해 TAC 공동-투여 군에서 푸소좀 수명의 증가를 보여줄 것이다. 푸소좀 수명의 증가 외에도, 일부 구현예에서, 각각의 시점에서 푸소좀 + TAC 아암 대 푸소좀 + 비히클 또는 푸소좀 단독으로부터의 BLI 신호의 증가가 관찰될 것이다.
- [1667] 실시예 78: 푸소좀에 대한 기존의 IgG 및 IgM 항체 반응성의 측정

- [1668] 이 실시예는 유세포분석을 사용하여 측정된 기존의 항-푸소좀 항체 역가의 정량화를 기재한다.
- [1669] 푸소좀에 대한 면역원성의 측정은 항체 반응이다. 푸소좀을 인지하는 항체는 푸소좀 활성화 또는 수명을 제한할 수 있는 방식으로 결합할 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀의 일부 수여자는 푸소좀에 결합하고 인지하는 기존의 항체를 가질 것이다.
- [1670] 이 실시예에서, 항-푸소좀 항체 역가를, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 이중성 공급원 세포를 사용하여 생성된 푸소좀을 사용하여 시험한다. 이 실시예에서, 푸소좀 미접촉 마우스를 항-푸소좀 항체의 존재에 대해 평가한다. 주목할만하게는, 본원에 기재된 방법을 프로토콜에 대한 최적화와 함께 인간, 래트, 원숭이에 동등하게 적용할 수 있다.
- [1671] 음성 대조군은 IgM 및 IgG가 결실된 마우스 혈청이고, 양성 대조군은 이중성 공급원 세포로부터 발생된 푸소좀의 다수의 주사를 받은 마우스로부터 유래된 혈청이다.
- [1672] 푸소좀에 결합하는 기존의 항체의 존재를 평가하기 위해, 푸소좀-미접촉 마우스로부터의 혈청을 우선, 56℃까지 30분 동안 가열함으로써 탈보체화(decomplement)시키고, 후속적으로 3% FCS 및 0.1% NaN₃를 함유하는 PBS에서 33%만큼 희석시킨다. 동일한 양의 혈청 및 푸소좀(1 mL 당 1×10^2 - 1×10^8 푸소좀) 현탁액을 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 소-혈청 쿠션을 통해 PBS로 세척한다.
- [1673] 세포를 마우스 IgM(BD Bioscience)의 Fc 부분에 특이적인 PE-공액 염소 항체와 함께 4℃에서 45분 동안 인큐베이션함으로써, IgM 이중반응성(xenoreactive) 항체를 염색한다. 주목할 만하게는, 항-마우스 IgG1 또는 IgG2 2차 항체를 또한, 사용할 수 있다. 모든 그룹으로부터의 세포를 2% FCS를 함유하는 PBS로 2회 세척하고, 그 후에 FACS 시스템(BD Biosciences) 상에서 분석한다. 형광 데이터를 로그 증폭의 사용에 의해 수합하고, 평균 형광강도로서 표현한다.
- [1674] 일 구현예에서, 음성 대조군 혈청은 무혈청 또는 2차 단독 대조군과 비슷하게 무시할 만한 형광을 보여줄 것이다. 일 구현예에서, 양성 대조군은 음성 대조군보다 더 많은 형광을 보여줄 것이고, 무혈청 또는 2차 단독 대조군보다 더 많은 형광을 보여줄 것이다. 일 구현예에서, 면역원성이 발생하는 경우, 푸소좀-미접촉 마우스로부터의 혈청은 음성 대조군보다 더 많은 형광을 보여줄 것이다. 일 구현예에서, 면역원성이 발생하지 않는 경우, 푸소좀-미접촉 마우스로부터의 혈청은 음성 대조군과 비교하여 유사한 형광을 보여줄 것이다.
- [1675] *실시예 79: 푸소좀의 다수의 투여 후, IgG 및 IgM 항체 반응의 측정*
- [1676] 이 실시예는 변형된 푸소좀의 다수의 투여 후, 변형된 푸소좀의 체액성 반응의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 변형된 푸소좀, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 변형된 푸소좀은 변형된 푸소좀의 다수의(예를 들어 1 초과, 예를 들어 2 이상) 투여 후, 감소된(예를 들어 비변형된 푸소좀의 투여와 비교하여 감소된) 체액성 반응을 가질 것이다.
- [1677] 푸소좀에 대한 면역원성의 측정은 항체 반응이다. 일 구현예에서, 푸소좀의 반복된 주사는 항-푸소좀 항체, 예를 들어 푸소좀을 인지하는 항체의 발달을 초래할 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀을 인지하는 항체는 푸소좀 활성화 또는 수명을 제한할 수 있는 방식으로 결합할 수 있다.
- [1678] 이 실시예에서, 항-푸소좀 항체 역가를 푸소좀의 하나 이상의 투여 후, 검사한다. 푸소좀을 이전의 실시예 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 푸소좀을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC), HLA-G 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-HLA-G), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-빈 벡터)로부터 발생시킨다. 혈청을 상이한 코호트로부터 유도한다: 비히클(푸소좀 미접촉 군), MSC 푸소좀, MSC-HLA-G 푸소좀, 또는 MSC-빈 벡터 푸소좀의 1, 2, 3, 5, 10 주사를 전신적으로 및/또는 국소적으로 주사한 마우스.
- [1679] 항-푸소좀 항체의 존재 및 풍부도(abundance)를 평가하기 위해, 마우스로부터의 혈청을 우선, 56℃까지 30분 동안 가열함으로써 탈보체화시키고, 후속적으로 3% FCS 및 0.1% NaN₃를 함유하는 PBS에서 33%만큼 희석시킨다. 동일한 양의 혈청 및 푸소좀(1×10^2 - 1×10^8 푸소좀 per mL)을 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 소-혈청 쿠션을 통해 PBS로 세척한다.
- [1680] 세포를 마우스 IgM(BD Bioscience)의 Fc 부분에 특이적인 PE-공액 염소 항체와 함께 4℃에서 45분 동안 인큐베이션함으로써, 푸소좀 반응성 IgM 항체를 염색한다. 주목할 만하게는, 항-마우스 IgG1 또는 IgG2 2차 항체를 또한, 사용할 수 있다. 모든 그룹으로부터의 세포를 2% FCS를 함유하는 PBS로 2회 세척하고, 그 후에 FACS 시스템

(BD Biosciences) 상에서 분석한다. 형광 데이터를 로그 증폭의 사용에 의해 수합하고, 평균 형광 강도로서 표현한다.

- [1681] 일 구현예에서, MSC-HLA-G 푸소솜은 MSC 푸소솜 또는 MSC-빈 벡터 푸소솜과 비교하여, 주사 후 저하된 항-푸소솜 IgM(또는 IgG1/2) 항체 역가(FACS 상에서의 형광 강도에 의해 측정됨)를 가질 것이다.
- [1682] 실시예 80: 면역원성을 감소시키기 위해 관용원성 단백질을 발현하도록 푸소솜 공급원 세포의 변형
- [1683] 이 실시예는 변형된 세포 공급원으로부터 유래된 푸소솜에서 면역원성의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 변형된 세포 공급원으로부터 유래된 푸소솜은 비변형된 세포 공급원으로부터 유래된 푸소솜과 비교하여 감소된 면역원성을 가진다.
- [1684] 면역 반응을 자극하는 치료제는 이따금, 수여자에 대해 치료 효능을 감소시키거나 독성을 유발할 수 있다. 일 구현예에서, 실질적으로 비-면역원성 푸소솜을 대상체에게 투여한다. 일 구현예에서, 세포 공급원의 면역원성을 푸소솜 면역원성에 대한 대용물로서 검정할 수 있다.
- [1685] HLA-G의 렌티바이러스 매개 발현을 사용하여 변형되거나 빈 벡터(음성 대조군)를 발현하는 iPS 세포를 하기와 같이 면역원성 특성에 대해 검정한다. 잠재적인 푸소솜 세포 공급원으로서 충분한 수의 iPS 세포를 C57/B6 마우스의 뒷다리에 피하 주사하고, 기형종이 형성되는 것을 허용하는 적절한 양의 시간을 제공한다.
- [1686] 일단 기형종이 형성되면, 조직을 수합한다. 형광 염색용으로 제조된 조직을 OCT에서 냉동시키고, 면역조직화학 및 H&E 염색용으로 제조된 조직을 10% 완충된 포르말린에서 고정하고, 파라핀에 포매시킨다. 조직 절편을 항체, 폴리클로날 토끼 항-인간 CD3 항체(DAKO), 마우스 항-인간 CD4 mAb(RPA-T4, BD PharMingen), 마우스 항-인간 CD8 mAb(RPA-T8, BD PharMingen)로 일반적인 면역조직화학 프로토콜에 따라 염색시킨다. 이들을 적절한 검출 시약, 즉, 항-마우스 2차 HRP(Thermofisher), 또는 항-토끼 2차 HRP(Thermofisher)를 사용함으로써 검출한다.
- [1687] 검출을 퍼옥시다제-기반 가시화 시스템(Agilent)을 사용하여 달성한다. 광학 현미경을 사용하여 20x 필드에서 검사된 25, 50 또는 100개 조직 절편에 존재하는 평균 수의 침윤형 CD4+ T-세포, CD8+ T-세포, CD3+ NK-세포를 취함으로써 데이터를 분석한다. 일 구현예에서, 변형되지 않은 iPSC 또는 빈 벡터를 발현하는 iPSC는, HLA-G를 발현하는 iPSC와 비교하여, 검사된 필드에 존재하는 침윤형 CD4+ T-세포, CD8+ T-세포, CD3+ NK-세포를 더 높은 수로 가질 것이다.
- [1688] 일 구현예에서, 푸소솜의 면역원성 특성은 공급원 세포의 면역원성 특성과 실질적으로 동등할 것이다. 일 구현예에서, HLA-G로 변형된 iPS 세포로부터 유래된 푸소솜은 이들의 비변형된 대용물에 비해 감소된 면역 세포 침윤을 가질 것이다.
- [1689] 실시예 81: 면역원성을 감소시키기 위해 면역원성 단백질을 억제하기 위한 푸소솜 공급원 세포의 변형
- [1690] 이 실시예는, 면역원성인 분자의 발현을 감소시키도록 변형된 세포 공급원으로부터 유래된 푸소솜 조성물의 발생의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소솜은, 면역원성인 분자의 발현을 감소시키기 위해 변형된 세포 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [1691] 면역 반응을 자극하는 치료제는 수여자에 대해 치료 효능을 감소시키거나 독성을 유발할 수 있다. 따라서, 면역원성은 안전하고 효과적인 치료 푸소솜에 중요한 특성이다. 소정의 면역 활성화제의 발현은 면역 반응을 생성할 수 있다. MHC 클래스 I은 면역 활성화제의 일례를 나타낸다.
- [1692] 이 실시예에서, 푸소솜을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소솜을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC, 양성 대조군), MHC 클래스 I을 표적화하는 shRNA의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-shMHC 클래스 I), 및 비-표적화된 스크램블(scrambled) shRNA의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-스크램블, 음성 대조군)로부터 발생시킨다.
- [1693] 푸소솜을 유세포분석을 사용하여 MHC 클래스 I의 발현에 대해 검정한다. 적절한 수의 푸소솜을 세척하고, PBS에 재현탁시키고, MHC 클래스 I에 대향한 형광 공액 모노클로날 항체(Harlan Sera-Lab, Belton, UK)의 1: 10-1: 4000 희석물과 함께 얼음 상에서 30분 동안 놔둔다. 푸소솜을 PBS에서 3회 세척하고, PBS에 재현탁시킨다. 동등한 희석물에서 적절한 형광 공액 이소타입 대조군 항체와 함께 인큐베이션한 푸소솜 조성물의 동일한 분취물을 사용하여, 비특이적인 형광을 결정한다. 푸소솜을 유세포분석기(FACSort, Becton-Dickinson) 상에서 검정하고, 데이터를 유세포분석 소프트웨어(Becton-Dickinson)를 이용하여 분석한다.
- [1694] MSC, MSC-shMHC 클래스 I, MSC-스크램블로부터 유래된 푸소솜의 평균 형광 데이터를 비교한다. 일 구현예에서,

MSC-shMHC 클래스 I로부터 유래된 푸소좀은 MSC 및 MSC-스크램블과 비교하여 MHC 클래스 I의 더 낮은 발현을 가질 것이다.

[1695] 실시예 82: 대식세포 식작용을 피하기 위해 푸소좀 공급원 세포의 변형

[1696] 이 실시예는 변형된 푸소좀에 의한 식작용의 회피의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 변형된 푸소좀은 대식세포에 의한 식작용을 피할 것이다.

[1697] 세포는 식작용에서 포식 입자를 고용하여, 박테리아 또는 사멸된 세포와 같은 외래 침입자의 격리 및 파괴를 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 대식세포에 의한 푸소좀의 식작용은 이들의 활성을 감소시킬 것이다.

[1698] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀을 하기로부터 생성한다: CD47이 결여된 CSFE-표지된 포유류 세포(이하 NMC, 양성 대조군), CD47 cDNA의 렌티바이러스 매개 발현을 사용하여 CD47을 발현하도록 조작된 CSFE-표지된 세포(이하 NMC-CD47), 및 빈 벡터 대조군(이하 NMC-빈 벡터, 음성 대조군)의 렌티바이러스 매개 발현을 사용하여 조작된 CSFE-표지된 세포.

[1699] 대식세포 매개 면역 청소의 감소를 식작용 검정법을 하기 프로토콜에 따라 이용하여 결정한다. 대식세포를 수합 직후, 공초점 유리 바닥 디쉬에 평판배양한다. 대식세포를 DMEM+10%FBS+1%P/S에서 1시간 동안 인큐베이션하여 부착되게 한다. NMC, NMC-CD47, NMC-빈 벡터로부터 유래된 적절한 수의 푸소좀을 프로토콜에서 제시된 바와 같이 대식세포에 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션한다, tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf.

[1700] 2시간 후, 디쉬를 부드럽게 세척하고, 세포내 형광을 검사한다. 포식된 입자에 의해 방출되는 세포내 형광을 공초점 현미경에 의해 488 여기에서 이미지화한다. 식세포 양성 대식세포의 수를 이미징 소프트웨어를 사용하여 정량화한다. 데이터를 식세포 지수 = (포식된 세포의 총 수/계수된 대식세포의 총 수) X (포식된 세포를 함유하는 대식세포의 수/계수된 대식세포의 총 수) X 100으로서 표현한다.

[1701] 일 구현예에서, 대식세포를, NMC, 또는 NMC-빈 벡터로부터 유래된 푸소좀과 비교하여 NMC-CD47로부터 유래된 푸소좀과 함께 인큐베이션한 경우, 식세포 지수는 감소될 것이다.

[1702] 실시예 83: PBMC 세포 용해에 의해 매개되는 저하된 세포독성을 위한 푸소좀 공급원 세포의 변형

[1703] 이 실시예는 PBMC에 의한 세포 용해로 인해 저하된 세포독성을 갖도록 변형된 세포로부터 유래된 푸소좀의 발생을 기재한다.

[1704] 일 구현예에서, PBMC에 의한 공급원 세포 또는 푸소좀의 세포독성-매개 세포 용해는, 용해가 푸소좀의 활성을 감소시키거나, 예를 들어 저해하거나 중단시킬 것이므로, 푸소좀에 대한 면역원성의 측정이다.

[1705] 이 실시예에서, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC, 양성 대조군), HLA-G의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-HLA-G), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-빈 벡터, 음성 대조군)로부터 발생시킨다.

[1706] 푸소좀의 PMBC 매개 용해를, 문헌[Bouma, et al. Hum. Immunol. 35(2):85-92; 1992 & van Besouw et al. Transplantation 70(1):136-143; 2000]에 기재된 바와 같이 유로폼 방출 검정법에 의해 결정한다. PMBC(이하 효과기 세포)를 적절한 공여자로부터 분리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37°C에서 7일 동안 동종이계 감마선 조사된 PMBC 및 200IU/mL IL-2(프로류킨(proleukin), Chiron BV Amsterdam, The Netherlands)로 자극시킨다. 푸소좀을 유로폼-디에틸렌트리아민펜타아세테이트(DTPA)(sigma, St. Louis, MO, USA)로 표지한다.

[1707] 제7일에, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 효과기/표적 비에서 평판배양 후, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 96-웰 플레이트에서 ⁶³Eu-표지된 푸소좀을 효과기 세포와 함께 인큐베이션함으로써, 세포독성-매개 용해 검정법을 수행한다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 상층액의 시료를 낮은 백그라운드 형광(플루오로면역플레이트, Nunc, Roskilde, Denmark)과 함께 96-웰 플레이트에 이송한다.

[1708] 후속적으로, 증강 용액(PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)을 각각의 웰에 첨가한다. 방출된 유로폼을 시간-분해(time-resolved) 플루오로미터(Victor 1420 멀티라벨 카운터, LKB-Wallac, Finland)에서 측정한다. 형광은 1초 당 계수(CPS)에서 방출된다. 적절한 수($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)의 푸소좀을 1% 트리톤(sigma-aldrich)과 함께 적절한 양의 시간 동안 인큐베이션함으로써, 표적 푸소좀에 의한 유로폼의 최대 방출 퍼센트를 결정한다.

표적 푸소좀에 의한 유로폼의 자발적 방출을, 효과기 세포 없이 표지된 표적 푸소좀의 인큐베이션에 의해 측정한다. 그 후에, 유출 퍼센트를 (자발적 방출/최대 방출) x100%로서 계산한다. 최종적으로, 세포독성-매개 용해의 퍼센트를 %용해= [(측정된 용해-자발적 용해- 자발적 방출)/(최대 방출-자발적 방출)]x100%로서 계산한다. 용해의 퍼센트를 상이한 효과기 표적 비의 함수로서 확인함으로써 데이터를 분석한다.

[1709] 일 구현예에서, MSC-HLA-G 세포로부터 발생된 푸소좀은, MSC 또는 MSC-스크램블 발생된 푸소좀과 비교하여 특정 시점에서 표적 세포에 의한 용해의 저하된 퍼센트를 가질 것이다.

[1710] 실시예 84: 저하된 NK 용해 활성을 위한 푸소좀 공급원 세포의 변형

[1711] 이 실시예는 NK 세포에 의한 세포독성-매개 세포 용해를 저하시키도록 변형된 세포 공급원으로부터 유래된 푸소좀 조성물의 발생을 기재한다. 일 구현예에서, NK 세포에 의한 공급원 세포 또는 푸소좀의 세포독성-매개 세포 용해는 푸소좀에 대한 면역원성의 측정이다.

[1712] 이 실시예에서, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC, 양성 대조군), HLA-G의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-HLA-G), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-빈 벡터, 음성 대조군)로부터 발생시킨다.

[1713] 푸소좀의 NK 세포-매개 용해를, 문헌[Bouma, et al. Hum. Immunol. 35(2):85-92; 1992 & van Besouw et al. Transplantation 70(1):136-143; 2000]에 기재된 바와 같이 유로폼 방출 검정법에 의해 결정한다. NK 세포(이하 효과기 세포)를 적절한 공여자로부터 문헌[Crop et al. Cell transplantation (20):1547-1559; 2011]의 방법에 따라 단리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37°C에서 7일 동안 동종이계 감마선 조사된 PMBC 및 200IU/mL IL-2(프로류킨, Chiron BV Amsterdam, The Netherlands)로 자극시킨다. 푸소좀을 유로폼-디에틸렌트리아민펜타아세테이트(DTPA)(sigma, St. Louis, MO, USA)로 표지한다.

[1714] 제7일에, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 효과기/표적 비에서 평판배양 후, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 96-웰 플레이트에서 ⁶³Eu-표지된 푸소좀을 효과기 세포와 함께 인큐베이션함으로써, 세포독성-매개 용해 검정법을 수행한다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 상층액의 시료를 낮은 백그라운드 형광(플루오로면역플레이트, Nunc, Roskilde, Denmark)과 함께 96-웰 플레이트에 이송한다.

[1715] 후속적으로, 증강 용액(PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)을 각각의 웰에 첨가한다. 방출된 유로폼을 시간-분해 플루오로미터(Victor 1420 멀티라벨 카운터, LKB-Wallac, Finland)에서 측정한다. 형광은 1초 당 계수(CPS)에서 방출된다. 적절한 수($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)의 푸소좀을 1% 트리톤(sigma-aldrich)과 함께 적절한 양의 시간 동안 인큐베이션함으로써, 표적 푸소좀에 의한 유로폼의 최대 방출 퍼센트를 결정한다. 표적 푸소좀에 의한 유로폼의 자발적 방출을, 효과기 세포 없이 표지된 표적 푸소좀의 인큐베이션에 의해 측정한다. 그 후에, 유출 퍼센트를 (자발적 방출/최대 방출) x100%로서 계산한다. 최종적으로, 세포독성-매개 용해의 퍼센트를 %용해= [(측정된 용해-자발적 용해- 자발적 방출)/(최대 방출-자발적 방출)]x100%로서 계산한다. 용해의 퍼센트를 상이한 효과기 표적 비의 함수로서 확인함으로써 데이터를 분석한다.

[1716] 일 구현예에서, MSC-HLA-G 세포로부터 발생된 푸소좀은, MSC 또는 MSC-스크램블 발생된 푸소좀과 비교하여 특정 시점에서 표적 세포에 의한 용해의 저하된 퍼센트를 가질 것이다.

[1717] 실시예 85: 저하된 CD8 살해 T 세포 용해를 위한 푸소좀 공급원 세포의 변형

[1718] 이 실시예는 CD8+ T-세포에 의한 세포독성-매개 세포 용해를 저하시키기 위해 변형된 세포로부터 유래된 푸소좀의 발생을 기재한다. 일 구현예에서, CD8+ T-세포에 의한 공급원 세포 또는 푸소좀의 세포독성-매개 세포 용해는 푸소좀에 대한 면역원성의 측정이다.

[1719] 이 실시예에서, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC, 양성 대조군), HLA-G의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-HLA-G), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-빈 벡터, 음성 대조군)로부터 발생시킨다.

[1720] 푸소좀의 CD8+ T 세포-매개 용해를, 문헌[Bouma, et al. Hum. Immunol. 35(2):85-92; 1992 & van Besouw et al. Transplantation 70(1):136-143; 2000]에 기재된 바와 같이 유로폼 방출 검정법에 의해 결정한다. CD8+ T-세포(이하 효과기 세포)를 적절한 공여자로부터 문헌[Crop et al. Cell transplantation (20):1547-1559;

2011]의 방법에 따라 단리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37℃에서 7일 동안 동종이계 감마선 조사된 PMBC 및 200IU/mL IL-2(프로류킨, Chiron BV Amsterdam, The Netherlands)로 자극시킨다. 푸소좀을 유로폼-디에틸렌 트리아민펜타아세테이트(DTPA)(sigma, St. Louis, MO, USA)로 표지한다.

- [1721] 제7일에, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 효과기/표적 비에서 평판배양 후, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 96-웰 플레이트에서 ⁶³Eu-표지된 푸소좀을 효과기 세포와 함께 인큐베이션함으로써, 세포독성-매개 용해 검정법을 수행한다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 20 ul의 상층액을 낮은 백그라운드 형광(플루오로면역플레이트, Nunc, Roskilde, Denmark)과 함께 96-웰 플레이트에 이송한다.
- [1722] 후속적으로, 증강 용액(PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)을 각각의 웰에 첨가한다. 방출된 유로폼을 시간-분해 플루오로미터(Victor 1420 멀티라벨 카운터, LKB-Wallac, Finland)에서 측정한다. 형광은 1초 당 계수(CPS)에서 방출된다. 적절한 수($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)의 푸소좀을 1% 트리톤(sigma-aldrich)과 함께 적절한 양의 시간 동안 인큐베이션함으로써, 표적 푸소좀에 의한 유로폼의 최대 방출 퍼센트를 결정한다. 표적 푸소좀에 의한 유로폼의 자발적 방출을, 효과기 세포 없이 표지된 표적 푸소좀의 인큐베이션에 의해 측정한다. 그 후에, 유출 퍼센트를 (자발적 방출/최대 방출) x100%로서 계산한다. 최종적으로, 세포독성-매개 용해의 퍼센트를 %용해=[(측정된 용해-자발적 용해- 자발적 방출)/(최대 방출-자발적 방출)]x100%로서 계산한다. 용해의 퍼센트를 상이한 효과기 표적 비의 함수로서 확인함으로써 데이터를 분석한다.
- [1723] 일 구현예에서, MSC-HLA-G 세포로부터 발생된 푸소좀은, MSC 또는 MSC-스크램블 발생된 푸소좀과 비교하여 특정 시점에서 표적 세포에 의한 용해의 저하된 퍼센트를 가질 것이다.
- [1724] 실시예 86: 저하된 T-세포 활성화를 위한 푸소좀 공급원 세포의 변형
- [1725] 이 실시예는 혼합된 림프구 반응(MLR)에 의해 평가된 바와 같이, 감소된 T 세포 활성화 및 증식을 가질 변형된 푸소좀의 발생을 기재한다.
- [1726] T-세포 증식 및 활성화는 푸소좀의 면역원성의 측정이다. MLR 반응에서 푸소좀 조성물에 의한 T 세포 증식의 자극은 생체내에서 T 세포 증식의 자극을 제안할 수 있을 것이다.
- [1727] 일 구현예에서, 변형된 공급원 세포로부터 발생된 푸소좀은 혼합된 림프구 반응(MLR)에 의해 평가된 바와 같이, 감소된 T 세포 활성화 및 증식을 갖는다. 일 구현예에서, 변형된 공급원 세포로부터 발생된 푸소좀은 생체내에서 면역 반응을 발생시키지 않으며, 따라서, 푸소좀 조성물의 효능을 유지한다.
- [1728] 이 실시예에서, 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 발생시킨다. 푸소좀을: 비변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC, 양성 대조군), IL-10의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-IL-10), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 간엽 줄기세포(이하 MSC-빈 벡터)로부터 생성한다.
- [1729] BALB/c 및 C57BL/6 비장세포를 자극제 또는 반응자 세포로서 사용한다. 주목할 만하게는, 이들 세포의 공급원을 보편적으로 사용되는 인간-유래 자극제/반응자 세포로 교환할 수 있다. 부가적으로, 임의의 포유류 정제된 동종이계 CD4+ T 세포 집단, CD8+ T-세포 집단, 또는 CD4-/CD8-를 반응자 집단으로서 사용할 수 있다.
- [1730] 완전히 프로스트된(frosted) 슬라이드를 사용한 기계적 해리, 및 뒤이어 용해 완충제(Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)를 이용한 적혈구 세포의 용해에 의해 마우스 비장세포를 단리한다. 실험 전에, 자극제 세포를 20 Gy의 γ -선으로 조사하여, 이들 세포가 반응자 세포에 대항하여 반응하지 않도록 방지한다. 그 후에, 동일한 수의 자극제 및 반응자 세포(또는 1:1 비를 유지하면서 대안적인 농도)를 둥근 바닥 96-웰 플레이트 내 완전 DMEM-10 배지에서 공동-배양물을 제조한다. 적절한 수의 푸소좀($1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 범위의 몇몇 농도에서)을 상이한 시간 간격, $t = 0, 6, 12, 24, 36, 48$ 시간에서 공동-배양물에 첨가한다.
- [1731] 혼입을 허용하기 위해 1 μ Ci의 [³H]-티미딘(Amersham, Buckinghamshire, UK)을 첨가함으로써, 증식을 평가한다. [³H]-티미딘을 $t = 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72$ 시간에서 MLR에 첨가하고, 2, 6, 12, 18, 24, 36 및 48시간의 연장된 배양 후, 세포를 96 웰 세포 수합기(Inotech, Bertold, Japan)를 사용하여 유리 섬유 필터 상으로 수합한다. 모든 T-세포 증식 실험을 3별 중복 수행한다. [³H]-티미딘 혼입을 마이크로베타 발광 계수기(Perkin Elmer, Wellesley, MA)를 사용하여 측정한다. 그 결과를 1분 당 계수(cpm)로서 나타낼 수 있다.
- [1732] 일 구현예에서, MSC-IL10 푸소좀은 MSC-빈 벡터 또는 MSC 비변형된 푸소좀 대조군과 비교하여 T-세포 증식의 저

하를 보여줄 것이다.

[1733] 실시예 87: 대상체에서 표적화 잠재력의 측정

[1734] 이 실시예는 특이적인 신체 부위를 표적화하는 푸소좀의 능력을 평가한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 특이적인 신체 부위를 표적화할 수 있다. 표적화는 치료제의 활성을 하나 이상의 관련된 치료 부위로 제약하는 방식이다.

[1735] 8 주령의 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratories)에게 파이어플라이 루시페라제를 발현하는 푸소좀 또는 세포를 정맥내 주사한다. 푸소좀은 파이어플라이 루시페라제를 안정하게 발현하는 세포 또는 루시페라제를 발현하지 않는 세포로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된다. 푸소좀 또는 세포 주사 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 및 24시간째에 마우스 그룹을 안락사시킨다.

[1736] 안락사 전 5분째에, 마우스는 루시페라제를 가시화하기 위해, 150 mg/kg 용량의 생물발광 기질(Perkin Elmer)의 IP 주사를 받는다. 생물발광 이미징 시스템을 보정하여, 모든 장치 세팅을 보상한다. 그 후에, 마우스를 안락사 시키고, 간, 폐, 심장, 비장, 췌장, GI 및 신장을 수습한다. 이미징 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여, 이들 생체의 기관의 생물발광의 이미지를 수득한다. 레이디언스 광자를 사용하여 생물발광 신호를 측정하고, 이때, 총 유속을 측정된 값으로서 사용한다. 값을 광자/초로 제공하기 위해, 생체의 기관을 서라운드함으로써, 관심 영역(ROI)을 발생시킨다. 표적 기관(예를 들어 간)과 비-표적 기관(예를 들어 폐, 심장, 비장, 췌장, GI, 및 신장으로부터의 광자/초의 합계) 사이의 광자/초의 비를 간으로의 표적화의 측정치로서 계산한다.

[1737] 일 구현예에서, 푸소좀과 세포 둘 모두에서, 간과 다른 기관 사이의 광자/초의 비는 1 초과일 것이며, 이는 푸소좀이 간을 표적화함을 시사할 것이다. 일 구현예에서, 음성 대조군 동물은 모든 기관에서 훨씬 더 낮은 광자/초를 제시할 것이다.

[1738] 실시예 88: 대상체에서 외인성 작용제의 전달의 측정

[1739] 이 실시예는 대상체에서 외인성 작용제를 포함하는 푸소좀의 전달의 정량화를 기재한다. 푸소좀을, Gaussia 루시페라제를 발현하는 세포 또는 루시페라제를 발현하지 않는 세포(음성 대조군)로부터 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다.

[1740] 양성 대조군 세포 또는 푸소좀을 마우스에게 정맥내 주사한다. 푸소좀 또는 세포를 26-게이지 인슐린 주사기-바늘을 사용하여 5~8초 이내에 전달한다. 생체내에서 생물발광 이미징을 주사 후 1, 2, 또는 3일째에 마우스 상에서 생체내 이미징 시스템(Xenogen Corporation, Alameda, CA)을 사용하여 수행한다.

[1741] 사용 직전, 코엘렌테라진(coelenterazine), 루시페린 또는 발광 분자(5 mg/ml)를 산성화된 메탄올 내에서 제조하고, 마우스의 꼬리 정맥 내로 즉시 주사한다. 마우스를 XGI-8 가스 마취제 시스템을 사용하여 가열된 스테이지 상에서 연속 마취 하에 둔다.

[1742] 코엘렌테라진(4 µg/g 체중)의 정맥내 꼬리 정맥 주사 직후, 5분에 걸쳐 광자 계수를 획득함으로써, 생물발광 이미징을 수득한다. 획득된 데이터를, 광-시야 이미지 상에서 오버레이와 함께 소프트웨어(Xenogen)를 사용하여 분석한다. 관심 영역(ROI)을, 자동 신호 강도 컨투어 툴(contour tool)을 사용하여 생성하고, 동일한 동물의 백그라운드 차감을 이용하여 정규화한다. 3~10분의 노출 시간과 함께 580, 600 및 620 nm의 파장에서 3개 필터를 사용한 순차적인 데이터 획득을 수행하여, 마우스 내부에서 생물발광 광원을 국소화한다.

[1743] 더욱이, 각각의 시점에서, 소변 시료를 복부 촉진에 의해 수습한다.

[1744] 혈액 시료(50 µl)를 각각의 마우스의 꼬리 정맥으로부터 헤파린처리된 튜브 또는 EDTA 튜브 내로 수득한다. 혈장 단리를 위해, 혈액 시료를 1.3Xg, 4°C에서 25분 동안 원심분리한다.

[1745] 그 후에, 시료를 50 µM Gaussia 루시페라제 기질(Nanolight, Pinetop, AZ)과 혼합한 후, 5 µl의 혈액, 혈장 또는 소변 시료를 사용하여 Gaussia 루시페라제 활성 검정법을 수행한다.

[1746] 일 구현예에서, 음성 대조군 시료는 루시페라제에 대해 음성일 것이고, 양성 대조군 시료는 세포가 투여된 동물로부터의 것일 것이다. 일 구현예에서, Gaussia 루시페라제를 발현하는 푸소좀이 투여된 동물로부터의 시료는 각각의 시료에서 루시페라제에 대해 양성일 것이다.

[1747] 예를 들어, 문헌[E1-Amouri SS et al., Molecular biotechnology53(1): 63-73, 2013]을 참조한다.

[1748] 실시예 89: 푸소좀의 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송

[1749] 이 실시예는 살아 있는 세포에서 글루코스 흡수, 및 따라서 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송을 모니터링하

는 데 사용될 수 있는 2-NBDG (2-(*N*-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노)-2-데옥시글루코스), 형광 글루코스 유사체의 수준의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 이러한 검정법은 글루코스 흡수 수준 및 푸소좀의 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[1750] 푸소좀 조성물을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 그 후에, 충분한 수의 푸소좀을 글루코스, 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM에서 37°C 및 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 2시간의 글루코스 기아 기간 후, 배지는, 상기 배지가 글루코스, 20% 태아 소 혈청, 1x 페니실린/스트렙토마이신 및 20 μM 2-NBDG(ThermoFisher)가 없는 DMEM을 포함하도록 변하고, 37°C 및 5% CO₂에서 추가적인 2시간 동안 인큐베이션한다. 2-NBDG 대신에, 2-NBDG 대신에 동일한 양의 DMSO를 첨가하는 점을 제외하고는, 음성 대조군 푸소좀을 동일하게 처리한다.

[1751] 그 후에, 푸소좀을 1xPBS로 3회 세척하고, 적절한 완충제에 재현탁시키고, 96 웰 이미징 플레이트로 이송한다. 그 후에, 2-NBDG 형광을, GFP 광 큐브(469/35 여기 필터 및 525/39 방출 필터)를 사용하는 형광계수기에서 측정하여, 푸소좀 막을 가로질러 수송되고 푸소좀에서 1시간의 로딩 기간에서 누적된 2-NBDG의 양을 정량화한다.

[1752] 일 구현예에서, 2-NBDG 형광은 음성(DMSO) 대조군과 비교하여, 2-NBDG 처리된 푸소좀에서 더 높을 것이다. 525/39 방출 필터를 이용한 형광 측정은 존재하는 2-NBDG 분자의 수와 상관관계가 있을 것이다.

[1753] 실시예 90: 비-세포내이입 경로를 통한 푸소좀의 전달

[1754] 이 실시예는 비-세포내이입 경로를 통한 수여자 세포로의 Cre의 푸소좀 전달의 정량화를 기재한다.

[1755] 일 구현예에서, 푸소좀은 작용제를 푸소좀-매개, 비-세포내이입 경로를 통해 전달할 것이다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 푸소좀의 세포내이입-매개 흡수에 대한 임의의 요건 없이, 수여자 세포의 세포기질에 직접적으로, 푸소좀의 내강 내에서 운반되는 작용제, 예를 들어 Cre의 전달은 푸소좀-매개, 비-세포내이입 경로 전달을 통해 발생할 것이다.

[1756] 이 실시예에서, 푸소좀은 센다이 바이러스 H 및 F 단백질을 이의 형질막 상에 발현하는 HEK293T 세포를 포함한다(문헌[Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22(October 2014), 1-8. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.123>]). 또한, 푸소좀은 mTagBFP2 형광 단백질 및 Cre 리컴비나제를 발현한다. 표적 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 RPMI8226 세포이며, 이는 재조합 시 Cre를 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다.

[1757] 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을 하기와 같이 비-세포내이입 경로를 통한 Cre의 전달에 대해 검정한다. 상기 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 평판배양한다. 다음, 수여자 세포를 평판배양 후 24시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하고 특정 푸소젠 단백질을 소유하는 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용한다. 비-세포내이입 경로를 통한 Cre 전달의 수준을 결정하기 위해, 푸소좀을 받는 수여자 세포의 병행 그룹을 엔도솜 산성화의 저해제, 클로로퀸(30 μg/mL)으로 처리한다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 돕는다. 그 후에, 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 작용제 전달, Cre를 이미징을 통해 평가한다.

[1758] 세포를 필드 또는 웰 내 RFP-양성 세포 대 GFP-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해 이미지화한다. 이 실시예에서, 세포 플레이트를, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화한다. 우선, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 주어진 웰 내 총 세포 집단을 결정한다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용된다. 염색 후, Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체한다.

[1759] Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 상이한 세포군의 이미지를 획득한다.

[1760] RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정한다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화한다.

- [1761] GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, 형광 현미경이 구비된 소프트웨어 또는 다른 소프트웨어를 이용하여 수행한다(문헌[Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007]). 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공한다. 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정한다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 사용하여 역치를 설정하고, 너무 작거나 너무 큰 Hoechst-양성 세포를 배제한다.
- [1762] 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치를 설정하고, 전체 GFP 및 RFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 GFP 및 RFP-양성 세포를 식별한다.
- [1763] 수여자 세포를 함유하는 대조군 웰에서 식별된 RFP-양성 세포의 수를, (비-특이적인 Loxp 재조합을 차감시키기 위해) 푸소좀을 함유하는 웰 내 RFP-양성 세포의 수로부터 차감하는 데 사용한다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre를 받은 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(Cre를 받지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, 수여자 세포 집단에 전달된 푸소좀 Cre의 분획을 정량화한다. 상기 수준을 수여자 세포에게 적용된 푸소좀의 주어진 용량으로 정규화한다. 비-세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 값을 계산하기 위해, 클로로퀸의 존재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL+CQ), 뿐만 아니라 클로로퀸의 부재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL-CQ)을 결정한다. 비-세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 정규화된 값을 결정하기 위해, 하기 방정식을 사용한다: $[(\text{FusL-CQ})-(\text{FusL+CQ})]/(\text{FusL-CQ})$.
- [1764] 일 구현예에서, 주어진 푸소좀에 대해 비-세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 평균 수준은 클로로퀸 처리된 수여자 세포보다 0.1~0.95, 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 범위일 것이다.
- [1765] 실시예 91: 세포내이입 경로를 통한 푸소좀의 전달
- [1766] 이 실시예는 세포내이입 경로를 통한 수여자 세포로의 Cre의 푸소좀 전달을 기재한다.
- [1767] 일 구현예에서, 푸소좀은 작용제를 푸소좀-매개, 세포내이입 경로를 통해 전달할 것이다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 수여자 세포로의, 푸소좀의 내강에서 운반되는 작용제, 예를 들어 적재물의 전달은 푸소좀-매개, 세포내이입 경로 전달을 통해 발생할 것이며, 이때 흡수 경로는 세포내이입-의존적이다.
- [1768] 이 실시예에서, 푸소좀은 푸소젠 단백질을 세포의 형질막 상에 발현하는 HEK293T 세포를 2 μm 필터를 통해 압출시킴으로써 생성되는 미세소낭을 포함한다(문헌[Lin et al., 2016, Biomedical Microdevices, 18(3). doi.org/10.1007/s10544-016-0066-y] [Riedel, Kondor-Koch, & Garoff, 1984, The EMBO Journal, 3(7), 1477-83. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6086326]). 또한, 푸소좀은 mTagBFP2 형광 단백질 및 Cre 리컴비나제를 발현한다. 표적 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 PC3 세포이며, 이는 재조합 시 Cre를 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다.
- [1769] 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을 하기와 같이 세포내이입 경로를 통한 Cre의 전달에 대해 검정한다. 수여자 세포를 사용되는 이미징 시스템과 융화성인 세포 배양물 다중-웰 플레이트 내로 평판배양한다(이 실시예에서 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트에 평판배양함). 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하고 특정 푸소젠 단백질을 소유하는 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용한다. 세포내이입 경로를 통한 Cre 전달의 수준을 결정하기 위해, 푸소좀을 받는 수여자 세포의 병행 그룹을 엔도솜 산성화의 저해제, 클로로퀸(30 $\mu\text{g/mL}$)으로 처리한다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 돕는다. 그 후에, 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 작용제 전달, Cre를 이미징을 통해 평가한다.
- [1770] 세포를 필드 또는 웰 내 RFP-양성 세포 대 GFP-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해 이미지화한다. 이 실시예에서, 세포 플레이트를, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화한다. 우선, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 주어진 웰 내 총 세포 집단을 결정한다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용된다. 염색 후 Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체한다.
- [1771] Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사

용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 상이한 세포군의 이미지를 획득한다.

[1772] RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정한다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화한다.

[1773] GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, 형광 현미경이 구비된 소프트웨어 또는 다른 소프트웨어를 이용하여 수행한다(문헌[Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2007]). 이미지를 60 μ m 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공한다. 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정한다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 사용하여 역치를 설정하고, 너무 작거나 너무 큰 Hoechst-양성 세포를 배제한다.

[1774] 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치를 설정하고, 전체 GFP 및 RFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 GFP 및 RFP-양성 세포를 식별한다.

[1775] 수여자 세포를 함유하는 대조군 웰에서 식별된 RFP-양성 세포의 수를, (비-특이적인 Loxp 재조합을 차감시키기 위해) 푸소좀을 함유하는 웰 내 RFP-양성 세포의 수로부터 차감하는 데 사용한다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre를 받은 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(Cre를 받지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, 수여자 세포 집단에 전달된 푸소좀 Cre의 분획을 정량화한다. 상기 수준을 수여자 세포에게 적용된 푸소좀의 주어진 용량으로 정규화한다. 세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 값을 계산하기 위해, 클로로퀸의 존재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL+CQ), 뿐만 아니라 클로로퀸의 부재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL-CQ)을 결정한다. 세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 정규화된 값을 결정하기 위해, 하기 방정식을 사용한다: $(FusL+CQ)/(FusL-CQ)$.

[1776] 일 구현예에서, 주어진 푸소좀에 대해 세포내이입 경로를 통해 전달된 푸소좀 Cre의 평균 수준은 클로로퀸 처리된 수여자 세포보다 0.01~0.6, 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 범위일 것이다.

[1777] 실시예 92: 디나민-매개 경로, 거대음작용 경로, 또는 액틴 매개 경로를 통한 푸소좀의 전달

[1778] 이 실시예는 디나민-매개 경로를 통한 수여자 세포로의 Cre의 푸소좀 전달을 기재한다. 미세소낭을 포함하는 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 생성할 수 있다. 푸소좀을, 이러한 푸소좀을 받는 수여자 세포 그룹이 디나민의 저해제, 디나소어(120 μ M)로 처리되는 점을 제외하고는, 이전의 실시예에 따라 디나민-매개 경로를 통한 Cre의 전달에 대해 검정한다. 디나민-매개 경로를 통해 전달되는 푸소좀 Cre의 값을 계산하기 위해, 디나소어의 존재 하에 푸소좀 Cre 전달의 수준(FusL+DS), 뿐만 아니라 디나소어의 부재 하에 푸소좀 Cre 전달의 수준(FusL-DS)을 결정한다. 전달되는 푸소좀 Cre의 정규화된 값을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 계산할 수 있다.

[1779] 이 실시예는 또한, 거대음작용을 통한 수여자 세포로의 Cre의 전달을 기재한다. 미세소낭을 포함하는 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 생성할 수 있다. 푸소좀을 받는 수여자 세포 그룹을 거대음작용의 저해제, 5-(N-에틸-N-이소프로필)아밀로라이드(EIPA)(25 μ M)로 처리하는 점을 제외하고는, 상기 푸소좀을 이전의 실시예에 따라 거대음작용을 통한 Cre의 전달에 대해 검정한다. 거대음작용을 통해 전달되는 푸소좀 Cre의 값을 계산하기 위해, EIPA의 존재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL+EIPA), 뿐만 아니라 EIPA의 부재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL-EIPA)을 결정한다. 전달되는 푸소좀 Cre의 정규화된 값을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 계산할 수 있다.

[1780] 이 실시예는 또한, 액틴 매개 경로를 통한 수여자 세포로의 Cre의 푸소좀 전달을 기재한다. 미세소낭을 포함하는 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 생성할 수 있다. 푸소좀을 받는 수여자 세포 그룹을 액틴 중합의 저해제, 라트룬쿨린 B(6 μ M)으로 처리하는 점을 제외하고는, 상기 푸소좀을 이전의 실시예에 따라 거대음작용을 통한 Cre의 전달에 대해 검정한다. 액틴-매개 경로를 통해 전달되는 푸소좀 Cre의 값을 계산하기 위해, 라트룬쿨린 B의 존재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL+ LatB), 뿐만 아니라 라트룬쿨린 B의 부재 하에 푸소좀 Cre 전달 수준(FusL- LatB)을 결정한다. 전달되는 푸소좀 Cre의 정규화된 값을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 계산할 수 있다.

- [1781] 실시예 93: 세포소기관의 전달
- [1782] 이 실시예는 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합을 기재한다. 일 구현예에서, 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포로의 푸소좀 미토콘드리아 적재물의 전달을 초래할 수 있다.
- [1783] 본원에 기재된 방법에 의해 기재된 방법에 의해 생성되는 푸소좀을 하기와 같이, 수여자 세포로의 이의 미토콘드리아를 전달하는 이의 능력에 대해 검정하였다.
- [1784] 이러한 특정 실시예에서, 푸소좀은 미토콘드리아를 표지하기 위해, 이의 막 상에 푸소젠 단백질, 뿐만 아니라 미토콘드리아-표적화된 DsRED(mito-DsRED) 단백질을 발현하는 HEK293T 세포였다. 수여자 세포를 사용되는 이미징 시스템과 융화성인 세포 배양물 다중-웰 플레이트 내로 평판배양하였다(이 실시예에서 세포를 유리-바닥 이미징에 평판배양하였음). 수여자 세포는 세포기질 GFP를 안정하게 발현하였다.
- [1785] 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간제에, mito-DsRED를 발현하고 특정 푸소젠 단백질을 소유하는 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용하였다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있었다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 도왔다. 그 후에, 세포를 4시간 동안 인큐베이션하고, pH 6.0 포스페이트-완충 식염수에 1분간 노출시킴으로써 VSVG-매개 융합을 유도하였다(또는 대조군 세포를 pH 7.4 포스페이트-완충 식염수에 노출시킴). 융합의 유도 후, 세포를 부가적인 16시간 동안 인큐베이션하고, 미토콘드리아 전달을 이미징을 통해 평가하였다.
- [1786] 이 실시예에서, 세포를, 37℃ 및 5% CO₂에서 유지시키는 한편 63x 오일 침지 대물렌즈를 갖는 Zeiss LSM 710 공초점 현미경 상에서 이미지화하였다. GFP를 488 nm 레이저 여기를 받게 하고, 방출을 밴드 통과 495 내지 530 nm 필터를 통해 기록하였다. DsRED를 543 nm 레이저 여기를 받게 하고, 방출을 밴드 통과 560 내지 610 nm 필터를 통해 기록하였다. 세포를 스캐닝하여, 세포기질 GFP 형광 및 mito-DsRED 형광에 대해 양성인 세포를 양성적으로 식별하였다.
- [1787] 세포기질 GFP와 mito-DsRED 미토콘드리아 둘 모두의 존재를 동일한 세포에서 확인하였으며, 이는 세포가 VSVG-매개 융합을 겪었고, 따라서 미토콘드리아가 푸소좀으로부터 수여자 세포로 전달되었음을 나타낸다.
- [1788] 실시예 94: DNA의 시험관내 전달
- [1789] 이 실시예는 시험관내에서 푸소좀을 사용하여 세포로의 DNA의 전달을 기재한다. 이 실시예는 외인성 유전자, GFP, 대리물 치료제 적재물을 인코딩하는 플라스미드를 사용하여 DNA를 전달하는 푸소좀의 능력을 정량화한다.
- [1790] 푸소젠이 Cre의 오픈 리딩 프레임과 프레임 내에 있도록, 푸소좀을 제외하고, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 바와 같이 세포-유래 소낭 또는 세포-유래 세포생물체로부터 유래하는 푸소좀 조성물을 조작한다. 푸소좀의 생성 후, 이를 GFP를 코딩하는 서열을 갖는 플라스미드로 부가적으로 핵감염된다(nucleofected)(System Biosciences, Inc.).
- [1791] 예를 들어, 문헌[Chen X, et al., Genes Dis. 2015 Mar;2(1):96- 105.DOI:10.1016/j.gendis.2014.12.001]을 참조한다.
- [1792] 음성 대조군으로서, 푸소좀을, 베타-액틴을 코딩하는 서열을 갖는 플라스미드로 부가적으로 핵감염시킨다.
- [1793] 그 후에, 충분한 수의 푸소좀을 37℃ 및 5% CO₂에서 loxP-정지-loxP-tdTomato 리포터를 갖는 수여자 NIH/3T3 섬유아세포 세포주와 함께 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 48시간의 기간 동안 인큐베이션한다. 48시간의 인큐베이션 후, 그 후에, tdTomato 양성 세포를, 561nm 레이저 여기를 갖는 FACS 세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하는 FACS를 통해 분리하고, 방출을 590+/-20 nm에서 수합한다. 그 후에, 총 DNA를 DNA 추출 용액(Epicentre)을 사용하여 분리하고, PCR을, 600bp 단편을 증폭시키는 GFP(표 12 참조)에 특이적인 프라이머를 사용하여 수행한다. 그 후에, 겔 전기영동 후 겔 상에 존재하는 600 bp 단편은 수여자 세포로의 DNA 전달의 존재를 실질화할 것이다.

표 12. 500 bp 단편을 증폭시키는 GFP 프라이머 서열

프라이머	서열
GFP-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC
GFP-R	GTCCTTTTACCAGACAACCATTAC

[1794]

[1795]

일 구현예에서, 시험관내에서 푸소좀과 함께 핵산 적재물의 전달은 음성 대조군과 비교하여 GFP 플라스미드를 갖는 푸소좀에서 더 높다. 무시할 만한 GFP 형광이 음성 대조군에서 검출된다.

[1796]

실시예 95: DNA의 생체내 전달

[1797]

이 실시예는 생체내에서 푸소좀을 통한 세포로의 DNA 전달을 기재한다. 생체내에서 세포로의 DNA의 전달은 수여자 세포 내에서 단백질의 발현을 초래한다.

[1798]

생체내에서 푸소좀 DNA 전달은 유기체(마우스) 내에서 수여자 세포에서 DNA의 전달 및 단백질 발현을 실증할 것이다.

[1799]

간 지향(directed) 푸소좀을 발현하는 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 제조한다. 푸소좀의 생성 후, 이를 Cre 리컴비나제를 코딩하는 서열을 갖는 플라스미드로 부가적으로 핵감염시킨다.

[1800]

푸소좀을 생체내 전달을 위해 제조한다. 푸소좀 현탁액은 원심분리를 받는다. 푸소좀의 펠렛을 주사용 멸균 포스페이트 완충 식염수에 재현탁시킨다.

[1801]

푸소좀은 핵산 검출 방법, 예를 들어 PCR을 사용하여 DNA를 함유하는 것으로 입증된다.

[1802]

수여자 마우스는 loxp-루시퍼라제 게놈 DNA 유전자좌를 가지며, 이러한 유전자좌는 푸소좀에 의해 전달된 DNA로부터 만들어진 CRE 단백질에 의해 변형되어, 루시퍼라제(JAX#005125)의 발현을 차단하지 못한다. 이 실시예에 대한 양성 대조군은, 그 자체의 게놈으로부터 간에서 동일한 단백질을 독점적으로 발현하는 마우스 계통과 짝지어진 수여자 마우스의 자손이다(알부민-CRE JAX#003574). 이러한 짝지움으로부터의 자손은 각각의 대립유전자 중 하나를 갖는다(loxp-루시퍼라제, 알부민-CRE). 음성 대조군을, 푸소좀을 발현하지 않는 푸소좀 또는 푸소좀을 함유하지만 Cre DNA를 함유하지 않는 푸소좀을 수여자 마우스에게 주사함으로써 수행한다.

[1803]

푸소좀을 정맥내(IV) 꼬리 정맥 투여에 의해 마우스에게 전달한다. 마우스를 상업적으로 입수 가능한 마우스 구속기(restrainer)(Harvard 장치)에 놓는다. 구속시키기 전에, 이들 동물의 케이지를 순환하는 수조 상에 놓음으로써, 동물을 따뜻하게 한다. 구속기 내부에 있으면, 동물은 순응되도록 허용된다. 30G 바늘 팁, 3" 길이의 PE-10 튜빙, 및 28G 바늘로 구성된 IV 카테터를 준비하고, 해파린처리된 식염수로 플러싱한다. 꼬리를 70% 알코올 프랩 패드를 이용하여 세정한다. 그 후에, 카테터 바늘을 겹자로 고정시키고, 혈액이 튜빙 내에서 보이게 될 때까지 측면(lateral) 꼬리 정맥 내로 서서히 도입한다. 푸소좀 용액(약 500 K 내지 5 M 푸소좀)을 1 cc 투베르쿨린 주사기 내로 흡인하고, 주입 펌프에 연결한다. 푸소좀 용액을 용량에 따라 1분 당 20 μ L의 속도로 30초 내지 5분 동안 전달한다. 주입의 완료 시, 카테터를 제거하고, 임의의 출혈이 중단될 때까지 압력을 주사 부위에 적용한다. 마우스를 이들의 케이지로 돌려 보내고, 회복되도록 허용한다.

[1804]

융합 후, DNA는 전사되고 CRE 단백질로 번역될 것이고, 그 후에 이는 재조합을 수행하기 위해 핵으로 전좌하여, 루시퍼라제의 구성적 발현을 초래할 것이다. D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)의 복강 내 투여는 생물발광의 생성을 통한 루시퍼라제 발현의 검출을 가능하게 한다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 콘 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓는다. 주사-후 8분 내지 20분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 생물발광의 최대를 관찰한다. 간의 특정 영역을 소프트웨어 및 수합 노출 시간 설정에서 생성하여, 계수율이 (이 영역에서) 600 초과가 되게 하여, 해석 가능한 레이디언스(radiance)(광자/초/ cm^2 /스테라디안(steradian)) 측정을 산출한다. 생물발광 레이디언스의 최대값을 생물발광 분포의 이미지로서 기록한다. 간 조직을 구체적으로, 백그라운드(비처리된 동물) 및 음성 대조군보다 높은 레이디언스 측정에 대해 모니터링한다. 주사-후 24시간째에 측정을 수행하여, 루시퍼라제 활성을 관찰한다. 그 후에, 마우스를 안락사시키고, 간을 수합한다.

[1805]

신선하게 수합된 조직은 4°C에서 1 내지 3시간 동안 4% 파라포름알데하이드/0.1 M 소듐 포스페이트 완충제 pH7.4에서의 침지를 통해 고정 및 포매를 받는다. 그 후에, 조직을 4°C에서 멸균 15% 수크로스/1xPBS에 (3시간 내지 밤새) 침지시킨다. 그 후에, 조직을 O.C.T.(Baxter No. M7148-4)에 포매시킨다. 조직을 박절용으로 적절한

블록(block)(단면) 내에 배향시킨다. 그 후에, 조직을 하기 방법을 사용하여 액체 질소에서 냉동시킨다: 블록의 하부 1/3을 액체 질소 내에 놓고, O.C.T.의 중앙부를 제외한 모두가 냉동될 때까지 냉동되게 허용하고, 드라이아이스 상에서 결로내려지도록 냉동을 허용한다. 블록을, 슬라이드 상에 놓인 5 내지 7 마이크론 절편으로 크리오스타트(cryostat)에 의해 박절하고, 염색용으로 다시 냉동시킨다.

- [1806] 인 시추 혼성화를, 항-디곡시게닌 형광 항체에 의해 표지된 디곡시게닌 표지된 핵산 프로브(CRE DNA 및 루시퍼라제 mRNA 검출을 위해)를 사용하여 조직 절편 상에서 (표준 방법을 사용하여) 수행하고, 공초점 현미경에 의해 관찰한다.
- [1807] 구현예에서, 양성 대조군 동물(푸소좀 주사 없이 출혈을 통해 재조합)은 비처리된 동물(CRE가 없고 푸소좀이 없음) 및 음성 대조군과 비교하여 간에서 생물발광 강도를 보여줄 것인 한편, 작용제가 주사된 동물은 음성 대조군(푸소좀이 없는 푸소좀) 및 비처리된 동물과 비교하여 간에서 생물발광을 보여줄 것이다.
- [1808] 구현예에서, 작용제가 주사된 동물에서 조직 절편에서 핵산의 검출은, 조직의 세포에서 음성 대조군 및 비처리된 동물과 비교하여 CRE 리컴비나제 및 루시퍼라제 mRNA의 검출을 드러낼 것인 한편, 양성 대조군은 조직 전반에 걸쳐 루시퍼라제 mRNA와 CRE 리컴비나제 DNA 둘 모두의 수준을 보여줄 것이다.
- [1809] 푸소좀에 의한 DNA 전달의 증거를, 동물의 수여자 조직에서 DNA 및 이의 공동 위치화의 인 시추 혼성화-기반 검출에 의해 검출할 것이다. DNA로부터 발현된 단백질의 활성을 생물발광 이미징에 의해 검출할 것이다. 구현예에서, 푸소좀은 단백질 생성 및 활성을 초래할 DNA를 전달할 것이다.
- [1810] 실시예 96: mRNA의 시험관내 전달
- [1811] 이 실시예는 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합을 기재한다. 일 구현예에서, 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포로의 명시된 mRNA의 전달을 초래한다.
- [1812] 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을, 하기와 같이 수여자 세포로의 명시된 mRNA를 전달하는 이의 능력에 대해 검정하였다. 이러한 특정 실시예에서, 푸소좀은 세포생물체(핵이 결여됨)였으며, 이를 Cre 및 GFP를 발현하는 3T3 마우스 섬유아세포 세포로부터 발생시켰다. 그 후에, 세포생물체를 HVJ-E 푸소좀 단백질로 처리하여, 푸소좀을 생성하였다.
- [1813] 수여자 마우스 대식세포 세포를 사용되는 이미징 시스템과 융화성인 세포 배양물 다중-웰 플레이트 내로 평판배양하였다(이 실시예에서 세포를 유리-바닥 이미징 디쉬에 평판배양하였음). 수여자 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-정지-LoxP-tdTomato" 카세트를 안정하게 발현하였으며, 이는 Cre에 의해 재조합 시 tdTomato 발현을 유도하고, 이는 수여자 세포로의 Cre 단백질의 전달을 나타낸다.
- [1814] 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하고 특정 푸소좀 단백질을 소유하는 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용하였다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있었다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 도왔다. 그 후에, 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, mRNA 전달을 이미징에 의해 평가하였다.
- [1815] 세포를 DMEM 배지 중 1 μ g/mL Hoechst 33342로 10분 동안 염색시킨 후, 이미징화하였다. 이 실시예에서, 세포를, 37°C 및 5% CO₂에서 유지시키는 한편 63x 오일 침지 대물렌즈를 갖는 Zeiss LSM 710 공초점 현미경 상에서 이미징화하였다. Hoechst를 405 nm 레이저 여기를 받게 하고, 방출을 밴드 통과 430~460 nm 필터를 통해 기록하였다. GFP를 488 nm 레이저 여기를 받게 하고, 방출을 밴드 통과 495 내지 530 nm 필터를 통해 기록하였다. tdTomato를 543 nm 레이저 여기를 받게 하고, 방출을 밴드 통과 560~610 nm 필터를 통해 기록하였다.
- [1816] 우선, 세포를 단일-핵화된(nucleated), tdTomato-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해 스캐닝하였다. tdTomato-양성 세포의 존재는 융합을 겪은 세포를 나타내었고, 단일 핵은 융합이 세포생물체 푸소좀 공여자에 의한 것임을 나타내었다. 이들 식별된 세포를 우선 이미징화하고, 그 후에, 후속적으로 GFP 형광을 부분적으로 퀀칭하기 위해 488 nm 레이저를 사용하여 광-표백시켰다. 그 후에, 세포를 시간 경과에 따라 이미징화하여, GFP 형광의 회수를 평가하였으며, 이는 새로운 GFP 단백질의 번역 및 따라서 공여자 푸소좀에 의해 전달된 GFP mRNA의 존재를 실증할 것이다.
- [1817] 관심 세포에서 Hoechst, GFP 및 tdTomato 형광의 분석을, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 수행하였다(Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007). 우선, 이미지를 60 μ m 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다.

광-표백된 세포 내에서, GFP 형광을 역치화하여, 백그라운드를 제거하였다. 그 후에, 광-표백된 세포에 대한 GFP 평균 형광 강도를 광-표백 이전 및 이후에 상이한 시점에서 분석하였다.

- [1818] 이러한 특정 실시예 내에서, Cre 및 GFP를 발현하고 적용된 푸소젠 HVJ-E(+푸소젠)을 보유하는 3T3 마우스 섬유아세포 세포생물체를, "LoxP-정지-LoxP-tdTomato" 카세트를 발현하는 수여자 마우스 대식세포 세포에 적용하였다. 대표적인 이미지 및 데이터를 도 5에 제시한다. 이러한 특정 실시예에 대해, GFP 형광 강도는 광-표백 후 10시간째에 원래 강도의 25%까지 회복되었으며, 이는 수여자 세포에서 활성적으로-번역된 mRNA의 전달을 나타낸다.
- [1819] 실시예 97: siRNA의 시험관내 전달
- [1820] 이 실시예는 시험관내에서 푸소좀을 통한 세포로의 짧은 간섭 RNA(siRNA)의 전달을 기재한다. 시험관내에서 세포로의 siRNA의 전달은 수여자 세포 내에서 단백질의 발현의 억제를 초래한다. 이는, 발현이 세포에 손상을 주는 단백질의 활성을 저해하여, 따라서 세포가 정상적으로 거동하는 것을 허용하는 데 사용될 수 있다.
- [1821] 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을 하기와 같이 수여자 세포로 명시된 siRNA를 전달하는 이의 능력에 대해 검정한다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 제조한다. 푸소좀의 생성 후, 상기 푸소좀을 구체적으로, GFP를 특이적으로 저해하는 서열을 갖는 siRNA를 이용하여 전기천공시킨다. GFP에 대항하여 표적화된 이중 가닥 siRNA의 서열은 5' GACGUAACGGCCACAAGUUC 3' 및 이의 보체 3' CGCUGCAUUGCCGGUGUUA 5'(siRNA 서열의 3' 말단에 2 염기쌍 길이의 오버행이 존재함을 주지함)이다. 음성 대조군 푸소좀을, 루시퍼라제를 특이적으로 저해하는 서열을 갖는 siRNA로 전기천공시킨다. 루시퍼라제에 대항하여 표적화된 이중 가닥 siRNA의 서열은 5' CUUACGCUGAGUACUUCGATT 3' 및 이의 보체 3' TTGAUUGCGACUCAUGAAGCU 5'(siRNA 서열의 3' 말단에 2 염기쌍 길이의 오버행이 존재함을 주지함)이다.
- [1822] 그 후에, 푸소좀을, GFP를 구성적으로 발현하는 수여자 세포에 적용한다. 상기 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 평판배양한다. 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, 발현 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용한다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 돕는다. 그 후에, 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 작용제 전달, siRNA를 이미징을 통해 평가한다.
- [1823] 세포를 필드 또는 웰 내 GFP-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해 이미지화한다. 이 실시예에서, 세포 플레이트를, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화한다(www.biotech.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 우선, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 주어진 웰 내 총 세포 집단을 결정한다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용된다. 염색 후, Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체한다.
- [1824] Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화한다. 우선, 비처리된 웰; 즉, 임의의 푸소좀으로 처리되지 않은 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 상이한 세포군의 이미지를 획득한다.
- [1825] GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정한다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화한다.
- [1826] GFP-양성 웰의 분석을, 형광 현미경이 구비된 소프트웨어 또는 다른 소프트웨어를 이용하여 수행한다(문헌 [Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007]). 이미지를 60 μ m 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공한다. 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정한다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 사용하여 역치를 설정하고, 너무 작거나 너무 큰 Hoechst-양성 세포를 배제한다.
- [1827] 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치를 설정하고, 전체 GFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 GFP-양성 세포를 식별한다. 총 세포 중에서 GFP-양성 세포의 퍼센트를 계산한다.
- [1828] 구현예에서, GFP에 대항한 siRNA를 함유하는 푸소좀으로 처리된 웰에서 GFP 양성 세포의 퍼센트는 루시퍼라제에

대향한 siRNA를 함유하는 푸소솜으로 처리된 웰에서 GFP 양성 세포의 퍼센트보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 적을 것이다.

[1829] 실시예 98: mRNA의 생체내 전달

[1830] 이 실시예는 생체내에서 푸소솜을 통한 세포로의 메신저 RNA(mRNA)의 전달을 기재한다. 일 구현예에서, 생체내에서 세포로의 mRNA의 전달은 수여자 세포 내에서 단백질의 발현을 초래한다. 일 구현예에서, 이러한 전달 방법을 사용하여, 유전자 돌연변이로 인해 존재하지 않는 단백질을 보충할 수 있으며, 이는 세포가 정상적으로 거동하거나 세포의 활성을 기능, 예를 들어 치료적 기능을 수행하도록 재지시(re-direct)하는 것을 허용할 수 있다.

[1831] 일 구현예에서, 생체내에서 푸소솜 DNA 전달은 유기체(마우스) 내에서 수여자 세포에서 메신저 RNA의 전달 및 단백질 발현을 실증한다.

[1832] 일 구현예에서, 간 지향 푸소솜을 발현하고 Cre를 발현하는 mRNA를 생성하는 푸소솜을 생체내 전달을 위해 제조한다.

[1833] 푸소솜을 본원에 기재된 바와 같이 제조한다. 푸소솜 현탁액은 원심분리를 받는다. 푸소솜의 펠렛을 주사용 멸균 포스페이이트 완충 식염수에 재현탁시킨다.

[1834] 푸소솜은 핵산 검출 방법, 예를 들어 PCR을 사용하여 mRNA를 발현하는 것으로 입증된다.

[1835] 수여자 마우스는 loxp-루시페라제 게놈 DNA 유전자좌를 가지며, 이러한 유전자좌는 푸소솜에 의해 전달된 mRNA로부터 만들어진 CRE 단백질에 의해 변형되어, 루시페라제(JAX#005125)의 발현을 차단하지 못한다. 이 실시예에 대한 양성 대조군은, 그 자체의 게놈으로부터 간에서 동일한 단백질을 독점적으로 발현하는 마우스 계통과 짝지어진 수여자 마우스의 자손이다(알부민-CRE JAX#003574). 이러한 짝지움으로부터의 자손은 각각의 대립유전자 중 하나를 갖는다(loxp-루시페라제, 알부민-CRE). 음성 대조군을, 푸소솜을 발현하지 않는 푸소솜 또는 푸소솜을 함유하지만 Cre DNA를 함유하지 않는 푸소솜을 수여자 마우스에게 주사함으로써 수행한다.

[1836] 푸소솜을 정맥내(IV) 꼬리 정맥 투여에 의해 마우스에게 전달한다. 마우스를 상업적으로 입수 가능한 마우스 구속기(Harvard 장치)에 놓는다. 구속시키기 전에, 이들 동물의 케이지를 순환하는 수조 상에 놓음으로써, 동물을 따뜻하게 한다. 구속기 내부에 있으면, 동물은 순응되도록 허용된다. 30G 바늘 팁, 3" 길이의 PE-10 튜빙, 및 28G 바늘로 구성된 IV 카테터를 준비하고, 해파린처리된 식염수로 플러싱한다. 꼬리를 70% 알코올 프랩 패드를 이용하여 세정한다. 그 후에, 카테터 바늘을 겹자로 고정시키고, 혈액이 튜빙 내에서 보이게 될 때까지 측면 꼬리 정맥 내로 서서히 도입한다. 푸소솜 용액(약 500 K 내지 5 M 푸소솜)을 1 cc 투베르쿨린 주사기 내로 흡인하고, 주입 펌프에 연결한다. 푸소솜 용액을 용량에 따라 1분 당 20 μ L의 속도로 30초 내지 5분 동안 전달한다. 주입의 완료 시, 카테터를 제거하고, 임의의 출혈이 중단될 때까지 압력을 주사 부위에 적용한다. 마우스를 이들의 케이지로 돌려 보내고, 회복되도록 허용한다.

[1837] 융합 후, mRNA는 수여자 세포질에서 CRE 단백질로 번역되고, 그 후에 이는 재조합을 수행하기 위해 핵으로 전좌하여, 루시페라제의 구성적 발현을 초래한다. D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)의 복강 내 투여는 생물발광의 생성을 통한 루시페라제 발현의 검출을 가능하게 한다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 콘 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓는다. 주사-후 8분 내지 20분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 생물발광의 최대를 관찰한다. 간의 특정 영역을 소프트웨어 및 수합 노출 시간 설정에서 생성하여, 계수율이 (이 영역에서) 600 초과가 되게 하여, 해석 가능한 레이디언스(광자/초/ cm^2 /스테라디안) 측정을 산출한다. 생물발광 레이디언스의 최대 값을 생물발광 분포의 이미지로서 기록한다. 간 조직을 구체적으로, 백그라운드(비처리된 동물) 및 음성 대조군보다 높은 레이디언스 측정에 대해 모니터링한다. 주사-후 24시간째에 측정을 수행하여, 루시페라제 활성을 관찰한다. 그 후에, 마우스를 안락사시키고, 간을 수합한다.

[1838] 신선하게 수합된 조직은 4°C에서 1 내지 3시간 동안 4% 파라포름알데하이드/0.1 M 소듐 포스페이이트 완충제 pH7.4에서의 침지를 통해 고정 및 포매를 받는다. 그 후에, 조직을 4°C에서 멸균 15% 수크로스/1xPBS에 (3시간 내지 밤새) 침지시킨다. 그 후에, 조직을 O.C.T.(Baxter No. M7148-4)에 포매시킨다. 조직을 박절용으로 적절한 블록(단면) 내에 배향시킨다. 그 후에, 조직을 하기 방법을 사용하여 액체 질소에서 냉동시킨다: 블록의 하부 1/3을 액체 질소 내에 놓고, O.C.T.의 중앙부를 제외한 모두가 냉동될 때까지 냉동되게 허용하고, 드라이 아이스 상에서 결로내려지도록 냉동을 허용한다. 블록을, 슬라이드 상에 놓인 5 내지 7 미크론 절편으로 크리오스타트에 의해 박절하고, 염색용으로 다시 냉동시킨다.

- [1839] 인 시추 혼성화를, 항-디곡시게닌 형광 항체에 의해 표지된 디곡시게닌 표지된 핵산 프로브(CRE mRNA 및 루시퍼라제 mRNA 검출을 위해)를 사용하여 조직 절편 상에서 (표준 방법을 사용하여) 수행하고, 공초점 현미경에 의해 관찰한다.
- [1840] 일 구현예에서, 양성 대조군 동물(푸소좀 주사 없이 출혈을 통해 제조함)은 비처리된 동물(CRE가 없고 푸소좀이 없음) 및 음성 대조군과 비교하여 간에서 생물발광 강도를 보여줄 것이다. 일 구현예에서, 푸소좀이 주사된 동물은 음성 대조군(예를 들어 푸소젠이 없는 푸소좀), 및 비처리된 동물과 비교하여 간에서 생물발광을 보여줄 것이다.
- [1841] 일 구현예에서, 푸소좀이 투여된 동물에서 조직 절편에서 mRNA의 검출은, 조직의 세포에서 음성 대조군 및 비처리된 동물과 비교하여 CRE 리컴비나제 및 루시퍼라제 mRNA의 검출을 드러낼 것이다. 일 구현예에서, 양성 대조군은 조직 전반에 걸쳐 루시퍼라제 mRNA와 CRE 리컴비나제 mRNA 둘 모두의 수준을 보여줄 것이다.
- [1842] 일 구현예에서, 푸소좀에 의한 mRNA 전달의 증거를, 동물의 수여자 조직에서 mRNA 및 이의 공동 위치화의 인 시추 혼성화-기반 검출에 의해 검출할 것이다. 일 구현예에서, mRNA로부터 발현된 단백질의 활성을 생물발광 이미징에 의해 검출한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 단백질 생성 및 활성을 초래할 mRNA를 전달한다.
- [1843] 실시예 99: 단백질의 시험관내 전달
- [1844] 이 실시예는 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합을 실증한다. 이 실시예에서, 시험관내에서 세포와의 푸소좀 융합은 수여자 세포로의 명시된 Cre 단백질의 전달을 초래한다.
- [1845] 이 실시예에서, 푸소좀을, 센다이 바이러스 HVJ-E 단백질을 보유하는 3T3 마우스 섬유아세포 세포로부터 발생시켰다(문헌[Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22(October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12]). 또한, 푸소좀은 Cre 리컴비나제를 발현하였다. 표적 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 일차 HEK293T 세포였으며, 이는 Cre에 의해 재조합 시 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다.
- [1846] 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 푸소좀을 하기와 같이 Cre 단백질을 수여자 세포로 전달하는 능력에 대해 검정하였다. 수여자 세포를 사용되는 이미징 시스템과 융화성인 세포 배양물 다중-웰 플레이트 내로 평판배양하였다(이 실시예에서 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트에 평판배양하였음). 다음, 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하고 특정 푸소젠 단백질을 소유하는 푸소좀을 DMEM 배지에서 수여자 세포에 적용하였다. 푸소좀의 용량은 웰에 평판배양된 수여자 세포의 수와 상관관계가 있었다. 푸소좀을 적용한 후, 세포 플레이트를 400 g에서 5분 동안 원심분리하여, 푸소좀과 수여자 세포 사이에서 접촉을 개시하는 것을 도왔다. 그 후에, 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 단백질 전달을 이미징을 통해 평가하였다.
- [1847] 세포를 필드 또는 웰 내 RFP-양성 세포 대 GFP-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해 이미지화하였다. 이 실시예에서, 세포 플레이트를, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다. 우선, 세포를 DMEM 배지 중 1 µg/mL Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 주어진 웰 내 총 세포 집단을 결정하였다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용된다. 염색 후 Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체하였다. Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 상이한 세포군의 이미지를 획득하였다. RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다.
- [1848] Hoechst, GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, Lion심장 FX이 구비된 Gen5 소프트웨어 또는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(문헌[Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007]). 우선, 이미지를 60 µm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 다음, 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 역치화하고, Hoechst-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치를 설정하고, 전체 GFP 및 RFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 GFP 및 RFP-양성 세포를 식별하였다.

- [1849] 수여자 세포만 함유하는 대조군 웰에서 식별된 RFP-양성 세포의 수를, (비-특이적인 Loxp 재조합을 차감시키기 위해) 푸소좀을 함유하는 웰 내 RFP-양성 세포의 수로부터 차감하는 데 사용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포 (Cre를 받은 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(Cre를 받지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, 수여자 세포 집단에 전달된 푸소좀 작용제의 분획을 정량화하였다.
- [1850] 이러한 특정 실시예 내에서, Cre를 발현하고 적용된 푸소젠 HVJ-E를 소유하는 3T3 마우스 섬유아세포 세포(+푸소젠) 또는 Cre를 발현하고 적용된 푸소젠 HVJ-E를 소유하지 않는 3T3 마우스 섬유아세포 세포(-푸소젠)를, "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하는 수여자 293T 세포에 적용하였다. Cre 단백질의 전달을 수여자 세포에서 RFP 발현의 유도에 의해 평가한다. 도 6에서 그래프는, Hoechst에 대해 양성으로 염색된 총 세포(각각의 쌍 중 가장 좌측의 막대) 중에서 RFP-양성 세포(각각의 쌍 중 가장 우측의 막대)의 정량화를 보여준다. 이러한 특정 실시예에 대해, 수여자 세포로의 푸소좀 전달의 분획은 HVJ-E 푸소젠을 소유하는 3T3 Cre 세포에 대해 0.44이다.
- [1851] 실시예 100: 단백질의 생체내 전달
- [1852] 이 실시예는 푸소좀에 의한 눈의 치료제의 전달을 기재한다.
- [1853] 푸소좀은 이전의 실시예에 기재된 임의의 방법을 사용하여 조혈모 줄기세포 및 전구 세포로부터 유래되고, 마우스 녹아웃에서 결핍된 단백질이 로딩된다.
- [1854] 푸소좀을, 단백질에 대해 결핍된 마우스의 우측 눈 내로 망막하 주사하고, 비히클 대조군을 마우스의 좌측 눈 내로 주사한다. 하위세트의 마우스를, 이들이 2월령에 도달할 때, 안락사시킨다.
- [1855] 수합된 망막 조직의 조직학 및 H&E 염색을 수행하여, 마우스의 각각의 망막에서 구제된 세포 수를 계수한다(문헌[Sanges et al., The Journal of Clinical Investigation, 126(8): 3104-3116, 2016]에 기재됨).
- [1856] 주사된 단백질의 수준을, 2월령제에 안락사시킨 마우스로부터 수합된 망막에서, PDE6B 단백질에 특이적인 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 측정한다.
- [1857] 일 구현예에서, 푸소좀을 투여한 마우스의 좌측 눈은, 비히클을 처리한 마우스의 우측 눈과 비교하여 망막의 외부 핵 수준에 존재하는 증가된 수의 핵을 가질 것이다. 증가된 단백질은 돌연변이화된 PDE6B 단백질의 보체화를 제안한다.
- [1858] 실시예 101: 수여자 DNA를 편집하기 위한 전달
- [1859] 이 실시예는 시험관내에서 세포로의 게놈 CRISPR-Cas9 편집 머시너리의 전달을 위한 푸소좀을 기재한다. 일 구현예에서, 시험관내에서 푸소좀을 통한 세포로의 게놈 CRISPR-Cas9 편집 머시너리의 전달은 수여자 세포에서 특이적인 단백질의 기능 손실을 초래한다. 이 실시예에서 지칭되는 게놈 편집 머시너리는 GFP에 특이적인 가이드 RNA(gRNA)와 보합체화된 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) Cas9 단백질이다.
- [1860] 일 구현예에서, 푸소좀은 치료제의 전달을 위한 틀이다. 일 구현예에서, 높은 특이성 및 효율로 세포에 전달될 수 있는 치료제, 예컨대 게놈 편집 머시너리는 유전자를 불활성화시키는 데 사용될 수 있을 것이고, 따라서, 높은 수준에서 발현되거나 잘못된 세포 유형으로 발현되는 경우 병리학적으로 되는 후속적인 유전자 생성물(예를 들어 단백질)을 불활성화시키는 데 사용될 수 있을 것이다.
- [1861] 푸소좀 조성물은, 푸소좀이 에이. 빅토리아(*A. Victoria*) EGFP의 서열에 특이적인 가이드 RNA(gRNA) 서열과 보합체화된 에스. 피오게네스 Cas9 단백질을 또한 포함하도록 조작되는 점을 제외하고는, 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된다. 이는, P2A 절단 서열에 의해 분리된, 에스. 피오게네스 Cas9의 오픈 리딩 프레임과 프레임 내 융합하는 네오마이신 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임을 갖는 PiggyBac 벡터를 공동-핵감염시킴으로써 달성된다. 부가적인 공동-핵감염된 PiggyBac 벡터는 또한, U6 프로모터에 의해 구동되는 gRNA 서열(GAAGTTCGAGGGCGACACCC)을 포함한다. 음성 대조군으로서 푸소좀은, 상기 푸소좀이, 마우스 게놈에서 임의의 표적에 비-특이적인 스크램블 gRNA(GCACTACCAGAGCTAACTCA) 서열과 보합체화된 에스. 피오게네스 Cas9 단백질을 포함하도록 조작된다.
- [1862] 충분한 수의 푸소좀을 20% 태아 소 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 48시간의 기간 동안 NIH/3T3 GFP+ 세포와 함께 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션한다. 48시간의 인큐베이션 후, 게놈 DNA를 제조하고, GFP 유전자에서 예측된 gRNA 절단 부위의 500 bp 내에서 영역에 특이적인 프라이머와 함께 주형으로서 사용한다(표 13 참조).

표 13. TIDE 분석을 위해 500 bp 단편을 증폭시키는 GFP 프라이머 서열

프라이머	서열
GFP-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC
GFP-R	GTCCTTTTACCAGACAACCATTAC

[1863]

[1864]

그 후에, PCR 앰플리콘을 정제하고, 모세관 시퀀싱에 의해 시퀀싱하고, 그 후에, 가이드 RNA에 의해 결정된 표적 유전자좌의 CRISPR-Cas9에 의해 게놈 편집을 신속하게 평가하는 Tide Calculator, 웹 툴에 업로딩한다. 2개의 표준 모세관 시퀀싱 반응으로부터의 정량적 서열 trace 데이터에 기초하여, 소프트웨어는 편집 효율을 정량화한다. GFP 유전자좌와 함께 예측된 gRNA 절단 부위에서 indel(삽입 또는 결실)은 세포에서 GFP 발현의 손실을 초래하고, 488 nm 아르곤 레이저 여기를 이용하는 FACS 분석을 사용하여 FACS에 의해 정량화하고(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), 방출을 c530+/-30 nm에서 수합한다. FACS 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용한다. 광 산란 채널을 선형 이득 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다. GFP 기능의 indel 및 후속적인 손실을 각각의 시료에서 GFP 신호의 강도에 기초하여 계산한다.

[1865]

일 구현예에서, 음성 대조군과 비교하여, 세포에서 GFP 유전자좌를 이용하여 예측된 gRNA 절단 부위에서의 indel(삽입 또는 결실) 및 GFP 형광의 손실은, 시험관내에서 DNA를 편집하고 단백질 기능의 손실을 초래하는 푸소좀의 능력을 나타낼 것이다. 일 구현예에서, 스크램블 gRNA 서열을 갖는 푸소좀은 단백질 기능의 indel 없음 또는 후속적인 손실을 실증할 것이다.

[1866]

실시예 102: 푸소좀의 투여 후 기형종 형성의 평가

[1867]

이 실시예는 푸소좀을 이용한 기형종 형성의 부재를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 대상체에게 투여 시, 기형종 형성을 초래하지 않을 것이다.

[1868]

푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 푸소좀, 종양 세포(양성 대조군) 또는 비히클(음성 대조군)을 마우스(12 내지 20주령)의 좌측 옆구리 내에 PBS에서 피하 주사한다. 기형종, 예를 들어 종양, 성장을 푸소좀, 종양 세포, 또는 비히클 주사 후 8주 동안 캘리퍼스(caliper) 측정에 의한 종양 용적의 결정에 의해 1주에 2 내지 3회 분석한다.

[1869]

일 구현예에서, 푸소좀 또는 비히클을 투여한 마우스는 캘리퍼스 측정을 통해 측정 가능한 종양 형성, 예를 들어 기형종을 갖지 않을 것이다. 일 구현예에서, 종양 세포로 처리되지 않은 양성 대조군 동물은 관찰 8주에 걸쳐 캘리퍼스에 의해 측정된 바와 같이, 인지 가능한 종양, 예를 들어 기형종, 크기를 실증할 것이다.

[1870]

실시예 103: 푸소좀은 생체내에서 대상체의 수여자 세포에게 활성 단백질을 전달한다

[1871]

이 실시예는, 푸소좀이 생체내에서 대상체에게 단백질을 전달할 수 있음을 실증한다. 이는 핵 편집 단백질 Cre의 전달에 의해 예시된다. 일단 세포의 내부에서 Cre는 핵으로 전좌되며, 이 핵에서 Cre는 2개의 LoxP 부위 사이에서 DNA를 조합하고 절제한다. 2개의 LoxP 부위 사이에서 DNA가 정지 코돈이고 원위부 형광 단백질, 예컨대 레드 형광 단백질 tdTomato의 업스트림에 있는 경우, Cre-매개 재조합을 현미경에 의해 측정할 수 있다.

[1872]

Takara(Cre 리컴비나제 Gesicles, Takara 제품 631449)로부터 구매된 CRE 및 푸소젠 VSV-G를 함유하는 푸소좀을 B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}/J 마우스(Jackson Laboratories strain 007909) 내로 주사하였다. 동물에게 표 14에 기재된 바와 같이 해부학적 위치, 주사 용적 및 주사 부위에서 주사하였다. tdTomato(FVB.129S6(B6)-GT(ROSA)26Sor^{tm1(Luc)Kael}/J, Jackson Laboratories strain 005125)를 갖지 않고 푸소좀을 주사한 마우스, 및 푸소좀을 주사하지 않은 B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J 마우스를 음성 대조군으로서 사용하였다.

표 14: 주사 매개변수

뇌	10 ul	전후축(anterior posterior axis): -2 측면/중상축: 1.8 복부(ventral): 1.5 면: 우측
눈	1 ul	유리체내
간	25 ul	전두엽의 중상부
비장	10 ul	길이방향과 폭방향 둘 모두에서 중상부에서 대략
신장	20 ul	좌측 신장의 중상부
소장 내벽(lining)	10 ul	복벽에 가장 가까운 소장의 루프를 복막 외부에서 단리하고, 내벽 내에 주사하였다.
심장	5 ul	정점 부근(near apex)
백색 지방 (부고환주위 지방 패드)	25 ul	좌측, 상부 및 중심
갈색 지방 (견갑골내)	25 ul	가능한 한 중심으로서 좌엽
폐	10 ul	아래엽 우측 폐 (inferior lobe right lung)
고환	10 ul	가능한 한 중심으로서 좌측 고환
난소	1 ul	가능한 한 중심으로서 좌측 난소

[1873]

[1874]

주사 후 2일째에, 동물을 안락사시키고, 시료를 수습하였다. 시료를 2% PFA에서 8시간 동안 고정시키고, 30% 수 크로스에서 밤새 고정시키고, OCT에서의 즉각적인 포매 및 슬라이드로의 박절을 위해 운송하였다. 슬라이드를 DAPI로 핵에 대해 염색하였다. DAPI 및 tdTomato 형광을 현미경에 의해 이미지화하였다.

[1875]

표 14에 열거된 모든 해부학적 부위는 tdTomato 형광을 실증하였다(도 9). 또한, 근육 조직으로의 전달을 tdTomato에 대한 형광 현미경을 사용하여 확인하였다(도 11). 음성 대조군 마우스는 tdTomato 형광을 갖는 임의의 조직을 갖지 않았다. 이 결과는, 푸소좀이 다양한 해부학적 부위에서 마우스의 세포에서 tdTomato 형광을 결 수 있고, 이는 마우스가 푸소좀으로 처리되지 않는 경우 또는 마우스가 이들의 계놈에 tdTomato를 갖지 않는 경 우에는 발생하지 않음을 실증한다. 따라서, 푸소좀은 생체내에서 활성 Cre 리컴비나제를 마우스 세포의 핵에 전 달한다.

[1876]

또한, 상이한 투여 경로가 생체 내에서 푸소좀을 조직에 전달할 수 있는 것으로 제시되었다. Takara(Cre 리컴비 나제 Gesicles, Takara 제품 631449)로부터 구매된 CRE 및 푸소젠 VSV-G를 함유하는 푸소좀을 FVB.129S6(B6)- *GT(ROSA)26Sor^{tm1(Luc)Kael}*/J(Jackson Laboratories 계통 005125) 내로 근육내(50 ul에서 우측 전경골 근육으로), 복강내(50 ul에서 복강으로), 및 피하(50 ul에서 등쪽 피부 하에) 주사하였다.

[1877]

영역을 화학적 제모제를 45초 동안 사용하고 뒤이어 물로 3회 헹굼으로써 제모하여, 다리, 복부면 및 등쪽 피부를 각각 근육내, 복강내 및 피하 주사를 위해 준비하였다.

[1878]

주사 후 제3일에, 생체내 이미징 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여, 생물발광의 전체 동물 이미지를 수득하였다. 이미징 전 5분째에, 루시페라제를 가시화하기 위해, 마우스는 150 mg/kg 용량의 생물발광 기질 (Perkin Elmer)의 복강내 주사를 받았다. 이미징 시스템을 보정하여, 모든 장치 세팅에 대해 보상하였다.

[1879]

모든 3개 경로에 의한 투여는 발광을 초래하였고(도 10), 이는 생체내에서 마우스로의 활성 Cre 리컴비나제의 성공적인 전달을 나타내었다.

[1880]

결론적으로, 푸소좀은 생체내에서 활성 단백질을 대상체의 세포에 전달할 수 있다.

[1881]

실시예 104: 푸소좀에서 핵산의 초음파처리-매개 로딩

[1882]

이 실시예는 초음파처리를 통한 푸소좀 내로의 핵산 페이로드의 로딩을 기재한다. 초음파처리 방법은 예를 들어 문헌[Lamichhane, TN, *et al.*, Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng*, (2016)]에 개시되어 있으며, 이의 전체 내용은 참조에 의해 본 명 세서에 포함된다.

- [1883] 푸소솜을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 10^6 푸소솜을 5 내지 20 μg 핵산과 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 푸소솜/핵산 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조(water bath) 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리한다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행한다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4℃에서 5분 동안 원심분리하여, 핵산을 함유하는 푸소솜을 펠렛화한다. 비혼입된 핵산을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시킨다. DNA 로딩 후, 푸소솜을 사용 전에 얼음 상에 유지시킨다.
- [1884] 실시예 105: 푸소솜에서 단백질의 초음파처리-매개 로딩
- [1885] 이 실시예는 초음파처리를 통한 푸소솜 내로의 단백질 페이로드의 로딩을 기재한다. 초음파처리 방법은 예를 들어 문헌[Lamichhane, TN, *et al.*, Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng*, (2016)]에 개시되어 있으며, 이의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [1886] 푸소솜을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 대략 10^6 푸소솜을 5 내지 20 μg 단백질과 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 푸소솜/단백질 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리한다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행한다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4℃에서 5분 동안 원심분리하여, 단백질을 함유하는 푸소솜을 펠렛화한다. 비혼입된 단백질을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시킨다. 단백질 로딩 후, 푸소솜을 사용 전에 얼음 상에 유지시킨다.
- [1887] 실시예 106: 푸소솜에서 핵산의 소수성 담체-매개 로딩
- [1888] 이 실시예는 소수성 담체를 통한 푸소솜 내로의 핵산 페이로드의 로딩을 기재한다. 소수성 로딩의 예시적인 방법은 예를 들어 문헌[Didiot *et al.*, Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing, *Molecular Therapy* 24(10): 1836-1847, (2016)]에 개시되어 있으며, 이의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [1889] 푸소솜을 이전의 실시예에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. RNA 분자의 3' 말단을 생물활성 소수성 공액체(트리에틸렌 글리콜-콜레스테롤)에 공액시킨다. 대략 10^6 푸소솜을, 37℃에서 90분 동안 500 rpm에서 셰이킹하면서 인큐베이션에 의해 PBS 중 10 $\mu\text{mol/l}$ 의 siRNA 공액체와 1 ml에서 혼합한다. 소수성 담체는 RNA와 푸소솜 막의 결합을 매개한다. 일부 구현예에서, 일부 RNA 분자는 푸소솜의 내강 내로 혼입되, 일부 RNA 분자는 푸소솜의 표면 상에 존재한다. 비로딩된 푸소솜을, TLA-110 로터를 사용하는 테이블탑 초원심분리기에서 4℃, 100,000g에서 1시간 동안의 초원심분리에 의해, RNA-로딩된 푸소솜으로부터 분리한다. 비로딩된 푸소솜은 상층액에 남아 있고, RNA-로딩된 푸소솜은 펠렛을 형성한다. RNA-로딩된 푸소솜을 사용 전에 얼음 상에 유지된 1 ml PBS에 재현탁시킨다.
- [1890] 실시예 107: 푸소솜의 가공
- [1891] 이 실시예는 푸소솜의 가공을 기재하였다. 이전의 실시예에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소솜을 추가로 가공시킬 수 있다.
- [1892] 일부 구현예에서, 푸소솜을 우선 예를 들어 초음파처리에 의해 균질화시킨다. 예를 들어, 초음파처리 프로토콜은, 8의 진폭 세팅에서 마이크로프로브(Instrumentation Associates, N.Y.)와 함께 MSE 초음파처리기를 사용하여 5초간의 초음파처리를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 단기간의 초음파처리는 푸소솜의 형질막이 균질한 푸소솜으로 분해되는 것을 유발하기에 충분하다. 이들 조건 하에, 세포소기관 막은 붕괴되지 않으며, 이들을 원심분리(3,000 rpm, 15분, 4℃)에 의해 제거한다. 그 후에, 푸소솜을 실시예 16에 기재된 바와 같이 분별 원심분리에 의해 정제한다.
- [1893] 상업적으로 입수 가능한 폴리카르보네이트 막(예를 들어 Sterlitech, Washington) 또는 프랑스 소재의 Pall Execia로부터 상업적으로 입수 가능한 비대칭성 세라믹 막(예를 들어 Membralox)을 통한 푸소솜의 압출은 푸소솜 크기를 상대적으로 잘 정의된 크기 분포까지 감소시키기에 효과적인 방법이다. 전형적으로, 요망되는 푸소솜 크기 분포를 달성할 때까지, 현탁액을 막을 통해 1회 이상 사이클(cycle)시킨다. 푸소솜을 연속적으로 더 작은

공극 막(예를 들어 400 nm, 100 nm 및/또는 50 nm 공극 크기)을 통해 압출시켜, 크기에서 점차적인 감소 및 균일한 분포를 달성할 수 있다.

[1894] 일부 구현예에서, 푸소좀 생성의 임의의 단계에서, 전형적으로 균질화, 초음파처리 및/또는 압출 단계 전이긴 하지만, 생성된 푸소좀이 약제학적 작용제를 캡슐화하도록 약제학적 작용제(예컨대 치료제)를 반응 혼합물에 첨가할 수 있다.

[1895] 실시예 108: 푸소좀 및 공급원 세포에서 총 RNA의 측정

[1896] 이 실시예는 공급원 세포에 비해 푸소좀에서 RNA의 양을 정량화하는 방법을 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 공급원 세포와 유사한 RNA 수준을 가질 것이다. 이 검정법에서, 총 RNA를 측정함으로써, RNA 수준을 결정한다.

[1897] 푸소좀을 이전의 실시예에서 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조한다. 푸소좀 및 공급원 세포의 단백질에 의해 측정된 바와 같이 동일한 질량의 조제물을 사용하여, 총 RNA(예를 들어 키트, 예컨대 Qiagen RNeasy 카탈로그 #74104를 사용함)를 분리하고, 뒤이어 RNA에 의한 흡광도를 평가하기 위해 표준 분광광도 방법을 사용하여 RNA 농도를 결정한다(예를 들어 Thermo Scientific NanoDrop).

[1898] 일 구현예에서, 푸소좀 내 RNA의 농도는 단백질 1 질량 당 공급원 세포의 RNA 농도의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%일 것이다.

[1899] 실시예 109. 외인성 푸소좀을 발현하는 HEK-293T 세포의 생성

[1900] 이 실시예는 외인성 푸소좀을 발현하는 조직 배양 세포의 생성을 기재한다. 푸소좀 유전자, VSV-G(수포성 구내염 바이러스 G-단백질)를 pcDNA3.1 벡터(ThermoFisher) 내로 클로닝하였다. 그 후에, VSV-G 구축물을 Xfect 형질감염 시약 (Takara)을 사용하여, HEK-293T 세포 (ATCC, Cat# CRL-3216) 내로 형질감염시켰다. 형질감염된 HEK-293T 세포를 37°C, 5% CO₂에서, 글루타맥스(GIBCO), 10% 태아 소 혈청(GIBCO) 및 페니실린/스트렙토마이신 항생제(GIBCO)가 보충된 둘베코스 모디파이드 이글 배지(DMEM)에서, 추가의 실험에 이용하기 전에 적절한 기간 동안 배양하였다.

[1901] 실시예 110. 단백질 증강된 푸소좀 제핵 세포를 통한 미토콘드리아의 전달

[1902] 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 미토콘드리아-표적화된 DsRED 형광 단백질(mtDsRED)을 발현시킴으로써 단백질-증강된 HeLa 세포를 포함하는 푸소좀 제핵 세포를 발생시켰다. VSV-G를 발현하는 HeLa 세포를 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 제핵시켜, 제핵 세포를 수득하였다(예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같음). 수여자 세포는, 잘시타빈(zalcitabine), 뉴클레오사이드 유사체 리버스 트랜스크립타제 저해제에서 HeLa 세포의 장기간(>6주) 배양에 의해 미토콘드리아 DNA (mtDNA)가 결여되도록 생성되었던 HeLa Rho0 세포였다. HeLa Rho0 세포는 mtDNA가 결핍되어 있고(qPCR에 의해 평가된 바와 같음), 유의하게 결핍된 미토콘드리아 산소 소모율을 보여준다(Seahorse 세포의 유속 검정법에 의해 측정된 바와 같음). 수여자 HeLa Rho0 세포를 또한, 2일 동안 아데노바이러스 전달을 통해 미토콘드리아-표적화된 GFP(mtGFP)를 발현하도록 조작하였다.

[1903] 수여자 HeLa Rho0 세포를 6-웰 디쉬 내로 평판배양하고, 1시간 후에, 제핵 VSV-G HeLa 세포를 수여자 세포에 적용하였다. 그 후에, 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를, BD FACS Aria SORP 세포 소터를 사용한 형광-보조 세포 소팅을 통해 이중-양성 (융합된) 세포에 대해 소팅하였다. 제핵 VSV-G HeLa 세포로부터 미토콘드리아 공여(mtDsRED)를 받았던 수여자 HeLa Rho0 세포를 소팅하기 위해, mtGFP 및 mtDsRED에 대해 이중-양성인 세포 집단을 평가하였다. mtGFP를 488 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 513 ± 26 nm에서 방출을 포착하였다. mtDsRED를 543 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 570 ± 26 nm에서 방출을 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 세포-크기의 사건을 포착하고 작은 데브리스를 폐기하였다. 각각의 적절한 음성 대조군 시료가 특이적인 형광 마커에 대한 <1%의 양성 사건을 보여준(즉, 비-염색된 및 단일-mtGFP-양성 시료는 mtDsRED에 대해 <1%의 양성 사건을 보여준) 최소 수준에서 게이팅함으로써 mtGFP 및 mtDsRED에 대해 이중-양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, 이중-양성 사건, 뿐만 아니라 단일-양성 mtGFP(미토콘드리아 전달이 없는 수여자 세포) 및 단일-양성 mtDsRED(수여자 세포와 융합되지 않은 공여자 제핵 VSV-G HeLa 세포) 사건을 10% FBS 및 항생제를 갖는 DMEM 배지 내로 소팅하였다. 소팅된 세포를 계수하고, 96-웰 Seahorse 플레이트(Agilent)에서 1개 웰 당 25,000개의 세포(각각의 그룹에 대해 6벌 중복)로 접종하였다. 상기 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

- [1904] 성장 배지를 제거하고, 25 mM 글루코스 및 2 mM 글루타민(Agilent)을 함유하는 저-완충 DMEM 최소 배지로 대체하고, 상기 마이크로플레이트를 37°C에서 60분 동안 인큐베이션하여, 온도 및 pH 평형을 허용함으로써, 산소 소모율 검정법을 개시하였다. 그 후에, 접착성 세포 바로 주변에서 배지 내 산소의 세포의 유속 변화 및 pH의 세포의 변화를 측정하는 XF96 세포의 유속 분석기(Agilent)에서 상기 마이크로플레이트를 검정하였다. 정상 상태 산소 소모율 및 세포의 산성화 속도를 측정한 후, ATP 신타제를 저해하는 올리고마이신(5 μ M) 및 미토콘드리아를 언커플링시키는 양성자 이오노포어 FCCP(카르보닐 시아나이드 4-(트리플루오로메톡시) 페닐하이드라존; 2 μ M)를 마이크로플레이트의 각각의 웰에 시약 전달 챔버를 통해 순차적으로 주사하여, 최대 산소 소모율 값을 획득하였다. 최종적으로, 5 μ M 안티마이신 A(미토콘드리아 복합체 III의 저해제)를 첨가하여, 호흡 변화가 주로 미토콘드리아 호흡으로 인한 것임을 확인하였다. 안티마이신 A 호흡율을 다른 3개의 호흡율로부터 차감시켜, 기저 미토콘드리아 호흡율, 언커플링(올리고마이신-내성) 미토콘드리아 호흡율 및 최대(FCCP-유도) 미토콘드리아 호흡율을 결정하였다.
- [1905] 이 검정법을 사용하여, 공여자 VSV-G HeLa 세포는 활성 기저 산소 소모율 및 최대 산소 소모율을 보여준 한편, 전달이 없는 표적 세포는 모든 3개의 상태의 미토콘드리아 산소 소모율을 낮은 속도로 보여준 것으로 결정되었다. 수여자 HeLa Rho0 세포의 단백질-증강된, 제핵 VSV-G HeLa 세포와 함께 미토콘드리아의 전달은 공여자 VSV-G HeLa 세포와 근처의 미토콘드리아 산소 소모율까지 복귀를 보여주었다(도 12).
- [1906] 실시예 111: 소낭 형성 및 원심분리를 통한 푸소좀의 발생 및 단리
- [1907] 이 실시예는 소낭화 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생 및 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 단리되는 방법 중 하나이다. 푸소좀을 하기와 같이 제조하였다. 100 mm 콜라겐 코팅된 디쉬(Corning)에서 7.5 mL의 완전 배지(글루타맥스(ThermoFisher), 10% 태아 소 혈청(ThermoFisher) 및 페니실린/스트렙토마이신 항생제(ThermoFisher)가 보충된 둘베코스 모디파이드 이글 배지(DMEM))에서 SV40 핵 위치화 서열과 함께 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 15 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드 및 VSVg에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 10 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드를 함유하는 Xfect 형질감염 시약(Takara, Cat# 631317)을 사용하여, 9.2×10^6 HEK-293T(ATCC, Cat# CRL-3216)를 역(reverse) 형질감염시켰다. 접종 후 12시간째에, 배지를 흡인하고, 100 μ M ATP(Sigma)가 보충된 15 mL의 신선한 완전 배지로 조심스럽게 대체하였다. 그 후에, 상층액을 형질감염 후 48시간째에 수합하고, 원심분리(2000xg, 10 mins)에 의해 정제하고, 0.45 μ m PES 필터(CellTreat)를 통해 여과하고, 120,000 x g에서 1.5시간 동안 초원심분리하였다. 그 후에, 펠렛화된 물질을 50% 1xPBS/50% 완전 배지의 얼음 냉각된 혼합물에서 재현탁시키고, 2분 동안 최대 속도에서 보텍싱하고, 추가의 실험에 이용할 때까지 -80°C에서 냉동시켰다.
- [1908] 실시예 112: 거대 형질막 푸소좀의 발생 및 단리
- [1909] 이 실시예는 세포성 소낭화 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생, 로딩 및 단리를 기재한다. 이는 푸소좀이 발생되고, 단리되고, 적재물이 로딩될 수 있는 방법 중 하나이다.
- [1910] 푸소좀을 하기와 같이 제조하였다. 100 mm 콜라겐 코팅된 디쉬에서 7.5 mL의 완전 배지(DMEM + 10% FBS + 1x Pen/Strep)에서 SV40 핵 위치화 서열과 함께 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 15 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드 및 VSVg에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 10 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드를 함유하는 중합체성 형질감염 시약을 사용하여, 9.2×10^6 HEK-293T를 역 형질감염시켰다.
- [1911] 적재물-로딩된 푸소좀을 생성하기 위해, 형질감염 후 24시간째에, 세포를 세척 완충제(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂)에서 2회 세척하고, 형성 완충제 (10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 25 mM PFA, 2 mM DTT, 125 mM glycine)에서 1회 세척하였다. 그 후에, 세포를 형성 완충제에서 37°C에서 최소 6시간 동안 인큐베이션하였다. 푸소좀을 함유하는 상층액을 수합하고, 그 후에, 2,000 x g에서 5분간의 원심분리를 통해 푸소좀을 세포 및 세포 debris로부터 정제하였다. 최종적으로, 푸소좀을 17,000 x g에서 20분간의 원심분리를 통해 농축시키고, 실험을 위해 요망되는 완충제에 재현탁시켰다. 푸소좀이 수여자 세포와 융합하고 이들 푸소좀의 적재물을 전달할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, 재현탁된 푸소좀을 요망되는 용량에서 수여자 293T LoxP 그린/Red 스위치 리포터 세포에 첨가하였다. 소낭 융합 및 적재물 전달을 입증하기 위해, 수여자 세포의 LoxP 재조합을 자동화된 형광 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotech.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 시야에서 RFP-양성 세포를 양성적으로 식별하기 위해, 우선, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342를 이용하여 10분 동안 염색함으로써, 각각의 웰 내의 총 세포 집단을 결정하였다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서

개별적인 세포를 식별하는 데 사용될 수 있다. 염색 후, Hoechst 배지를 정기적인 DMEM 배지로 대체하고, RFP+ 세포를 식별하였다.

[1912] Hoechst 염색을, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 비처리된 웰; 즉, 임의의 푸소솜으로 처리되지 않은 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 상이한 세포 그룹의 이미지를 획득하였다. RFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다.

[1913] RFP-양성 웰의 분석을, 형광 현미경이 구비된 Gen 5 소프트웨어(BioTek)를 이용하여 수행하였다. 이미지를 10 μ m 폭 (Hoechst 33342), 20 μ m 폭 (RFP)을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 총 세포 마스크를 Hoechst-양성 세포 상에서 설정하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 Hoechst 강도를 갖는 세포를 역치화하고, Hoechst-양성 세포이기에 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다.

[1914] 총 세포 마스크 내에서, 백그라운드보다 유의하게 높은 세포에 대해 다시 역치화하고, 전체 RFP 세포성 형광을 포함시키기 위해 전체 세포 영역에 대한 Hoechst(핵) 마스크를 배제함으로써 RFP-양성 세포를 식별하였다. 1개 시야 당 전체 중에서 RFP-양성 세포의 총 수를 계산하였다. 일 구현예에서, 푸소솜 처리된 수여자 세포는 비-처리된 세포보다 1개 시야 당 더 많은 RFP+ 세포를 가졌다(도 13).

[1915] 실시예 113: 압출을 통한 푸소솜의 발생

[1916] 이 실시예는 막을 통한 압출에 의해 제조되는 푸소솜을 기재한다.

[1917] VSV-G 및 Cre 리컴비나제를 발현하는 HEK293T 세포를 TrypleE로 트립신처리하고, 수합하고, 500xg에서 5분 동안 회전시키고, 계수하였다. 후속적으로, 30×10^6 세포를 500 nM 라트룬쿨린 B가 보충된 DMEM 배지 중 1 ml의 12.5% 피콜에 37°C에서 30분 동안 재현탁시켰다. 세포를 제핵시키기 위해, 이들을 하기 피콜 분획(상부로부터 하부까지)로 구성된 불연속 피콜 구배로 이송하였다: 5 mL 12.5% 피콜, 6 mL 16% 피콜, 10 mL 18% 피콜. 모든 피콜 구배 분획을 500 nM 라트룬쿨린 B가 보충된 DMEM 배지에서 제조하였다. 상기 구배를 Ti-70 로터가 있는 Beckman SW-40 초원심분리기 상에서 32,300 RPM, 37°C에서 1시간 동안 회전시켰다. 원심분리 후, 제핵 HEK293T 세포를 12.5% 피콜 층과 16% 피콜 층 사이의 구배로부터 수합하고, PBS로 희석시키고, 3,000xg에서 5분 동안 회전시켰다. 그 후에, 제핵 세포를 1 ml의 PBS에 재현탁시켰다.

[1918] 간략하게는, 압출을 위해, 푸소솜 제핵 HEK293T 세포를 PBS에서 비신초닌산 검정법에 의해 검정된 바와 같이 1~5 mg/mL 단백질 밀도까지 재현탁시켰다. 상기 세포를 1 mL 기밀(gas-tight) 주사기를 이용하여 흡인하고, 5 μ m, 0.8 μ m, 또는 0.4 μ m 막에 1 내지 20회 통과시켰다. 여과물을 수합하고, loxP:GFP/RFP 리포터 구축물을 안정하게 발현하는 HEK293T 세포를 함유하는 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 16~24시간 후, 상기 플레이트를 이미지화하고, RFP의 발현에 대해 분석하였다(도 14).

[1919] 실시예 114: 세포로부터 자유롭게 방출되는 푸소솜 미세소낭의 단리

[1920] 이 실시예는 세포로부터 자유롭게 방출되는 푸소솜 미세소낭의 단리를 기재한다. 푸소솜 미세소낭을 하기와 같이 단리하였다. 100 mm 콜라겐 코팅된 디쉬(Corning)에서 7.5 mL의 완전 배지(글루타맥스(ThermoFisher), 10% 태아 소 혈청(ThermoFisher) 및 페니실린/스트렙토마이신 항생제(ThermoFisher))가 보충된 돌베코스 모디파이드 이글 배지(DMEM))에서 SV40 핵 위치화 서열과 함께 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 15 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드 및 VSVg에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 10 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드를 함유하는 Xfect 형질감염 시약(Takara, Cat# 631317)을 사용하여, 9.2×10^6 HEK-293T(ATCC, Cat# CRL-3216)를 역 형질감염시켰다. 접종 후 12시간제에, 부가적인 7.5 mL의 완전 배지를 조심스럽게 첨가하였다. 세포를 200 x g에서 10분 동안의 원심분리에 의해 배양 배지로부터 분리하였다. 상층액을 수합하고, 500 x g에서 10분 동안 2회, 2,000 x g에서 15분 동안 1회, 10,000 x g에서 30분 동안 1회, 및 70,000 x g에서 60분 동안 1회 순차적으로 원심분리하였다. 자유롭게 방출되는 푸소솜을 최종 원심분리 단계 동안에 펠렛화하고, PBS에 재현탁시키고, 70,000 x g에서 재펠렛화시켰다. 최종 펠렛을 PBS에 재현탁시켰다.

[1921] 또한, 문헌[Wubbolts R *et al.* Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: Potential Implications for their Function and Multivesicular Body Formation. *J. Biol. Chem.* 278:10963-10972 2003]을 참조한다.

[1922] 실시예 115: 푸소좀에서 전사 활성의 결여

[1923] 이 실시예는 푸소좀 발생에 사용되는 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서 전사 활성의 정량화를 기재한다. 전사 활성은 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서 낮거나 부재할 수 있다.

[1924] 푸소좀을 치료제의 전달을 위한 틀로서 사용할 수 있다. 세포 또는 국소 조직 환경에 고효율로 전달될 수 있는 치료제, 예컨대 miRNA, mRNA, 단백질 및/또는 세포소기관을 사용하여, 수여자 조직에서 정상적으로 활성이 아니거나, 병리학적으로 낮거나 높은 수준에서 활성인 경로를 조정할 수 있을 것이다. 푸소좀이 전사를 할 수 없거나, 푸소좀이 이들의 부모 세포보다 적은 전사 활성을 가질 수 있다는 관찰은, 핵 물질의 제거가 충분히 발생하였음을 실증할 수 있다.

[1925] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 제조하였다. 대조군 입자(비-푸소젠 푸소좀)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 푸소좀의 전사 활성을, Click-iT EU 이미징 키트(ThermoFisher)를 사용함으로써 푸소좀 발생에 사용된 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하였다.

[1926] 간략하게는, 푸소좀을 발생시키는 데 사용된 1×10^6 부모 세포 및 60 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 3×10^6 푸소좀을 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안, 1 mM 형광-태깅 가능한 알킨-뉴클레오사이드 EU를 함유하는 완전에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트 내 1 mL의 완전 배지에서 3벌 중복하여 평판배양하였다. 음성 대조군의 경우, 3×10^6 푸소좀을 알킨-뉴클레오사이드 EU가 없는 완전 배지에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트에 평판배양하였다. 4시간 인큐베이션 후, 시료를 제조업체의 설명서(ThermoFisher Scientific)에 따라 가공하였다. 간략하게는, 음성 대조군을 포함하는 세포 및 푸소좀 시료를 1xPBS 완충제로 3회 세척하고, 1xPBS 완충제에 재현탁시키고, 하기 표에서 제시된 바와 같이, 여기를 위해 488 nm 아르곤 레이저 및 530+/-30 nm 방출을 사용하여 유세포분석(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의해 분석하였다:

[1927] 유세포분석기 세팅

염료	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
AF488	BL1	488	530/30

[1928]

[1929] Attune NxT 소프트웨어를 획득에 사용하였고, FlowJo를 분석에 사용하였다. 데이터 획득을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 530+/-30 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 세포 또는 푸소좀 게이트 내의 최소 10,000 사건을 각각의 조건에 대해 수합하였다. 데이터 분석을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 530+/-30 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 음성 대조군 530+/-30 nm 방출을 사용하여, 게이트를 히스토그램 상의 어디에 놓는지 결정하였으며, 따라서 이는 상기 게이트가 1% 미만의 양성을 포함하였다. 상기 열거된 분석 기준을 사용하여, 부모 세포는 새로 전사하는 mRNA 전사체에 EU를 포함시킴으로써 전사 활성의 대리 측정치로서 $99.17\% \pm 0.20$ Eu:AF488 사건을 실증하였고, 여기서, 푸소좀은 $70.17\% \pm 7.60$ AF488 사건을 실증하였다(도 14b). 따라서, AF488의 중앙 값 형광 강도, 및 얼마나 많은 Eu가 혼입되었는지에 대한 측정치, 따라서 얼마나 많은 새로 합성된 mRNA 전사체에 대한 측정치는 부모 세포에 대해 9867 ± 3121 사건이고 푸소좀에 대해 1883 ± 366.3 이었다(도 14b). 실시예는, 푸소좀이 부모 세포에 비해 전사 활성이 결여되어 있음을 실증한다.

[1930] 실시예 116: DNA 복제 또는 복제 활성의 결여

[1931] 이 실시예는 푸소좀 발생에 사용되는 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서 DNA 복제 활성의 정량화를 기재한다. DNA 복제 활성은 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하여 푸소좀에서 낮거나 부재할 수 있다.

[1932] 푸소좀을 치료제의 전달을 위한 틀로서 사용할 수 있다. 세포 또는 국소 조직 환경에 고효율로 전달될 수 있는 치료제, 예컨대 miRNA, mRNA, 단백질 및/또는 세포소기관을 사용하여, 수여자 조직에서 정상적으로 활성이 아니거나, 병리학적으로 낮거나 높은 수준에서 활성인 경로를 조정할 수 있을 것이다. 푸소좀이 DNA 복제를 할 수 없거나, 푸소좀이 이들의 부모 세포보다 적은 DNA 복제 활성을 가질 수 있다는 관찰은, 핵 물질의 제거가 충분히 발생하였음을 실증할 수 있다.

[1933] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 제조하였다. 대조군 입자(비-푸소젠 푸소좀)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 푸소좀의 번역 활성을, Click-iT EU 이미징 키트(ThermoFisher)를 사용함으로써 푸소좀 발생에 사용된 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하였다.

[1934] 간략하게는, 푸소좀을 발생시키는 데 사용된 1×10^6 부모 세포 및 60 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 3×10^6 푸소좀을 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안, 1 mM 형광-태깅 가능한 알킨-뉴클레오사이드 EU를 함유하는 완전에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트 내 1 mL의 완전 배지에서 3벌 중복하여 평판배양하였다. 음성 대조군의 경우, 3×10^6 푸소좀을 알킨-뉴클레오사이드 EU가 없는 완전 배지에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트에 평판배양하였다. 4시간 인큐베이션 후, 시료를 제조업체의 설명서(ThermoFisher Scientific)에 따라 가공하였다. 간략하게는, 음성 대조군을 포함하는 세포 및 푸소좀 시료를 1xPBS 완충제로 3회 세척하고, 1xPBS 완충제에 재현탁시키고, 하기 표에서 제시된 바와 같이, 여기를 위해 638 nm 레이저 및 670+/-14 nm 필터 방출을 사용하여 유세포분석(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의해 분석하였다:

[1935] 유세포분석기 세팅

염료	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
AF47	RL1	638	670/14

[1936]

[1937] Attune NxT 소프트웨어를 획득에 사용하였고, FlowJo를 분석에 사용하였다. 데이터 획득을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 670+/-14 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 세포 또는 푸소좀 게이트 내의 최소 10,000 사건을 각각의 조건에 대해 수합하였다. 데이터 분석을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 670+/-14 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 음성 대조군 670+/-14 nm 방출을 사용하여, 게이트를 히스토그램 상의 어디에 놓는지 결정하였으며, 따라서 이는 상기 게이트가 1% 미만의 양성을 포함하였다. 상기 열거된 분석 기준을 사용하여, 부모 세포는 새로 합성되는 DNA에 Eu를 포함시킴으로써 번역 활성의 대리 측정치로서 56.17% $\pm$ 8.13 Edu:647 사건을 실증하였고, 여기서, 푸소좀은 6.23% $\pm$ 4.65 AF488 사건을 실증하였다(도 14c). 따라서, AF647의 중앙값 형광강도, Eu 혼입 측정치, 및 따라서 새로 합성된 DNA의 측정치는 부모 세포에 대해 1311 $\pm$ 426.2이고, 푸소좀에 대해 116.6 $\pm$ 40.74이었다(도 14c). 이러한 실시예는, 푸소좀이 부모 세포에 비해 DNA 복제 활성이 결여됨을 실증한다.

[1938] 실시예 117: 지질 이중층 구조를 갖는 푸소좀

[1939] 이 실시예는 푸소좀의 조성물을 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀 조성물은 중앙부에 내강이 있는 지질 이중층 구조를 포함한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 푸소좀의 지질 이중층 구조는 표적 세포와의 융합을 촉진하고, 푸소좀이 상이한 치료제를 로딩하는 것을 허용한다.

[1940] 푸소좀을 이전의 실시예에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 293F 세포의 일시적인 형질감염, 뒤이어 상기 형질감염 후 48시간째에 조건화된 배지의 여과 및 초원심분리에 의해 제조하였다. 각각의 시료에 대해, 엑소좀 스피ن 컬럼(Invitrogen #4484449)을 제조업체의 설명서에 따라 이용하여 저분자량 오염물을 제거하였다. Amicon Ultra 0.5 mL 원심분리 필터 Ultracel 100K 100,000 NMWL 단위 (Millipore #UFC510024)를 사용하여, 큰 단백질 제거, 탈염 및 완충제 교환을 수행하였다. 푸소좀을 PBS에서 재구성하였다. 1개 시료 당 3개의 홀리 카본 그리드(holy carbon grid)(전자 현미경 서비스 #Q2100CR1.3)를 25초 동안 글로우 방전시켜, 표면을 친수성으로 만들었다. 시료를 간략하게 보텍싱하고, 3 μ L의 푸소좀을 각각의 그리드의 상부에 놓고, 1-2분 동안 인큐베이션하였다. Gatan Cryoplunge3 반자동화된 플런지(plunge)-냉동 장비를 제조업체의 설명에 따라 사용하여, 푸소좀을 플런지-냉동시켰다. 냉동된 수화 그리드를 FEI Tecnai Arctica Cryo-TEM의 크리오 트랜스퍼 홀더(cryo transfer holder) 내로 로딩하였다. 그 후에, 푸소좀을 저용량 검색 모드에서 스캐닝하고, 23,500X 및 39,000X 배율에서 200 kV에서 이미지화하였다(도 15).

[1941] 실시예 118: 푸소젠 발현의 검출

[1942] 이 실시예는 푸소좀에서 푸소젠의 정량화 발현을 기재한다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 10 cm 디쉬에서 VSV-G, Cre 리컴비나제 및 miRFP670을 이용한 HEK293T의 일시적인 형질감염, 뒤이어 상기 형질감염 후 48시간째에 조건화된 배지의 여과 및 초원심분리에 의해 제조하여, 푸소좀을 수득하였다. 양성 대조군은 비가공된 일시

적으로 형질감염된 293T 세포였다. 음성 대조군은 비형질감염된 293T 세포였다.

- [1943] 푸소좀을 RIPA 완충제를 이용하여 용해시키고, 15,000 x g에서 10분 동안 원심분리하고, 그 후에 단백질을 상층액으로부터 회수하였다. 시료를 4~12% 비스-Tris 변성 SDS-PAGE 겔 상에서 진행시키고, 그 후에 PVDF 막으로 이송하였다. 각각의 막을 PBS 중 3% BSA + 0.1% 트리톤 X-100에서 30 k분 동안 블라킹시켰다. 그 후에, 막을, 블라킹 용액 내 항-VSVG 태그(ab1874, Abcam, Cambridge, MA) 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하고, PBS 중 0.1% 트리톤 X-100으로 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 그 후에, 상기 막을 블라킹 용액 중 HRP-공액 2차 항체(#7074P2, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA)와 함께 4℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. HRP 기질을 첨가하고, 화학발광 신호를 알파 Innotech MultiImage3에 의해 기록하였다(도 16).
- [1944] 실시예 119: 푸소좀의 평균 크기의 측정
- [1945] 이 실시예는 푸소좀의 평균 크기의 측정을 기재한다.
- [1946] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 HEK293T의 일시적인 형질감염, 제핵, 및 피콜을 이용한 후속적인 분획화에 의해 제조하였다. 푸소좀을 측정하여, 서브미크론(Nanosight NS300, Malvern Instruments) 및 수프라-미크론(Zeiss 780 Inverted Laser Confocal, Zeiss) 측정을 위한 상업적으로 입수 가능한 시스템을 사용하여 평균 크기를 결정하였다. 각각의 시스템을 소프트웨어와 함께 제조업체의 설명에 따라 사용하였다. 푸소좀 및 부모 세포를 PBS에 재현탁시키고, 1 μ M의 칼세인AM으로 대략 1 mg 단백질/mL의 최종 농도까지 염색하였다. 그 후에, 푸소좀 및 부모 세포를 PBS에서 100배 희석시킨 후, 측정하였다. Nanosight NS300 상에서의 서브-미크론 측정을 위해, 도 17a에 제시된 매개변수를 사용하였다. 780 도립 공초점 현미경(도립 공초점 현미경) 상에서의 수프라-미크론 측정을 위해, 도 17b에 제시된 매개변수를 사용하였다.
- [1947] 모든 푸소좀을 8시간의 단리 이내에 분석하였다. 입자 <500 nm에 대한 측정을 NTA로부터 취하고, Zeiss 현미경으로부터 입자 $\geq$ 500 nm에 대한 측정에 첨가하여, 50 내지 20,000 nm로부터의 완전 측정을 수득하였다. 푸소좀 및 부모 세포의 크기 분포를 도 17c에 제시한다. 모든 입자의 분포의 평균을 내어, 도 17d에 제시된 바와 같이 푸소좀의 평균 크기를 수득하였다. 푸소좀은 부모 세포보다 작은 크기를 가질 수 있는 것으로 간주된다. 푸소좀은 약 73%의 부모 세포 내에서 크기를 가질 수 있는 것으로 간주된다.
- [1948] 실시예 120: 푸소좀의 평균 크기 분포의 측정
- [1949] 이 실시예는 푸소좀의 크기 분포의 측정을 기재한다.
- [1950] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 HEK293T의 일시적인 형질감염, 제핵, 및 피콜을 이용한 후속적인 분획화에 의해 제조하였다. 푸소좀을 측정하여, 도 18에 제시된 바와 같이 실시예 30의 방법을 사용하여 크기 분포를 결정하였다. 푸소좀은 90% 이내의 시료의 크기 분포에서 부모 세포의 가변성의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 미만보다 적게 가질 수 있는 것으로 간주된다. 푸소좀은 90%의 시료 내에서 크기 분포에서 부모 세포의 가변성의 58% 미만을 가질 수 있는 것으로 간주된다.
- [1951] 실시예 121: 푸소좀의 평균 용적
- [1952] 이 실시예는 푸소좀의 평균 용적의 측정을 기재한다. 푸소좀의 크기(예를 들어 용적)의 다양화는, 이들 푸소좀을 별개의 적재물 로딩, 치료제 설계 또는 적용에 다재다능하도록 만들 수 있다.
- [1953] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 HEK293T의 일시적인 형질감염, 제핵, 및 피콜을 이용한 후속적인 분획화에 의해 제조하였다. 양성 대조군은 HEK293T 세포였다.
- [1954] 실시예 30에 기재된 바와 같이 NTA와 공초점 현미경의 조합을 이용한 분석을 사용하여, 푸소좀의 크기를 결정하였다. 도 19에 제시된 바와 같이, 푸소좀의 직경을 측정하고, 용적을 계산하였다. 푸소좀은 50 nm 직경보다 큰 평균 크기를 가질 수 있는 것으로 간주된다. 푸소좀은 129 nm의 직경의 평균 크기를 가질 수 있는 것으로 간주된다.
- [1955] 실시예 122: 푸소좀에서 세포소기관 함량의 측정
- [1956] 이 실시예는 푸소좀에서 세포소기관의 검출을 기재한다.
- [1957] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 HEK293T 세포의 일시적인 형질감염, 제핵, 및 피콜을 이용한 후속적인 분획화에 의해 제조하였다. 소포체(ER), 리소좀 및 미토콘드리아의 검출을 위해, 푸소좀 또는 HEK293T 세포를 1 μ M ER 염색(E34251, Thermo Fisher, Waltham, MA), 50 nM 리소좀 염색(L7528, Thermo Fisher

Waltham, MA), 또는 100 nM 미토콘드리아 염색(M22426, Thermo Fisher Waltham, MA)으로 각각 염색하였다.

[1958] 염색된 푸소좀을 유세포분석기(Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에서 진행시키고, 형광 강도를 하기 표에 따라 각각의 염료에 대해 측정하였다. 비-염색된 푸소좀(음성 대조군) 및 염색된 세포(양성 대조군)에 대한 염색된 푸소좀의 형광 강도를 비교함으로써, 세포소기관의 존재에 대한 확증을 수행하였다. 푸소좀 염색을 표 Y에 제시된 현미경 세팅을 사용하여 수행하였다:

표 Y:

염색	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
ER-트랙커 그린	BL1	488	530/30
리소트랙커 레드	YL1	561	585/16
미토타랙커 딥레드 FM	RL1	638	670/14

[1959]

[1960] 도 20에 제시된 바와 같이, 푸소좀은 제핵-후 4시간째에 소포체(도 20a), 미토콘드리아(도 20b) 및 리소좀(도 20c)에 대해 양성으로 염색되었다.

[1961] 실시예 123: 불용성 단백질 질량에 대한 가용성 단백질 함량의 비교

[1962] 이 실시예는 푸소좀에서 단백질 질량의 가용성:불용성 비의 정량화를 기재한다. 푸소좀에서 단백질 질량의 가용성:불용성 비는 일부 상황에서, 유핵 세포의 비와 유사할 수 있다.

[1963] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, VSV-G에 의한 HEK293T의 일시적인 형질감염, 제핵, 및 피콜을 이용한 후속적인 분획화에 의해 제조하였다. 푸소좀 조제물을 시험하여, 표준 비신초닌산 검정법(BCA)(예를 들어 상업적으로 입수 가능한 Pierce™ BCA 단백질 검정법 키트를 사용함, Thermo Fisher product# 23225)을 사용하여 가용성 : 불용성 단백질 비를 결정하였다. 제조된 푸소좀 또는 부모 세포를 PBS에 1×10^7 세포 또는 ~1 mg/mL 총 푸소좀의 농도로 현탁시키고, 1,500 g에서 원심분리하여 세포를 펠렛화하거나 16,000 x g에서 원심분리하여 푸소좀을 펠렛화함으로써, 가용성 단백질 시료를 제조하였다. 상층액을 가용성 단백질 분획으로서 수합하였다.

[1964] 그 후에, 푸소좀 또는 세포를 PBS에 재현탁시켰다. 이 현탁액은 불용성 단백질 분획을 나타낸다.

[1965] 표준 곡선을, 1개 웰 당 0 내지 15 μ g의 BSA의 공급된 BSA를 사용하여 발생시켰다(2벌 중복). 측정되는 양이 표준의 범위 내에 있도록 푸소좀 또는 세포 조제물을 희석시켰다. 푸소좀 조제물을 2벌 중복으로 분석하고, 평균 값을 사용하였다. 가용성 단백질 농도를 불용성 단백질 농도로 나누어서, 가용성:불용성 단백질 비를 산출하였다(도 21).

[1966] 실시예 124: 표적 세포와의 융합의 측정

[1967] 홍역 바이러스(MvH)의 조작된 헤마글루티닌 당단백질 및 세포 표면 상에서 융합 단백질(F)을 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 함유하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 발생시켰다. MvH의 천연 수용체 결합이 무효화되고, 세포 표면 항원을 인지하는 단일-사슬 항체(scFv)를 통해 표적 세포 특이성이 제공되고, 이러한 경우 scFv가 T 세포 수용체에 대한 공동-수용체인 CD8을 표적화하도록 설계되도록, MvH를 조작하였다. 푸소좀 VSV-G를 HEK-293T 세포의 표면 상에서 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 함유하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 대조군 푸소좀을 사용하였다. 표적 세포는 CMV 프로모터 하에 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP" 카세트를 발현하도록 조작될 뿐만 아니라 공동-수용체 CD8a 및 CD8b를 과발현하도록 조작된 HEK-293T 세포였다. 비-표적 세포는 CD8a/b 과발현 없이 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP" 카세트를 발현하는 동일한 HEK-293T 세포였다. 표적 또는 비-표적 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 30,000 세포/웰로 평판배양하고, 37°C 및 5% CO₂에서 10% 태아 소 혈청을 갖는 DMEM 배지에서 배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 4 내지 6시간째에, Cre 리컴비나제 단백질 및 MvH+F를 발현하는 푸소좀을 DMEM 배지 내 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 10 μ g의 푸소좀으로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[1968] 세포 플레이트를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 주어진 웰 내 총 세포 집단을, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342로 10분 동안 염색함으로써 결정하였다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용된다. Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를

코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 표적 및 비-표적 세포 웰의 이미지를 획득하였다.

[1969] Hoescht, RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. Hoescht 채널을 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대해 구축된 초점면(focal plane)을 사용함으로써, 초점을 각각의 웰 상에서 설정하였다. GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다 (<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

[1970] 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(전달을 보이지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, RFP 전환 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 표적 및 비-표적 수여자 세포 집단 내에서 푸소좀 융합의 양을 기재한다. 표적화된 융합(표적화된 수여자 세포로의 푸소좀 융합)의 양에 대해, RFP 전환 값 퍼센트를 표적 수여자 세포(즉, CD8을 발현함)인 수여자 세포의 퍼센트로 정규화시키고, 이를 피코에리트린(PE)에 공액된 항-CD8 항체로 염색함으로써 평가하고, 유세포분석에 의해 분석하였다. 최종적으로, 표적 세포 융합 양(임의의 값 <0은 0인 것으로 여겨졌음)으로부터 비-표적 세포 융합의 양을 차감시킴으로써, 표적화된 융합의 절대량을 결정하였다.

[1971] 이 검정법을 이용하여, 조작된 MvH(CD8)+F를 HEK-293T 세포의 표면 상에 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 함유하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀은, 수여자 세포가 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP" 카세트를 발현하는 표적 HEK-293T 세포이고 이들 수여자 세포의 51.1%가 CD8-양성인 것으로 관찰된 경우, 25.2 $\pm$ 6.4%의 RFP 전환 퍼센트를 보여주었다. 이들 결과로부터, 표적화된 융합의 정규화된 퍼센트 RFP 전환 또는 양은 표적화된 융합에 대해 49.3 $\pm$ 12.7%인 것으로 결정되었다. 수여자가 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP"를 발현하지만 CD8을 발현하지 않는 비-표적 HEK-293T 세포인 경우, 동일한 푸소좀은 0.5 $\pm$ 0.1%의 RFP 전환 퍼센트를 보여주었다. 상기에 기초하여, MvH(CD8)+F 푸소좀에 대한 표적화된 융합의 절대량은 48.8%인 것으로 결정되었고, 대조군 VSV-G 푸소좀에 대한 표적화된 융합의 절대량은 0%인 것으로 결정되었다(도 22).

[1972] 실시예 125: 막 단백질을 전달하기 위한 시험관내 융합

[1973] 태반 세포-세포 융합 단백질 신시틴-1 (Syn1) 및 막 단백질, 인간 OX40 리간드 (hOX40L, CD134에 대한 리간드)를 세포 표면 상에서 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 발생시켰다. Syn1은 아니지만 hOX40L을 발현하는 동일한 세포로부터의 대조군 입자 (비-푸소젠 푸소좀)를 또한, 수여자 세포로의 hOX40L의 비-융합-매개 전달을 조절하기 위해 발생시켰다. 수여자 세포는 인간 전립선암 세포 (PC-3)였고, 이 세포를 푸소좀으로 처리하기 전 4-6시간째에 24-웰 조직 배양 플레이트에 120,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 t=0에서 40 μg 의 Syn1 푸소좀 또는 대조군 입자로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[1974] 푸소좀 또는 입자를 24시간 동안 인큐베이션한 후, 수여자 세포를 트립신처리하여, 플레이트로부터 탈착시키고, 500 g에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하고, PBS 중 4% PFA에 15분 동안 재현탁시켜, 세포를 고정하였다. 고정 후, 상기 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 뒤이어 1% 소 혈청 알부민(PBS 중)에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, hOX40L에 대항한 것이며 Brilliant Violet 421 염료(BV421, BD Biosciences, Cat# 744881)에 공액된 1차 항체를 세포에 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후에, 세포를 PBS에서 3회 세척하고, 최종적으로 프로피디움 요오다이드를 갖는 BS에 재현탁시켰다. 프로피디움 요오다이드는 DNA 내에 삽입함으로써 고정된/투과된 세포의 세포 핵을 염색하고, 따라서, 푸소좀/입자(프로피디움 요오다이드-음성) 또는 작은 데브리스에 대한 개별 세포를 식별하는 데 사용된다.

[1975] 그 후에, 세포를 Attune NxT 유세포분석기(Thermo Fisher, Waltham, MA)를 사용하여 BV421 및 프로피디움 요오다이드 형광에 대해 분석하고, 하기 표 2에 따라 각각의 형광단의 형광 강도를 결정하였다.

표 Z. 유세포분석기 세팅

염색	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
BV421	VL1	405	450/40
프로피디움 요오다이드	YL1	561	585/16

[1976]

[1977]

동일한 염색 절차를 사용하지만 1차 항체를 첨가하지 않은 음성 대조군을 발생시킨다. Attune NxT 획득 소프트웨어를 획득에 사용하고, FlowJo 소프트웨어를 분석을 사용한다. 광 산란 채널을 선형 이득 상에서 설정하고, 형광 채널을 로그 척도 상에서 설정하며, 이때 각각의 조건에서 최소 10,000 세포를 분석한다. 세포 사건을 우선, 포워드 및 사이드 스캐터 채널 상에서 게이트링하여, 작은 데브리스 사건을 제거하고, 그 후에, 프로피디움 요오다이드-양성 세포를 "모든 세포" 게이트로서 게이트링한다(프로피디움 요오다이드 염색이 없는 세포는 <0.5% 양성 세포를 보여주도록 프로피디움 요오다이드-양성 게이트를 설정함). 그 후에, BV421 형광의 강도를 "모든 세포" 게이트에 기초하여 검사하고, BV421-양성 세포 게이트를, 푸소좀/입자 처리가 없는 PC-3 세포가 <0.5% BV421-양성 세포를 보여주도록 설정한다(도 23에서 블랙 라인 게이트를 참조). 그 후에, BV421-양성 세포 값의 퍼센트를 각각의 그룹에 대해 계산하고, hOx40L 전달을 갖는 세포 %의 정량로서 사용하였다.

[1978]

이 검정법을 이용하여, Syn1 및 hOx40L을 발현하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀은 PC-3 수여자 세포로의 43.6%의, hOx40L 전달을 갖는 세포의 퍼센트를 보여주었다. Syn1 발현이 없는 대조군 입자는 11.4%의, hOx40L 전달을 갖는 세포의 퍼센트를 보여주었다. 대조군 입자를 이용하여 관찰된 hOx40L 전달의 양은 비-푸소좀-매개 전달로 인한 hOx40L 전달의 백그라운드 수준을 나타내었다. 따라서, hOx40L의 푸소좀-매개 전달을 갖는 세포의 퍼센트를 계산하기 위해, 대조군 입자 처리 조건 하에 hOx40L 전달을 갖는 세포의 퍼센트를 푸소좀 처리 조건 하에 hOx40L 전달을 갖는 세포의 퍼센트로부터 차감하였다. hOx40L의 푸소좀-매개 전달을 갖는 세포의 퍼센트는 32.2%였고(도 23), 이는 막 단백질의 시험관내 푸소좀-매개 전달을 실증하였다.

[1979]

실시예 126: 세포막을 가로질러 글루코스를 수송하는 능력의 측정

[1980]

세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 세포막을 가로질러 글루코스를 수송하는 푸소좀의 능력을 측정하기 위해, 살아 있는 세포에서 글루코스 흡수를 모니터링하는 데 사용될 수 있는 2-NBDG(2-(N-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노)-2-데옥시글루코스) 형광 글루코스 유사체의 수준을 정량화하여, 지질 이중층을 가로지르는 능동 수송을 평가하였다. Biovision Inc. (Cat #K682)로부터의 상업적으로 입수 가능한 키트를 제조업체의 설명에 따라 검정법에 사용하였다.

[1981]

간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비친초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 40 ug의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 4°C, 3000 g에서 5분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하고, 뒤이어 0.5% 태아 소 혈청이 보충된 400 uL의 DMEM에 재현탁시켰다. 이를 각각의 시료에 대해 2벌 중복으로 수행하고, 2벌 중복 중 하나에 4 uL의 플로레틴(키트와 함께 제공됨), 글루코스 흡수를 저해하는 천연 폐놀을, 글루코스 흡수 저해에 대한 대조군으로서 처리하였다. 그 후에, 시료를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 푸소좀 시료를 펠렛화하고, 이전에 제조된 400 uL의 글루코스 흡수 믹스에 재현탁시켰다(제제화를 위해 하기 표 A를 참조). 플로레틴으로 전처리된 시료를 플로레틴과 함께 글루코스 흡수 믹스에 재현탁시키고; 전처리되지 않은 시료를 플로레틴 대신에 20 uL의 PBS와 함께 글루코스 흡수 믹스에 재현탁시켰다. 또한, 병행 세트의 푸소좀 시료를, 유세포분석을 위한 음성 대조군으로서 0.5% FBS만 갖는 DMEM 배지에 재현탁시켰다.

표 A: 글루코스 흡수 믹스 제제화

시약	용적 (uL)
0.5% FBS를 갖는 DMEM 배지	1880
2-NBDG 시약	20
글루코스 흡수 인핸서	100
선택적: 플로레틴	20

[1982]

[1983]

그 후에, 시료를 37°C 및 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 펠렛화하고, 1 mL의 1X 분석 완충제(키트와 함께 제공됨)로 1회 세척하고, 다시 펠렛화하고, 400 uL의 1X 분석 완충제에 재현탁시켰

다.

- [1984] 그 후에, 시료를, Invitrogen Attune NxT 어쿠스틱 포커싱 세포분석기를 사용하는 유세포분석에 의해 2-NBDG 흡수에 대해 측정하였다. 2-NBDG를 488 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 방출을 513 ± 26 nm에서 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 푸소좀 크기의 사건을 포착하고, 작은 데브리스를 폐기하였다. 2-NBDG 음성 대조군 시료가 2-NBDG 염색에 대해 양성인 사건의 <0.5%를 보여준 최소 수준에서 게이팅함으로써 2-NBDG에 대해 양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, 플로레틴 처리를 갖는 푸소좀 및 플로레틴 처리를 갖지 않는 푸소좀에 대해 글루코스 흡수에 대한 값을 계산하기 위해, 2-NBDG 형광에 양성인 게이팅된 세포를 2-NBDG의 평균 형광 강도(F.I.)에 대해 평가하였다.
- [1985] 이러한 검정법을 이용하여, VSV-G 및 Cre를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀은 플로레틴 처리가 없는 경우 631.0 +/- 1.4의 2-NBDG 평균 F.I. 및 플로레틴 처리가 있는 경우 565.5 +/- 4.9의 평균 F.I.를 보여주었다(도 24).
- [1986] 실시예 127: 세포기질에서 에스테라제 활성의 측정
- [1987] C2C12 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 푸소좀의 세포기질에서 에스테라제 활성을 측정하기 위해, 시료를, 살아 있는 세포의 세포막을 수동적으로 가로지르고 세포기질 에스테라제에 의해 그린 형광 칼세인으로 전환되는 칼세인 AM(BD Pharmigen, Cat #564061), 플루오레신 유도체 및 비형광 생염료(vital dye)로 염색하였으며, 이는 온전한 막 및 불활성 다제약물 내성 단백질을 갖는 세포에 의해 보유된다.
- [1988] 간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 20 ug의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 3000 g에서 5분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하고, 뒤이어 0.5% 태아 소 혈청이 보충된 400 uL의 DMEM에 재현탁시켰다. 막-투과성 염료, 칼세인-AM을, 디메틸설폭사이드 중 10 mM의 스타크 용액 및 PBS 완충제, pH 7.4 중 1 mM의 작업 용액으로서 제조하였다. VSV-G 푸소좀을 DMEM 배지에 희석된 칼세인-AM의 1 μM 용액으로 염색하였다. 시료를 37 °C, 암실에서 30분 동안 인큐베이션하고, 그 후에 원심분리에 의해 펠렛화하였다. PBS 완충제로 2회 세척한 후, 푸소좀을 PBS에 재현탁시키고, 유세포분석에 의해 분석하였다.
- [1989] 상기 시료를 Invitrogen Attune NxT 어쿠스틱 포커싱 세포분석기를 사용하여 칼세인 형광 보유에 대해 측정하였다. 칼세인 AM을 488 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 방출을 513 ± 26 nm에서 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 푸소좀 크기의 사건을 포착하고, 작은 데브리스를 폐기하였다. 칼세인 음성 대조군 시료가 칼세인 염색에 대해 양성인 사건의 <0.5%를 보여준 최소 수준에서 게이팅함으로써 칼세인에 대해 양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, 푸소좀의 세포기질에서 에스테라제 활성의 값을 계산하기 위해, 칼세인 형광에 양성인 게이팅된 세포를 칼세인의 평균 형광 강도(F.I.)에 대해 평가하였다.
- [1990] 이러한 검정법을 이용하여, C2C12 세포로부터 유래된 푸소좀은 631.0 +/- 1.4의 에스테라제 활성(평균 칼세인 F.I.)을 보여주었다(도 25).
- [1991] 실시예 128: 푸소좀에서 아세틸콜린에스테라제 활성의 측정
- [1992] 세포 표면 상에서 태반 세포-세포 융합 단백질 신시틴-1(Syn1)을 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 발생시켰다. 아세틸콜린에스테라제 활성을 FluoroCet 정량화 키트(System Biosciences, Cat #FCET96A-1)를 제조업체의 권고에 따라 사용하여 측정하였다.
- [1993] 간략하게는, 푸소좀을 120,000 g에서 90분 동안 초원심분리를 통해 펠렛화하고, 포스페이트-완충 식염수(PBS)에서 조심스럽게 재현탁시켰다. 다음, 푸소좀을 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 정량화하였다. 단백질 농도의 BCA 정량화 후, 1000 ng의 총 푸소좀 단백질을 PBS로 60 uL의 용적까지 희석시키고, 뒤이어 60 uL의 용해 완충제를 첨가하여 입자를 용해시켰다. 얼음 상에서 30분간의 인큐베이션 후, 시료는 FluoroCet 검정법에서 진행될 준비가 되었다.
- [1994] 96-웰 플레이트의 2벌 중복 웰에서, 50 uL의 용해된 푸소좀 시료를 50 uL의, 완충제 A의 작업 용액 및 50 uL의, 완충제 B의 작업 용액과 함께 혼합하였다. 병행하여, 2 uL의 제공된 표준을 126 uL의 1X 반응 완충제에서 피펫팅함으로써, 표준 곡선을 제조하였다. 그 후에, 이 표준 용액을 5X 단계 희석시켜, 아세틸콜린에스테라제 활성의 2.0E+08, 1.0E+08, 5.0E+07, 2.5E+07, 1.25E+07, 및 6.25E+06 엑소좀 등가물로 구성된 6-포인트 표준 곡선을 만들었다. 그 후에, 96-웰 플레이트의 2벌 중복 웰에서, 50 uL의 각각의 표준을 50 uL의, 완충제 A의 작업

용액 및 50 μ L의, 완충제 B의 작업 용액과 함께 혼합하였다. 50 μ L의 1X 반응 완충제를 블랭크로서 사용하였다. 상기 플레이트의 면들을 탭핑함으로써 혼합하고, 뒤이어 암실, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 플레이트를, 여기: 530~570 nm 및 방출: 590~600 nm에서 설정된 형광 플레이트 판독기를 사용하여 즉시 측정하였다. 상기 플레이트를 판독 전에 30초 동안 셰이킹하였다.

[1995] 그 후에, 블랭크 웰로부터 RFU 값을 차감한 후, 공지된 엑소좀 등가의 아세틸콜린에스터라제 활성에 대한 상대 형광 단위(RFU)를 플로팅하였다. 그 후에, 선형 회귀선을 계산하고, 방정식을 사용하여, 측정된 RFU 값으로부터 푸소좀 시료에 대한 아세틸콜린에스터라제 활성(엑소좀 등가에서)을 결정하였다. Syn1 푸소좀에 대해 측정된 아세틸콜린에스터라제 활성을 표 B에 제시한다:

표 B: 푸소좀 및 대조군 입자에서 아세틸콜린에스터라제 활성

시료	아세틸콜린에스터라제 활성 (엑소좀 등가)
Syn1 푸소좀	6.83E+05 +/- 2.21E+05

[1996]

[1997] 실시예 129: 대사 활성 수준의 측정

[1998] 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 발생시켰다. 푸소좀 조제물의 대사 활성 수준을 결정하기 위해, 시트레이트 신타제 활성을, 모든 필요한 시약을 제공하는 Sigma (Cat #CS0720)로부터의 상업적으로 입수 가능한 키트를 사용하여 평가하였다. 시트레이트 신타제는 트리카르복실산(TCA) 사이클 내에서, 옥살로아세테이트(OAA)와 아세틸-CoA 사이의 반응을 촉매하여 시트레이트를 발생시키는 효소이다. 아세틸-CoA의 가수분해 시, 티올기를 갖는 CoA(CoA-SH)의 방출이 존재한다. 티올기는 화학적 시약, 5,5-디티오비스-(2-니트로벤조산)(DTNB)과 반응하여, 5-티오-2-니트로벤조산(TNB)을 형성하며, 이는 412 nm에서 분광광도적으로 측정될 수 있는 황색 생성물을 갖는다.

[1999] 검정법을 제조업체의 권고에 따라 수행하였다. 간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 400 μ g의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 3000 g에서 5분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 푸소좀을, 다시 펠렛화하고 빙냉 PBS에 재현탁시킴으로써 1회 세척하였다. 푸소좀을 다시 펠렛화하고, 상층액을 제거하였다. 펠렛을, 1X 프로테아제 저해제가 있는 100 μ L의 세포용해 M 완충제에서 용해시켰다. 피펫팅에 의한 혼합 후, 용해된 시료를 완전히 용해될 때까지 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 상기 시료를 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하고, 상층액을 새로운 마이크로원심분리 튜브로 이송하고, 후속적인 검정법을 수행할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에 저장하였다.

[2000] 시트레이트 신타제 활성 검정법을 개시하기 위해, 모든 검정법 용액을 사용 전에 실온까지 가온시켰다. 용해된 푸소좀 시료를 하기 표 C에 따라 검정법 용액과 혼합하였다:

표 C: 96 웰 플레이트에서 시트레이트 신타제 활성 측정을 위한 반응식

시료	검정법 완충제	30 mM 아세틸 CoA 용액	10 mM DTNB 용액	10 mM OAA 용액 (마지막으로 첨가됨)
4 μ L	182 μ L	2 μ L	2 μ L	10 μ L

[2001]

[2002] 표 C에서 용적은 96-웰 플레이트의 단일 웰에 대한 용적을 나타낸다. 시료를 2벌 중복하여 측정하였다. 반응의 모든 구성성분을 혼합하고, 96-웰 플레이트의 단일 웰 내로 피펫팅하였다. 그 후에, 412 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 상에서 1.5분 동안 분석하여, 기준선 반응을 측정하였다. 다음, 10 μ L의 10mM OAA 용액을 각각의 웰에 첨가하여, 반응을 개시하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기에서 10초 동안 셰이킹한 후, 10초마다 측정하면서 흡광도를 412 nm에서 1.5분 동안 판독하였다.

[2003] 시트레이트 신타제 활성을 계산하기 위해, 412 nm에서의 흡광도를 각각의 반응에 대한 시간에 대해 플롯화하였다. 1분 당 흡광도의 변화율, OAA 첨가 전(내인성 활성) 및 OAA 첨가 후(총 활성)에 대해 플롯의 선형 범위에 대해 계산하였다. 그 후에, 시료에 대한 총 활성으로부터 내인성 활성을 차감함으로써, 순(net) 시트레이트 신타제 활성을 계산하였다. 그 후에, 이 값을 사용하여, 방정식에 기초하여 시트레이트 신타제 활성 및 제조업체에 의해 제공된 상수 값을 계산하였다. VSV-G 푸소좀에 대해 측정된 시트레이트 신타제 활성은 1.57E-02 +/-

1.86E-03 umol/ug 푸소좀/분이었다.

[2004]

실시예 130: 호흡 수준의 측정

[2005]

세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 미토콘드리아 산소 소모율을 Seahorse 세포의 유속 분석기(Agilent)에 의해 측정함으로써, 푸소좀 조제물에서의 호흡 수준을 결정하였다.

[2006]

간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 20 µg의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 3000 g에서 5분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하고, 뒤이어 25 mM 글루코스 및 2 mM 글루타민(pH 7.4)이 보충된 150 µl의 XF 검정법 배지(Agilent Cat # 103575-100)에 재현탁시켰다(4벌 중복). 그 후에, 현탁된 시료를 96-웰 Seahorse 플레이트(Agilent)의 하나의 웰에 첨가하였다.

[2007]

96-웰 Seahorse 플레이트를 37°C에서 60분 동안 시료와 함께 인큐베이션하여, 온도 및 pH가 평형에 도달하도록 허용함으로써 산소 소모율 검정법을 개시하였다. 그 후에, 푸소좀 바로 주변에서 배지 내 산소의 세포의 유속 변화 및 pH의 세포의 변화를 측정하는 XF96 세포의 유속 분석기(Agilent)에서 상기 마이크로플레이트를 검정하였다. 정상 상태 산소 소모율 및 세포의 산성화 속도를 수득한 후, ATP 신타제를 저해하는 올리고마이신(5 µM) 및 미토콘드리아를 언커플링시키는 양성자 이오노포어 FCCP(카르보닐 시아나이드 4-(트리플루오로메톡시) 페닐 하이드라존; 2 µM)를 마이크로플레이트의 각각의 웰에 시약 전달 챔버를 통해 순차적으로 주사하여, 최대 산소 소모율 값을 수득하였다. 최종적으로, 5 µM 안티마이신 A(미토콘드리아 복합체 III의 저해제)를 주사하여, 호흡 변화가 주로 미토콘드리아 호흡으로 인한 것임을 확인하였다. 안티마이신 A 호흡율을 다른 3개의 호흡율로부터 차감시켜, 기저 미토콘드리아 호흡율, 언커플링(올리고마이신-내성) 미토콘드리아 호흡율 및 최대(FCCP-유도) 미토콘드리아 호흡율을 결정하였다.

[2008]

이 검정법을 사용하여, 공여자 VSV-G 푸소좀은 하기 표 D에 따라 기저 산소 소모율, 언커플링 산소 소모율 및 최대 산소 소모율을 보여준 것으로 결정되었다.

표 D: VSV-G 푸소좀의 호흡율

호흡 상태	미토콘드리아 산소 소모율 (호흡율) (pmol/분/20µg 푸소좀) AVG ± SEM
기저	11.3 ± 3.0
언커플링	10.1 ± 2.3
최대	20.0 ± 1.9

[2009]

[2010]

실시예 131: 푸소좀의 포스파티딜세린 수준의 측정

[2011]

세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 푸소좀의 포스파티딜세린 수준을 측정하기 위해, 아넥신 V 염색을, Alexa 플루어 647 염료(Cat #A23204)에 공액된 상업적으로 입수 가능한 아넥신 V를 제조업체의 설명에 따라 사용하여 수행하였다. 아넥신 V는 형질막의 외부의 리플릿(leaflet) 상에서 노출될 때 포스파티딜세린에 결합할 수 있는 세포성 단백질이며; 따라서, 시료에의 아넥신 V 결합의 판독은 시료에서 포스파티딜세린 수준의 평가를 제공할 수 있다.

[2012]

간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 40 µg의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 3000 g에서 5분 동안의 원심분리(3벌 중복 시료에서)에 의해 펠렛화하고, 뒤이어 2% 태아 소 혈청이 보충된 400 µL의 DMEM에 재현탁시켰다. 하나의 시료를 40 µM 안티마이신 A로 처리하였다. 그 후에, 상기 시료를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 인큐베이션 후, 시료를 원심분리에 의해 다시 펠렛화하고, 100 µL 아넥신-결합 완충제(ABB; 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4)에 재현탁시켰다. 다음, Alexa 플루어 647에 공액된 5 µL의 아넥신 V를 각각의 시료(아넥신 V 염색이 없는 음성 대조군은 제외)에 첨가하였다. 상기 시료를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고, 뒤이어 400 µL ABB를 첨가하였다.

- [2013] 그 후에, 상기 시료를 Invitrogen Attune NxT 어쿠스틱 포커싱 세포분석기를 사용하는 유세포분석에 의해 아넥신 V 염색에 대해 측정하였다. Alexa 플루어 647에 공액된 아넥신 V를 638 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 방출을 670 ± 14 nm에서 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 푸소좀 크기의 사건을 포착하고, 작은 데브리스를 폐기하였다. 비-염색된, 아넥신 V-음성 대조군 시료가 Alexa 플루어 647 염색에 대해 양성인 사건의 <0.5%를 보여준 최소 수준에서 게이팅함으로써, Alexa 플루어 647(아넥신 V) 염색에 대해 양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, Alexa 플루어 647 염색에 성인 게이팅된 사건을 총 부모 집단의 아넥신 V-양성 사건의 퍼센트에 대해 평가하였으며(포워드/사이드 스캐터 게이트에서 푸소좀 크기 사건), 이 값을 푸소좀 시료에서 포스포티딜세린 수준의 정량화로서 사용하였다.
- [2014] 이 검정법을 이용하여, VSV-G 및 Cre를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀은 안티마이신 A 처리가 없을 때 $63.3 \pm 2.3\%$ 의 아넥신 V-양성 푸소좀 %를 보여주었고, 안티마이신 A 처리가 있을 때 $67.6 \pm 5.7\%$ 의 아넥신 V-양성 푸소좀의 퍼센트를 보여주었다.
- [2015] 실시예 132: 평균 미토콘드리아 막 전위의 측정
- [2016] 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 푸소좀의 평균 미토콘드리아 막 전위 수준을 측정하기 위해, 미토콘드리아 막 전위 민감성인 상업적으로 입수 가능한 염료, 테트라메틸 로다민, 에틸 에스테르, 퍼클로레이트(TMRE; Abcam, Cat# T669)를 미토콘드리아 막 전위의 평가에 사용하였다. 시료에서 TMRE 형광 강도(FI)를 미토콘드리아의 양에 대해 정규화하기 위해, 미토트랙커 그린 FM 염료(MTG; ThermoFisher, Cat #M7514)를 사용하여, 시료를 공동-염색시켜, TMRE FI를 MTG FI로 정규화하고, 따라서 시료 내 미토콘드리아의 양으로 정규화하였다. 또한, 카르보닐 시아나이드-p-트리플루오로메톡시페닐하이드라존(FCCP; Sigma Cat #C2920)을 사용하여, 병행 세트의 시료를 처리하여, 미토콘드리아 막 전위를 완전히 비편재화시키고, 따라서 TMRE FI에서의 저하에 기초하여 미토콘드리아 막 전위의 정량화를 밀리볼트에서 허용한다.
- [2017] 간략하게는, 푸소좀 시료를 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 다음, 40 μ g의 푸소좀 총 단백질을, 테이블탑 원심분리기에서 3000 g에서 5분 동안의 (비처리된 2벌 중복 및 FCCP-처리된 2벌 중복에 대해 4벌 중복의 시료에서) 원심분리에 의해 펠렛화하고, 뒤이어 2% 태아 소 혈청이 보충되고 TMRE 및 MTG 염료를 각각 30 nM 및 200 nM의 최종 농도로 함유하는 100 μ L의 DMEM에 재현탁시켰다. 병행 세트의 푸소좀 시료를 음성 대조군으로서 염색되지 않은 채 놔두었다. 시료를 37°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 시료를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 30 nM TMRE를 함유하는 400 μ L의 페놀 레드-무함유 DMEM 배지에 재현탁시켰다. 1 세트의 2벌 중복물을 20 μ M FCCP로 5분 동안 처리한 후, 유세포분석에 의해 평가하였다.
- [2018] 그 후에, 상기 시료를 Invitrogen Attune NxT 어쿠스틱 포커싱 세포분석기를 사용하는 유세포분석에 의해 아넥신 V 염색에 대해 측정하였다. MTG를 488 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 방출을 530 ± 30 nm에서 포착하였다. TMRE를 561 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 방출을 585 ± 16 nm에서 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 푸소좀 크기의 사건을 포착하고, 작은 데브리스를 폐기하였다. 비-염색된 대조군 시료가 MTG 또는 TMRE 염색에 대해 양성인 사건의 <0.5%를 보여준 최소 수준에서 게이팅함으로써 MTG 및 TMRE 염색에 대해 양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, MTG 및 TMRE 염색에 대해 양성인 게이팅된 사건을 MTG 및 TMRE의 평균 FI에 대해 평가하였다.
- [2019] TMRE FI 값을 MTG FI 값으로 정규화한 후, 막 전위 값(밀리볼트, mV)을 TMRE의 강도에 기초하여 계산한다. 이러한 TMRE/MTG 비 값은 시료에서 미토콘드리아의 양에 대한 TMRE 강도의 정규화를 허용한다. 비처리된 시료와 FCCP-처리된 시료 둘 모두에 대한 TMRE/MTG 비 값을 계산하고, 이 값을 사용하여, (TMRE가 네른스트 방식으로 미토콘드리아에 누적되므로) TMRE 형광에 기초하여 미토콘드리아 막 전위를 결정할 수 있는 변형된 네른스트 방정식(하기 참조)을 사용하여 막 전위를 밀리볼트에서 결정한다. 푸소좀 막 전위를 하기 식을 이용하여 계산한다: $(mV) = -61.5 * \log(FI(\text{비처리된})/FI(\text{FCCP-처리된}))$. 이 방정식을 사용하여, VSV-G 푸소좀 시료의 계산된 미토콘드리아 막 전위는 -29.6 ± 1.5 밀리볼트였다.
- [2020] 실시예 133: 대상체에서 지속성 반감기의 측정
- [2021] 이 실시예는 푸소좀 반감기의 측정을 기재한다. 푸소좀은 제조 전 2시간 동안 급성 형질감염을 겪었으며; 이들 푸소좀을 본원에 기재된 방법을 사용하여 유래하였고, 파이어플라이 루시퍼라제 mRNA를 로딩하였다.

- [2022] 제조 후, 푸소좀을 원심분리에 의해 펠렛화하고, 푸소좀 입자를 주사용 멸균 포스페이트 완충 식염수에 재현탁시켰다. 푸소좀이 결여된 완충된 용액을 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [2023] 푸소좀을 9-주령 FVB(Jackson Laboratory, 001800) 마우스 내로 전경골근에 근육내(IM) 투여를 통해 전달하였다. 내용물의 계속된 멸균성을 보장하는 방식으로 상기 용액을 취급하였다. 마취를 유도 챔버(효과가 있기 위해 ~4% 이소플루란)에서 수행하였고, 가온된(35℃) 수술 테이블 상에 놓인 동물에서 노즈콘(nose cone)(효과가 있기 위해 ~2% 이소플루란)을 통해 유지시켰다. 전경골(TA) 근육의 중앙 벨리(mid belly)에 걸친 피부를, 상기 영역을 제모함으로써(45초 동안 Nair 제모제 크림, 뒤이어 상기 영역을 70% 에탄올로 세정함) 준비하였다. 투베르쿨린 주사기를 사용하여, 50 μ l의 푸소좀 용액 15 μ g 단백질/ μ L, 평균(SEM))을 TA의 벨리 내로 근육내 주사하였다. 주사의 완료 시, 주사기를 제거하고, 압력을 주사 부위에 적용하였다. 대측 다리를 대조군으로서 동일한 방법을 이용하여 PBS로 처리하였다.
- [2024] 전달 후, mRNA 루시퍼라제를 수여자 세포질에서 루시퍼라제 단백질로 번역한다. D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)의 복강내(I.P.) 투여는 생체내 생물발광 이미징을 통한 루시퍼라제 발현의 검출을 가능하게 하였다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 콘 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓았다. 주사-후 3분 내지 35분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 최대 생물발광 신호를 관찰하였다. 최대 레이디언스를 광자/초/ cm^2 /라디안으로서 기록하였다. 면적에 걸친 레이디언스를 통합하는 총 유속을, Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer) 내에서 관심 영역(ROI) 툴을 사용하여 정량화하고, 광자/초로서 기록하였다. 푸소좀 처리된 전경골 근육 조직 및 PBS 처리된 전경골 근육 조직을 구체적으로, 음성 대조군(음성 대조군 언스레디드(unthreaded)(홍부) 및 병기(stage))과 비교하여 레이디언스 측정에 대해 모니터링하였다. 측정을 주사-후 1, 6, 12, 24 및 48시간째에 수행하여, 파이어플라이 루시퍼라제 존재를 관찰하였다.
- [2025] 파이어플라이 루시퍼라제 존재의 증거를 도 26a 내지 26b에 제시된 바와 같이 동물의 수여자 조직에서 생물발광 이미징에 의해 검출하였다.
- [2026] 실시예 134: 대상체(BiVs- Cre 제시클)에서 표적화 잠재성의 측정
- [2027] 이 실시예는 특이적인 신체 부위를 표적화하는 푸소좀의 능력을 평가한다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 유래하고, cre-리컴비나제 단백질을 로딩하였다.
- [2028] 2개 용량의 푸소좀 (1x 및 3x)을 Loxp 루시퍼라제(Jackson Laboratory, 005125) 마우스 내로 꼬리 정맥을 통해 정맥내(I.V.) 주사하여 전달하였다. 마우스를 가열 램프(250 W(적외선) 가열 램프 전구를 이용) 아래에 약 5분 동안(또는 마우스가 이들의 수염을 과도하게 그루밍하기 시작할 때까지) 두어, 꼬리 정맥을 팽창시켰다. 마우스를 구속기 상에 놓고, 꼬리를 70% 에탄올에 닦아, 정맥을 더 양호하게 보이게 하였다.
- [2029] 투베르쿨린 주사기를 사용하여, 200 μ l의 푸소좀 1x 용액 ($8.5\text{e}8 \pm 1.4\text{e}8$ 입자/ μ L, 평균(SEM)) 또는 3x 용액 ($2.55\text{e}9 \pm 1.4\text{e}8$ 입자/ μ L, 평균(SEM))을 IV 주사하였다. 주사의 완료 시, 주사기를 제거하고, 압력을 주사 부위에 적용하였다.
- [2030] 용합 후, CRE 단백질은 재조합을 수행하기 위해 핵으로 전좌하고, 이는 루시퍼라제의 구성적 발현을 초래하였다. 처리-후 3일째에, 대상체의 복부 영역을, 상기 영역을 제모함으로써(45초 동안 Nair 제모제 크림, 뒤이어 상기 영역을 70% 에탄올로 세정함) 준비하였다. 그 후에, 대상체에게 D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)을 복강내 투여를 통해 처리하였다. 이는 생체내 생물발광 이미징을 통한 루시퍼라제 발현의 검출을 가능하게 하였다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 콘 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓았다. 주사-후 3분 내지 15분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 최대 생물발광 신호를 관찰하였다. 최대 레이디언스를 광자/초/ cm^2 /라디안으로서 기록하였다. 면적에 걸친 레이디언스를 통합하는 총 유속을, Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer) 내에서 관심 영역(ROI) 툴을 사용하여 정량화하고, 광자/초로서 기록하였다.
- [2031] 푸소좀에 의한 단백질(Cre 리컴비나제) 전달의 증거를 도 27a 내지 27b에 제시된 바와 같이 동물의 수여자 조직에서 생물발광 이미징에 의해 검출하였다. 신호는 비장 및 간에서 주로 관찰되었으며, 이때 3x 그룹이 최고 신호를 보여주었다.
- [2032] 전신 이미징 후, 마우스의 목뼈를 탈구시키고, 간, 심장, 폐, 신장, 소장, 췌장 및 비장을 수합하고, 안락사 5분 이내에 이미징하였다. 푸소좀에 의한 간 및 비장으로의 단백질 (Cre 리컴비나제) 전달의 증거를 동물의 추

출된 수여자 조직에서 생물발광 이미징에 의해 검출하였다. 이는 도 28a 내지 28b에서 관찰할 수 있다. 신호는 비장에서 최고였고, 심장에서 최저였으며, 이때 3x 그룹이 최고의 유의한 신호를 보여주었다(심장과 비교하여 $p=0.0004$).

[2033] 실시예 135: 리소솜 산성화에 독립적인 경로를 통한 푸소솜의 전달

[2034] 종종, 표적 세포 내로의 복합 생물 적재물의 진입을 세포내이입에 의해 달성한다. 세포내이입은 적재물이 엔도솜에 진입하는 것으로 필요로 하며, 이러한 엔도솜은 산성화된 리소솜으로 성숙한다. 불리하게는, 세포내이입을 통해 세포로 진입하는 적재물은 엔도솜 또는 리소솜에서 가워지게 될 수 있고, 세포질에 도달할 수 없게 된다. 적재물은 또한, 리소솜에서 산성 조건에 의해 손상될 수 있다. 일부 바이러스는 표적 세포 내로의 비-세포내이입 진입을 할 수 있지만; 이러한 과정은 불완전하게 이해된다. 이 실시예는, 바이러스 푸소솜이 나머지 바이러스로부터 단리되고, 다른 바이러스 단백질이 결합된 푸소솜 상에서 비-세포내이입 진입을 부여할 수 있음을 실증한다.

[2035] 세포 표면 상에 니파 바이러스 수용체-결합 G 단백질 및 융합 F 단백질 (NivG+F)을 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소솜을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소솜을 수득함으로써 발생시켰다. 비-세포내이입 경로를 통한 수여자 세포로의 푸소솜의 전달을 실증하기 위해, NivG+F 푸소솜을, CMV 프로모터 하에 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP" 카세트 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 처리하는 데 사용하였다. NivF 단백질은 활성화 및 후속적인 융합 활성을 위해 환경적 산성화를 필요로 하지 않는 것으로 제시된 pH-독립적 외피 당단백질이다(Tamin, 2002).

[2036] 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 4 내지 6시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 NivG+F 푸소솜을 DMEM 배지 내 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용하였다. 푸소솜 시료를 우선, 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 수여자 세포를 10 μ g의 푸소솜으로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. NivG+F 푸소솜을 통한 Cre 전달이 비-세포내이입 경로를 통한 것이었음을 실증하기 위해, NivG+F 푸소솜 처리를 받는 수여자 세포의 병행 웰을 엔도솜/리소솜 산성화의 저해제, 바필로마이신 A1(Baf; 100 nM; Sigma, Cat #B1793)로 공동-처리하였다.

[2037] 세포 플레이트를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 주어진 웰 내 총 세포 집단을, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342로 10분 동안 염색함으로써 결정하였다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용되었다. Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 푸소솜 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노 바이러스로 처리된 수여자 세포를 함유하는 양성 대조군 웰 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 표적 및 비-표적 세포 웰의 이미지를 획득하였다.

[2038] Hoescht, RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. Hoescht 채널을 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대해 구축된 초점면을 사용함으로써, 초점을 각각의 웰 상에서 설정하였다. GFP 및 RFP-양성 웰의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

[2039] 이미지를 60 μ m 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(전달을 보이지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, RFP 전환 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 수여자 세포와의 푸소솜 융합의 양을 나타낸다.

[2040] 이 검정법을 이용하여, NivG+F를 HEK-293T 세포의 표면 상에 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 함유하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소솜은, 세포내이입-매개 흡수를 저해하기 위해 수여자 세포를 Baf에 의해 공동-처리한 경우에도 NivG+F 푸소솜에 의한 Cre 적재물의 유의한 전달에 의해 입증된 바와 같이 비-세포내이입 경로를 통한 진입과 일관되게 리소솜-독립적 경로를 통한 유의한 전달을 보여주었다(도 29). 이러한 경우, Baf 공동-처

리에 의한 적재물 전달의 저해는 23.4%였다.

[2041] 실시예 136: 리소좀 산성화를 수반하는 경로를 통한 푸소좀의 전달

[2042] 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을, 피콜 구배를 통한 초원심분리의 표준 절차에 따라 본원에 기재된 바와 같이 작은 입자 푸소좀을 수득함으로써 발생시켰다. 세포내이입 경로를 통한 수여자 세포로의 푸소좀의 전달을 실증하기 위해, VSV-G 푸소좀을 사용하여, CMV 프로모터 하에 "Loxp-GFP-정지-Loxp-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 처리하였다. VSV-G는 후기 엔도좀 또는 리소좀의 낮은 pH 환경(pH~6)에서 활성화되는 것으로 제시된 pH-의존적 외피 당단백질이다(Yao, 2003). 수여자 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 4 내지 6시간째에, Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 VSV-G 푸소좀을 DMEM 배지 내 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용하였다. 푸소좀 시료를 우선, 제조업체의 설명에 따라 비신초닌산 검정법(BCA, ThermoFisher, Cat #23225)에 의해 총 단백질 함량에 대해 측정하였다. 수여자 세포를 10 µg의 푸소좀으로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. VSV-G 푸소좀을 통한 Cre 전달이 세포내이입 경로를 통한 것이었음을 실증하기 위해, VSV-G 푸소좀 처리를 받는 수여자 세포의 병행 웰을 엔도좀/리소좀 산성화의 저해제, 바필로마이신 A1(Baf; 100 nM; Sigma, Cat #B1793)로 공동-처리하였다.

[2043] 세포 플레이트를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 주어진 웰 내 총 세포 집단을, 세포를 DMEM 배지 중 Hoechst 33342로 10분 동안 염색함으로써 결정하였다. Hoechst 33342는 DNA 내에 삽입함으로써 세포를 염색시키고, 따라서, 개별적인 세포를 식별하는 데 사용되었다. Hoechst를, 405 nm LED 및 DAPI 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. GFP를 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포를 함유하는 양성 대조군 웰 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 표적 및 비-표적 세포 웰의 이미지를 획득하였다.

[2044] Hoescht, RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. Hoescht 채널을 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대해 구축된 초점면을 사용함으로써, 초점을 각각의 웰 상에서 설정하였다. GFP 및 RFP-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/).

[2045] 이미지를 60 µm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(전달을 보이지 않은 수여자 세포) 및 RFP-양성 세포의 합계로 나누어서, RFP 전환 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 수여자 세포와의 푸소좀 융합의 양을 나타낸다.

[2046] 이 검정법을 이용하여, VSV-G를 HEK-293T 세포의 표면 상에 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 함유하는 HEK-293T 세포로부터 유래된 푸소좀은, 세포내이입-매개 흡수를 저해하기 위해 수여자 세포를 Baf에 의해 공동-처리한 경우에도 VSV-G 푸소좀에 의한 Cre 적재물의 유의한 전달에 의해 입증된 바와 같이 세포내이입 경로를 통해 유의한 전달을 보여주었다(도 30). 이러한 경우, Baf 공동-처리에 의한 적재물 전달의 저해는 95.7%였다.

[2047] 실시예 137: 세포소기관의 전달

[2048] 태반 세포-세포 융합 단백질 신시틴-1 (Syn1)을 세포 표면 상에서 발현하고 미토콘드리아-표적화된 DsRED 형광 단백질 (mtDsRED)을 발현하는 HeLa 세포를 포함하는 푸소좀을 발생시켰다. 수여자 세포는, 잘시타빈, 뉴클레오사이드 유사체 리버스 트랜스크립타제 저해제에서 HeLa 세포의 장기간(>6주) 배양에 의해 미토콘드리아 DNA (mtDNA)가 결여되도록 생성되었던 HeLa Rho0 세포였다. HeLa Rho0 세포는 mtDNA가 결핍되어 있고(qPCR에 의해 평가된 바와 같음), 유의하게 결핍된 미토콘드리아 산소 소모율을 보여준다(Seahorse 세포의 유속 검정법에 의해 측정된 바와 같음). 수여자 HeLa Rho0 세포를 또한, 2일 동안 아데노바이러스 전달을 통해 미토콘드리아-표적화된 GFP(mtGFP)를 발현하도록 조작하였다.

[2049] 수여자 HeLa Rho0 세포를 6-웰 디쉬 내로 평판배양하고, 1시간 후에, Syn1 HeLa 세포 푸소좀을 수여자 세포에 적용하였다. 그 후에, 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를, BD FACS Aria

SORP 세포 소터를 사용한 형광-보조 세포 소팅을 통해 이중-양성 (융합된) 세포에 대해 소팅하였다. Syn1 HeLa 세포 푸소솜으로부터 미토콘드리아 공여(mtDsRED)를 받았던 수여자 HeLa Rho0 세포를 소팅하기 위해, mtGFP 및 mtDsRED에 대해 이중-양성인 세포 집단을 평가하였다. mtGFP를 488 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 513 ± 26 nm에서 방출을 포착하였다. mtDsRED를 543 nm 레이저를 이용하여 여기시키고, 570 ± 26 nm에서 방출을 포착하였다. 포워드 및 사이드 스캐터 게이팅을 초기에 사용하여, 세포-크기의 사건을 포착하고 작은 데브리스를 제거하였다. 각각의 적절한 음성 대조군 시료가 특이적인 형광 마커에 대한 <1%의 양성 사건을 보여준(즉, 비-염색된 및 단일-mtGFP-양성 시료는 mtDsRED에 대해 <1%의 양성 사건을 보여줌) 최소 수준에서 게이팅함으로써 mtGFP 및 mtDsRED에 대해 이중-양성인 사건을 결정하였다. 그 후에, 이중-양성 사건, 뿐만 아니라 단일-양성 mtGFP(미토콘드리아 전달이 없는 수여자 세포) 및 단일-양성 mtDsRED(수여자 세포와 융합되지 않은 공여자 제핵 VSV-G HeLa 세포) 사건을 10% FBS 및 항생제를 갖는 DMEM 배지 내로 소팅하였다. 소팅된 세포를 계수하고, 96-웰 Seahorse 플레이트(Agilent)에서 1개 웰 당 25,000개의 세포(각각의 그룹에 대해 6벌 중복)로 집중하였다. 상기 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[2050] 성장 배지를 제거하고, 25 mM 글루코스 및 2 mM 글루타민(Agilent)을 함유하는 저-완충 DMEM 최소 배지로 대체하고, 상기 마이크로플레이트를 37°C에서 60분 동안 인큐베이션하여, 온도 및 pH 평형을 허용함으로써, 산소 소모율 측정법을 개시하였다. 그 후에, 접착성 세포 바로 주변에서 배지 내 산소의 세포의 유속 변화 및 pH의 세포의 변화를 측정하는 XF96 세포의 유속 분석기(Agilent)에서 상기 마이크로플레이트를 측정하였다. 정상 상태 산소 소모율 및 세포의 산성화 속도를 수득한 후, ATP 신타제를 저해하는 올리고마이신(5 μM) 및 미토콘드리아를 언커플링시키는 양성자 이오노포어 FCCP(카르보닐 시아나이드 4-(트리플루오로메톡시) 페닐하이드라존; 2 μM)를 마이크로플레이트의 각각의 웰에 시약 전달 챔버를 통해 순차적으로 주사하여, 최대 산소 소모율 값을 수득하였다. 최종적으로, 5 μM 안티마이신 A(미토콘드리아 복합체 III의 저해제)를 첨가하여, 호흡 변화가 주로 미토콘드리아 호흡으로 인한 것임을 확인하였다. 안티마이신 A 호흡율을 다른 3개의 호흡율로부터 차감시켜, 기저 미토콘드리아 호흡율, 언커플링(올리고마이신-내성) 미토콘드리아 호흡율 및 최대(FCCP-유도) 미토콘드리아 호흡율을 결정하였다.

[2051] 이 측정법을 사용하여, 공여자 Syn1 HeLa 세포는 활성 기저 산소 소모율 및 최대 산소 소모율을 보여준 한편, 푸소솜 전달이 없는 수여자 세포는 모든 3개의 상태의 미토콘드리아 산소 소모율을 낮은 속도로 보여준 것으로 결정되었다. 수여자 HeLa Rho0 세포로의 Syn1 HeLa 세포 푸소솜과 함께 미토콘드리아의 전달은 공여자 Syn1 HeLa 세포와 근처의 미토콘드리아 산소 소모율까지 복귀를 보여주었다(도 31).

[2052] 실시예 138: DNA의 시험관내 전달

[2053] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 생성된 푸소솜을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소솜을 발생시켰다. 대조군 입자(비-푸소솜 푸소솜)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 페이로드를 문헌[Lamichhane, TN, *et al.*, Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng*, (2016)]에 기재된 바와 같이 초음파처리에 의해 VSV-G 푸소솜 내로 로딩하였다. 이 실험에서, 핵산 페이로드는 SV40 핵 위치화 서열(ThermoFisher)과 함께 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제를 인코딩하는 플라스미드 DNA였다. 그 후에, CMV 프로모터의 조절 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포로의 페이로드 전달을 보여주고 처리하기 위해, DNA 로딩된 푸소솜을 사용하였다.

[2054] 간략하게는, 대략 6 푸소솜, 또는 80 μg의 표준 VSV-G 푸소솜 조제물에 상응하는 대조군 입자(비-푸소솜 푸소솜)를 140 μg DNA와 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 푸소솜(또는 대조군 입자)/핵산 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행하였다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4°C에서 5분 동안 원심분리하여, 핵산을 함유하는 푸소솜을 펠렛화하였다. 비혼입된 핵산을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 30 μL 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시켰다. DNA 로딩 후, 로딩된 푸소솜/대조군 입자를 사용 전에 얼음 상에 유지시켰다.

[2055] "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 완전 배지 내에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, DNA 로딩된 푸소솜을 LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP HEK-293T 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 8 μl의 DNA 로딩된 푸소솜 또는 8 μL의 DNA 로딩된 대조군 입자(비-푸소솜 푸소솜)로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베

이션하였다. 24시간 후, 플레이트를 37℃ 및 5% CO₂에서 30분 동안 완전 배지에 희석된 1 µg/mL Hoechst 33342와 함께 인큐베이션한 후, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 Hoechst 형광을 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하고, 수여자 세포의 GFP 형광을 488 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 RFP 형광을 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 1.25 µL Cre 리컴비나제 제시클(Takara, Cat # 631449)로 처리된 수여자 세포를 함유하는 양성-대조군 웰 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써, 웰 내 세포의 이미지를 획득하였다.

[2056] RFP, GFP 및 RFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에서 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. RFP-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

[2057] 이미지를 60 µm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre DNA를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, Cre DNA 전달을 받은 세포의 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 초음파처리를 통해 푸소좀 내로 로딩된 Cre DNA 페이로드를 받는 수여자 세포의 양을 기재한다.

[2058] 이 검정법을 이용하여, Cre DNA 로딩된 푸소좀은 총 GFP-양성 수여자 세포의 10.7 ± 3.3% RFP-양성 세포에 상응하는 Cre DNA의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 32). 비처리된 수여자 세포 또는 푸소좀 단독으로 처리된 세포, 또는 DNA 로딩된 대조군 입자는 임의의 인지할 만한 RFP-양성 세포를 보여주지 않았다.

[2059] 실시예 139: mRNA의 시험관내 전달

[2060] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 대조군 입자(비-푸소젠 푸소좀)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 페이로드를 문헌[Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)]에 기재된 바와 같이 초음파처리에 의해 VSV-G 푸소좀 내로 로딩하였다. 이 실험에서, 핵산 페이로드는 SV40 핵 위치화 서열(TriLink, Cat # L-7211)과 함께 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제를 인코딩하는, 시험관내에서 전사된 메신저 RNA였다. 그 후에, CMV 프로모터의 조절 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포의 페이로드 전달을 보여주고 처리하기 위해, mRNA 로딩된 푸소좀을 사용하였다.

[2061] 간략하게는, 대략 10⁶ 푸소좀, 또는 20 µl의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대조군 입자(비-푸소젠 푸소좀)를 10 µg mRNA와 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 푸소좀 (또는 대조군 입자)/핵산 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행하였다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4℃에서 5분 동안 원심분리하여, 핵산을 함유하는 푸소좀을 펠렛화하였다. 비혼입된 핵산을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 30 µL 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시켰다. mRNA 로딩 후, 로딩된 푸소좀/대조군 입자를 사용 전에 얼음 상에 유지시켰다.

[2062] "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 완전 배지 내에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, mRNA 로딩된 푸소좀을 LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP HEK-293T 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 8 µl의 mRNA 로딩된 푸소좀 또는 8 µL의 mRNA 로딩된 대조군 입자 (비-푸소젠 푸소좀)로 처리하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, 플레이트를 37℃ 및 5% CO₂에서 30분 동안 완전 배지에 희석된 1 µg/mL Hoechst 33342와 함께 인큐베이션한 후, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 Hoechst 형광을 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하고, 수여자 세포의 GFP 형광을 488 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 RFP 형광을 523 nm LED

및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, Cre 리컴비나제 제시클(Takara, Cat # 631449)로 처리된 수여자 세포를 함유하는 양성-대조군 웰 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써, 웰 내 세포의 이미지를 획득하였다.

[2063] RFP, GFP 및 RFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에서 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. RFP-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

[2064] 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre mRNA를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, Cre mRNA 전달을 받은 세포의 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 초음파처리를 통해 푸소즘 내로 로딩된 Cre mRNA 페이로드를 받는 수여자 세포의 양을 기재한다.

[2065] 이 검정법을 이용하여, Cre mRNA 로딩된 푸소즘은 총 GFP-양성 수여자 세포의 $52.8 \pm 7.8\%$ RFP-양성 세포에 상응하는 Cre mRNA의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 96). miRFP670 DNA 단독, 푸소즘 단독, 또는 초음파처리된 푸소즘 단독으로 처리된 수여자 세포는 임의의 인지할 만한 miRFP670-양성 세포를 보여주지 않았다.

[2066] *실시예 140: mRNA의 생체내 전달*

[2067] 이 실시예는 생체내에서 푸소즘을 통한 세포로의 메신저 RNA(mRNA)의 전달을 기재한다. 생체내에서 세포로의 mRNA의 전달은 수여자 세포 내에서 단백질의 발현을 초래하였다. 이러한 전달 방법을 사용하여, 존재하지 않는 단백질을 도입하였으며, 이는 loxp 부위의 절단 및 비-내인성 분자의 후속적인 발현을 허용할 것이다. 푸소즘은 제조 전 2시간 동안 급성 형질감염을 겪었으며; 이들 푸소즘을 본원에 기재된 방법을 사용하여 유래하였고, 파이어플라이 루시페라제 mRNA를 로딩하였다.

[2068] 제조 후, 푸소즘을 원심분리에 의해 펠렛화하고, 푸소즘 입자를 주사용 멸균 포스페이트 완충 식염수에 재현탁시켰다. 푸소즘이 결여된 완충된 용액을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[2069] 푸소즘을 9-주령 FVB(Jackson Laboratory, 001800) 마우스 내로 전경골근에 근육내(IM) 투여를 통해 전달하였다. 내용물의 계속된 멸균성을 보장하는 방식으로 상기 용액을 취급하였다. 마취를 유도 챔버(효과가 있기 위해 ~4% 이소플루란)에서 수행하였고, 가온된(35°C) 수술 테이블 상에 놓인 동물에서 노즈콘(효과가 있기 위해 ~2% 이소플루란)을 통해 유지시켰다. 전경골(TA) 근육의 중앙 벨리에 걸친 피부를, 상기 영역을 제모함으로써(45초 동안 Nair 제모제 크림, 뒤이어 상기 영역을 70% 에탄올로 세정함) 준비하였다. 투베르쿨린 주사기를 사용하여, 50 μl 의 푸소즘 용액 15 μg 단백질/ μL , 평균(SEM))을 TA의 벨리 내로 근육내 주사하였다. 주사의 완료 시, 주사기를 제거하고, 압력을 주사 부위에 적용하였다. 대측 다리를 대조군으로서 동일한 방법을 이용하여 PBS로 처리하였다.

[2070] 전달 후, mRNA 루시페라제를 수여자 세포질에서 루시페라제 단백질로 번역한다. D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)의 복강내(I.P.) 투여는 생체내 생물발광 이미징을 통한 루시페라제 발현의 검출을 가능하게 하였다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 콘 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓았다. 주사-후 3분 내지 35분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 최대 생물발광 신호를 관찰하였다. 최대 레이디언스를 광자/초/ cm^2 /라디안으로서 기록한다. 면적에 걸친 레이디언스를 통합하는 총 유속을, Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer) 내에서 관심 영역(ROI) 틀을 사용하여 정량화하고, 광자/초로서 기록한다. 푸소즘 처리된 전경골 근육 조직 및 PBS 처리된 전경골 근육 조직을 구체적으로, 음성 대조군(음성 대조군 언스레드(홍부) 및 병기)과 비교하여 레이디언스 측정에 대해 모니터링하였다. 측정을 주사-후 1, 6, 12, 24 및 48시간째에 수행하여, 파이어플라이 루시페라제 존재를 관찰하였다.

[2071] 파이어플라이 루시페라제 존재의 증거를 도 15a 내지 15b에 제시된 바와 같이 동물의 수여자 조직에서 생물발광 이미징에 의해 검출하였다. (a) 푸소즘(우측 다리) 처리된 마우스 대 PBS(좌측 다리) 처리된 FVB 마우스의 복부 이미지 및 발광 신호이다. 좌측면은 이미지와 발광 신호의 오버레이이고, 우측면은 발광 신호 단독이다. (b) 푸소즘 처리된 TA(질은 정상각형), PBS 처리된 TA(열린 원), 마우스 백그라운드(질은 육각형), 및 병기 백그라운드(열린 육각형)의 총 유속 신호이고; y-척도는 $\log_{10}$ 척도 상에 있다. 푸소즘 처리된 다리는 처리-후 1

($p < 0.0001$), 6 ($p < 0.01$) 및 12 ($p < 0.01$) 시간째에 유의하게 더 큰 신호를 가졌다.

[2072] 실시예 141: 단백질의 시험관내 전달

[2073] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터의 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 대조군 입자(비-푸소젠 푸소좀)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 페이로드를 문헌[Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)]에 기재된 바와 같이 초음파처리에 의해 VSV-G 푸소좀 내로 로딩하였다. 이 실험에서, 페이로드는 SV40 핵 위치화 서열 재조합 단백질(NEB, Cat # M0298M)을 갖는 박테리오파지 P1 Cre 리컴비나제였다. 그 후에, CMV 프로모터의 조절 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포로의 페이로드 전달을 보여주고 처리하기 위해, 단백질 로딩된 푸소좀을 사용하였다.

[2074] 간략하게는, 대략 10^6 푸소좀, 또는 20 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대조군 입자 (비-푸소젠 푸소좀)를 5 μ L 단백질 (NEB #M0298M)과 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 푸소좀 (또는 대조군 입자)/단백질 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행하였다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4°C에서 5분 동안 원심분리하여, 핵산을 함유하는 푸소좀을 펠렛화하였다. 비혼입된 단백질을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 30 μ L 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시켰다. 단백질 로딩 후, 로딩된 푸소좀/대조군 입자를 사용 전에 얼음 상에서 유지시켰다.

[2075] "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 완전 배지 내에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, 단백질 로딩된 푸소좀을 LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP HEK-293T 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 8 μ l의 단백질 로딩된 푸소좀 또는 8 μ L의 단백질 로딩된 대조군 입자 (비-푸소젠 푸소좀)로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 30분 동안 완전 배지에 희석된 1 μ g/mL Hoechst 33342와 함께 인큐베이션한 후, 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 Hoechst 형광을 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하고, 수여자 세포의 GFP 형광을 488 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 RFP 형광을 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, Cre 리컴비나제 제시클(Takara, Cat # 631449)로 처리된 수여자 세포를 함유하는 양성-대조군 웰 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써, 웰 내 세포의 이미지를 획득하였다.

[2076] RFP, GFP 및 RFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에서 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. RFP-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/).

[2077] 이미지를 60 μ m 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre 단백질 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, Cre 단백질 전달을 받은 세포의 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 초음파처리를 통해 푸소좀 내로 로딩된 Cre 단백질 페이로드를 받는 수여자 세포의 양을 기재한다.

[2078] 이 검정법을 이용하여, Cre 단백질 로딩된 푸소좀은 총 GFP-양성 수여자 세포의 $27.4 \pm 6.8\%$ RFP-양성 세포에 상응하는 Cre 단백질의 통계학적으로 유의한 수준을 보여주었다(도 35). 비처리된 수여자 세포 또는 푸소좀 단독으로 처리된 세포, 또는 단백질 로딩된 대조군 입자는 임의의 인지할 만한 RFP-양성 세포를 보여주지 않았다.

[2079] 실시예 142: 단백질 (BiVs- Cre 제시클)의 생체내 전달

- [2080] 이 실시예는 푸소좀에 의한 근육으로의 치료제의 전달을 기재한다. 푸소좀을 본원에 기재된 방법을 사용하여 유래하였고, CRE-리컴비나제 단백질을 로딩하였다.
- [2081] 푸소좀을 Loxp 루시퍼라제(Jackson Laboratory, 005125) 마우스 내로 전경골근에 근육내(IM) 투여를 통해 전달하였다. 내용물의 계속된 멸균성을 보장하는 방식으로 상기 용액을 취급하였다. 마취를 유도 챔버(효과가 있기 위해 ~4% 이소플루란)에서 수행하였고, 가온된(35℃) 수술 테이블 상에 놓인 동물에서 노즈콘(효과가 있기 위해 ~2% 이소플루란)을 통해 유지시켰다. 전경골(TA) 근육의 중앙 벨리에 걸친 피부를, 상기 영역을 제모함으로써(45초 동안 Nair 제모제 크림, 뒤이어 상기 영역을 70% 에탄올로 세정함) 준비하였다. 투베르쿨린 주사기를 사용하여, 50 μ l의 푸소좀 용액 ($8.5e8 \pm 1.4e8$ 입자/ μ L, 평균(SEM))을 TA의 벨리 내로 근육내 주사하였다. 주사의 완료 시, 주사기를 제거하고, 압력을 주사 부위에 적용하였다. 대측 다리를 처리하지 않았다.
- [2082] 융합 후, CRE 단백질은 재조합을 수행하기 위해 핵으로 전좌하고, 이는 루시퍼라제의 구성적 발현을 초래하였다. D-루시페린(Perkin Elmer, 150 mg/kg)의 복강내 투여는 생체내 생물발광 이미징을 통한 루시퍼라제 발현의 검출을 가능하게 하였다. 동물을, 상기 동물의 움직임을 방지하기 위해 큰 마취제(이소플루란)가 들어 있는 생체내 생물발광 이미징 챔버(Perkin Elmer) 내에 놓았다. 주사-후 3분 내지 35분 사이에 광자 수합을 수행하여, D-루시페린 약역학 청소로 인한 최대 생물발광 신호를 관찰하였다. 최대 레이디언스를 광자/초/ cm^2 /라디안으로서 기록한다. 면적에 걸친 레이디언스를 통합하는 총 유속을, Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer) 내에서 관심 영역(ROI) 툴을 사용하여 정량화하고, 광자/초로서 기록한다. 푸소좀 처리된 전경골 근육 조직을 구체적으로, 음성 대조군(음성 대조군 언스레디드(흉부), 대측 뒷다리 및 병기)과 비교하여 레이디언스 측정에 대해 모니터링하였다. 측정을 주사-후 제14일에 수행하여, 파이어플라이 루시퍼라제 존재를 관찰하였다.
- [2083] 푸소좀에 의한 단백질 (Cre 리컴비나제) 전달의 증거를 도 36a 내지 36b에 제시된 바와 같이 동물의 수여자 조직에서 생물발광 이미징에 의해 검출하였다.
- [2084] 실시예 143: 푸소좀에서 핵산의 초음파처리-매개 로딩
- [2085] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 그 후에, 핵산 페이로드를 문헌[Lamichane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)]에 기재된 바와 같이 초음파처리에 의해 VSV-G 푸소좀 내로 로딩하였다. 이 실험에서, 핵산 페이로드는 형광 단백질 mRFP670을 인코딩하는 DNA 플라스미드였다. 그 후에, CMV 프로모터의 조절 하에 "Loxp-BFP-정지-Loxp-클로버" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포로의 페이로드 전달을 보여주고 처리하기 위해, 핵산-로딩된 푸소좀을 사용하였다.
- [2086] 간략하게는, 50 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 10^6 푸소좀을 10 μ g 핵산과 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 푸소좀/핵산 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Branson 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행하였다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4℃에서 5분 동안 원심분리하여, 핵산을 함유하는 푸소좀을 펠렛화하였다. 비혼입된 핵산을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시켰다. DNA 로딩 후, 로딩된 푸소좀을 사용 전에 얼음 상에 유지시켰다.
- [2087] "Loxp-BFP-정지-Loxp-클로버" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 완전 배지 내에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 4 내지 6시간째에, DNA 로딩된 푸소좀을 DMEM 배지 중 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 4 μ l의 DNA 로딩된 푸소좀으로 처리하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 플레이트를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotech.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 BFP 형광을 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 클로버 형광을 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, mRFP670을 623 nm LED 및 Cy5 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아데노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써, 세포 웰의 이미지를 획득하였다.

- [2088] BFP, 클로버 및 miRFP670 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에 자동포커싱하고, 그 후에 클로버 및 miRFP670 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써, 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. miRFP670-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다 (www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/).
- [2089] 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 BFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, 너무 작거나 너무 큰 BFP-양성 세포를 배제하였다. 동일한 분석 단계를 클로버 및 miRFP670 채널에 적용하였다. 그 후에, miRFP670-양성 세포(miRFP670 DNA 플라스미드를 받는 수여자 세포)의 수를 BFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, miRFP670 DNA 전달 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 초음파처리를 통해 푸소좀 내로 로딩된 miRFP670 페이로드를 받는 수여자 세포의 양을 기재한다.
- [2090] 이 검정법을 이용하여, miRFP670 DNA 로딩된 푸소좀은 총 BFP-양성 수여자 세포의 $2.9 \pm 0.4\%$ miRFP670-양성 세포에 상응하는 miRFP670 전달의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 37). miRFP670 DNA 단독, 푸소좀 단독, 또는 초음파처리된 푸소좀 단독으로 처리된 수여자 세포는 임의의 인지할 만한 miRFP670-양성 세포를 보여주지 않았다(<0.5%로서 정의됨).
- [2091] 실시예 144: 푸소좀에서 단백질의 초음파처리-매개 로딩
- [2092] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하고 Cre 리컴비나제 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 그 후에, 단백질 페이로드를 문헌[Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)]에 기재된 바와 같이 초음파처리에 의해 VSV-G 푸소좀 내로 로딩하였다. 이 실험에서, 단백질 페이로드는 형광 염료 Alexa 플루어 647에 공액된 소 혈청 알부민 단백질(BSA-AF647; ThermoFisher Cat #A34785)이었다. 그 후에, CMV 프로모터의 조절 하에 "Loxp-BFP-정지-Loxp-클로버" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포로의 페이로드 전달을 보여주고 처리하기 위해, 단백질-로딩된 푸소좀을 사용하였다.
- [2093] 간략하게는, 50 μl 의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 10^6 푸소좀을 10 μg BSA-AF647과 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 푸소좀/단백질 혼합물을 40 kHz에서 작동되는 수조 초음파처리기(Brason 모델 #1510R-DTH)를 사용하여 실온에서 30초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 혼합물을 얼음 상에 1분 동안 놓아 두고, 뒤이어 40 kHz에서 30초 동안 초음파처리의 제2 라운드를 수행하였다. 그 후에, 혼합물을 16,000g에서 4°C에서 5분 동안 원심분리하여, BSA-AF647을 함유하는 푸소좀을 펠렛화하였다. 비혼입된 단백질을 함유하는 상층액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트-완충 식염수에 재현탁시켰다. 단백질 로딩 후, 로딩된 푸소좀을 사용 전에 얼음 상에 유지시켰다.
- [2094] "Loxp-BFP-정지-Loxp-클로버" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내로 완전 배지 내에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 4 내지 6시간째에, BSA-AF647 로딩된 푸소좀을 DMEM 배지 중 표적 또는 비-표적 수여자 세포에 적용하였다. 수여자 세포를 4 μl 의 BSA-AF647 로딩된 푸소좀으로 처리하고, 37°C 및 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 플레이트를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 BFP 형광을 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 클로버 형광을 465 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하는 한편, BSA-AF647을 623 nm LED 및 Cy5 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, 푸소좀 대신에 Cre 리컴비나제를 코딩하는 아테노바이러스로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써, 세포 웰의 이미지를 획득하였다.
- [2095] BFP, 클로버 및 BSA-AF647 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에 자동포커싱하고, 그 후에 클로버 및 BSA-AF647 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써, 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. BSA-AF647-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다 (www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/).
- [2096] 이미지를 60 μm 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보

다 유의하게 높은 BFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, 너무 작거나 너무 큰 BFP-양성 세포를 배제하였다. 동일한 분석 단계를 클로버 및 BSA-AF647 채널에 적용하였다. 그 후에, BSA-AF647-양성 세포(BSA-AF647 단백질을 수여자 세포)의 수를 BFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, BSA-AF647 전달 퍼센트를 정량화하였으며, 이는 초음파처리를 통해 푸소좀 내로 로딩된 BSA-AF647 단백질 페이로드를 받는 수여자 세포의 양을 기재한다.

[2097] 이 검정법을 이용하여, BSA-AF647 로딩된 푸소좀은 총 BFP-양성 수여자 세포의 $43.2 \pm 0.2\%$ BSA-AF647-양성 세포에 상응하는 BSA-AF647 전달의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 38). BSA-AF647 단독, 푸소좀 단독, 또는 초음파처리된 푸소좀 단독으로 처리된 수여자 세포는 임의의 인지할 만한 BSA-AF647-양성 세포를 보여주지 않았다(<5%로서 정의됨).

[2098] 실시예 145: 푸소좀 고스트의 발생 및 단리

[2099] 이 실시예는 저장성 처리 및 원심분리를 통한 푸소좀 발생 및 단리를 기재한다. 이것은 푸소좀이 생성될 수 있는 방법 중 하나이다.

[2100] 본원에 기재된 바와 같이, 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 푸소좀 고스트를 발생시켰다. 푸소좀 고스트를 발생시키고, 형광 나노입자 추적 분석(fNTA)에 의해 분석하였다.

[2101] 푸소좀을 하기와 같이 제조하였다. 100 mm 콜라겐 코팅된 디쉬에서 7.5 ml의 완전 배지(DMEM + 10% FBS + 1x Pen/Strep)에서 15 μ g의 pcDNA3.1 빈 발현 플라스미드 및 VSVg에 대한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 10 μ g의 pcDNA3.1 발현 플라스미드를 함유하는 중합체성 형질감염 시약을 사용하여, 9.2×10^6 HEK-293T를 역 형질감염시켰다. 푸소좀 고스트를 생성하기 위해, 형질감염 후 24시간째에, 세포를 스페이트-완충 식염수(PBS)로 세척하고, TrypleE로 분해시키고, 500xg에서 5분 동안 원심분리하고, 배지에 재현탁시켰다. 1×10^7 세포를 7 ml의 PBS에 재현탁시키고, 500x g에서 5분 동안의 원심분리를 통해 펠렛화하였다. 상기 세포를 냉각된 TM 완충제(10 mM Tris, 1.6 mM MgCl₂, pH 7.4)에 재현탁시키고, 27% 진폭(ColeParmer Cat #CPX130)에서 5초 동안 초음파처리하였다. 초음파처리 직후, 수크로스 (60% w/v)를 함유하는 TM 완충제를 0.25M 수크로스의 최종 농도로 용액에 첨가하였다. 그 후에, 상기 용액을 6,000x g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 폐기하고, 펠렛을 0.25M 수크로스 TM 완충제, pH 7.4에서 2회 세척하였다. 그 후에, 상기 펠렛을 0.25M 수크로스 TM 완충제, pH 7.4에 재현탁시키고, 그 후에, 재현탁된 펠렛을 27% 진폭(ColeParmer Cat #CPX130)에서 5초 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 상기 용액을 6,000x g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 폐기하고, 펠렛을 0.25M 수크로스 TM 완충제, pH 7.4에서 2회 세척하였다. 그 후에, 상기 펠렛을 0.25M 수크로스 TM 완충제, pH 7.4에 재현탁시키고, 그 후에, 재현탁된 펠렛을 27% 진폭(ColeParmer Cat #CPX130)에서 2분 동안 초음파처리하였다. 그 후에, 상기 용액을 800x g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고, 그 후에 0.45 μ m 주사기 필터를 통해 여과하였다.

[2102] 최종적으로, 푸소좀 고스트를 농축시키기 위해, 그 후에 상기 용액을 150,000x g, 4℃에서 45분간 초원심분리하고, 푸소좀 고스트를 함유하는 펠렛을 PBS에 재현탁시켰다. fNTA를 통해 푸소좀 고스트 조성물을 분석하기 위해, 상기 푸소좀 고스트를 CellMask Orange(ThermoFisher)와 1:1로 인큐베이션하고, 그 후에, 1:1000으로 희석시킨 후, 추적 장비 내로 로딩하고, 제조업체의 설명에 따라 분석하였다. 푸소좀 고스트의 크기 분포를 도 39에 제시한다. VSV-G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 고스트의 제조에 의해, 푸소좀을 성공적으로 발생시켰다.

[2103] 실시예 146: 푸소좀에서 번역 활성의 결여

[2104] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 대조군 입자(비-푸소좀 푸소좀)를, pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 푸소좀의 번역 활성을, Click-iT EU 이미징 키트(ThermoFisher)를 사용함으로써 푸소좀 발생에 사용된 부모 세포, 예를 들어 공급원 세포와 비교하였다.

[2105] 간략하게는, 푸소좀을 발생시키는 데 사용된 1×10^6 부모 세포 및 60 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 3×10^6 푸소좀을 37℃ 및 5% CO₂에서 4시간 동안, 1 mM 형광-태깅 가능한 알킨-뉴클레오타이드 EdU를 함유하는 완전에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트 내 1 mL의 완전 배지에서 3번 중복하여 평판배양하였다. 음성

대조군의 경우, 3×10^6 푸소좀을 알킨-뉴클레오사이드 EU가 없는 완전 배지에서 6 웰 저-부착 다중-웰 플레이트에 평판배양하였다. 4시간 인큐베이션 후, 시료를 제조업체의 설명서(ThermoFisher Scientific)에 따라 가공하였다. 간략하게는, 음성 대조군을 포함하는 세포 및 푸소좀 시료를 1xPBS 완충제로 3회 세척하고, 1xPBS 완충제에 재현탁시키고, 하기 표에서 제시된 바와 같이, 여기를 위해 638 nm 레이저 및 670 +/- 14nm 필터 방출을 사용하여 유세포분석(Attune, ThermoFisher)에 의해 분석하였다(표 M). Attune NxT 소프트웨어를 획득에 사용하였고, FlowJo를 분석에 사용하였다. 데이터 획득을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 670 +/- 14 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 세포 또는 푸소좀 게이트 내의 최소 10,000 사건을 각각의 조건에 대해 수합하였다.

[2106] 데이터 분석을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 670 +/- 14 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 음성 대조군 670 +/- 14 nm 방출을 사용하여, 게이트를 히스토그램 상의 어디에 놓는지 결정하였으며, 따라서 이는 상기 게이트가 1% 미만의 양성을 포함하였다. 상기 열거된 분석 기준을 사용하여, 부모 세포는 새로 합성되는 DNA에 Eu를 포함시킴으로써 번역 활성의 대리 측정치로서 $56.17\% \pm 8.13$ Edu:647 사건을 실증하였고, 여기서, 푸소좀은 $6.23\% \pm 4.65$ AF488 사건을 실증하였다(도 40, 좌측 패널). 따라서, AF647의 중앙값 형광 강도, Edu 혼입의 측정치, 및 새로 합성된 DNA의 상대 측정치는 부모 세포에 대해 1311 ± 426.2 사건이고, 푸소좀에 대해 116.6 ± 40.74 이었다(도 40, 우측 패널). 이는, 푸소좀이 부모 세포에 비해 번역 활성이 결여되어 있음을 실증한다.

표 M: 유세포분석기 세팅

염료	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
AF47	RL1	638	670/14

[2107]

[2108] 실시예 147: 이동성을 위해 액틴을 중합하는 능력의 측정

[2109] 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 푸소좀을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해 푸소좀을 발생시켰다. 대조군 입자(비-푸소좀 푸소좀), pcDNA3.1 빈 벡터로 일시적으로 역 형질감염된 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, 푸소좀 및 부모 세포를, (시간 경과에 따라) 액틴을 중합하는 이들의 능력에 대해 로다민 팔로이딘-유세포분석 검정법 및 튜블린 ELISA를 사용하여 검정하였다. 간략하게는, 푸소좀을 발생시키는 데 사용된 1×10^5 부모 세포 및 60 μ l의 표준 VSV-G 푸소좀 조제물에 상응하는 대략 1×10^6 푸소좀을 37°C 및 5% CO₂에서, 완전에서 96 웰 저-부착 다중-웰 플레이트 내 1 mL의 완전 배지에서 평판배양하고 인큐베이션하였다. 시료를 평판배양 후 3시간, 5시간 및 24시간째에 주기적으로 취하였다. 시료를 21,000xg에서 10분 동안 원심분리하고, 포스페이트 완충 식염수 중 200 μ l 4% (v/v) PFA에서 10분 동안 재현탁시키고, 1 mL의 포스페이트 완충 식염수로 세척하고, 21,000xg에서 10분 동안 원심분리하고, 다시 세척하고, 추가로 사용할 때까지 4°C에 저장하였다.

[2110] 로다민-팔로이딘 염색을 위해, 시료를 21,000xg에서 10분 동안 원심분리하고, 포스페이트 완충 식염수 중 100 μ l의 0.1% (v/v) 트리톤 X-100에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 20분간의 인큐베이션 후, 165 μ M 로다민-팔로이딘을 함유하는 포스페이트 완충 식염수 중 부가적인 100 μ l의 0.1% (v/v) 트리톤 X-100을 시료에 첨가하고, 피펫팅하여 혼합하고, 음성 대조군은 포스페이트 완충 식염수 중 부가적인 100 μ l의 0.1% (v/v) 트리톤 X-100만 받았다. 시료를 45분 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 포스페이트 완충 식염수로 세척하고, 21,000xg에서 10분 동안 원심분리하고, 다시 세척하고, 300 μ l의 포스페이트 완충 식염수에 재현탁시키고, 하기 표에서 제시된 바와 같이, 여기를 위해 561 nm 레이저 및 585 +/- 16 nm 필터 방출을 사용하여 유세포분석(Attune, ThermoFisher)에 의해 분석하였다:

[2111] 유세포분석기 세팅

염료	Attune 레이저/필터	레이저 파장	방출 필터 (nm)
AF47	YL1	585	585/16

[2112]

[2113] Attune NxT 소프트웨어를 획득에 사용하였고, FlowJo를 분석에 사용하였다. 데이터 획득을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 585 +/- 16 nm 방출 채널에서 사건을 제시하

였다. 세포 또는 푸소좀 게이트 내의 최소 10,000 사건을 각각의 조건에 대해 수합하였다. 데이터 분석을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 세포 또는 푸소좀을 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 게이트 내부에만 있는 사건을 사용하여, 로그 척도 상에서 585 +/- 16 nm 방출 채널에서 사건을 제시하였다. 음성 대조군 585 +/- 16 nm 방출을 사용하여, 게이트를 히스토그램 상의 어디에 놓는지 결정하였으며, 따라서 이는 상기 게이트가 1% 미만의 양성을 포함하였다. 상기 열거된 분석 기준을 사용하여, 부모 세포는 3시간, 5시간 및 24시간 시점에서 각각 19.9%, 24.8% 및 82.5% 로다민-팔로이딘 양성 사건을 실증하였다. 푸소좀은 3시간, 5시간 및 24시간 시점에서 각각 44.6%, 41.9% 및 34.9% 로다민-팔로이딘이었다(도 14d). 이 실시예는, 푸소좀이 시간 경과에 따라 액틴의 양을 증가시키지 않는 반면, 부모 세포는 액틴의 양을 증가시키는 것을 실증한다.

[2114] 실시예 148: 수여자 세포 조성물의 면역원성

[2115] 1. IgG 및 IgM 반응

[2116] 이 실시예는 유세포분석을 사용하여, 수여자 세포(푸소좀과 융합된 세포)에 대한 항체 역가의 정량화를 기재한다. 수여자 세포의 면역원성의 측정은 항체 반응이다. 수여자 세포를 인지하는 항체는 세포 활성 또는 수명을 제한할 수 있는 방식으로 결합할 수 있다. 일 구현예에서, 수여자 세포는 항체 반응에 의해 표적화되지 않을 것이며, 또는 항체 반응은 기준 수준보다 낮을 것이다.

[2117] 이 실시예에서, 대상체(예를 들어 인간, 래트 또는 원숭이)에서 항-수여자 세포 항체 역가를 시험한다. 또한, 프로토콜을, 적합한 표면 마커가 존재하는 임의의 세포 유형에 적응시킬 수 있다. 이 실시예에서, 표적 수여자 세포는 CD3+ 세포이다.

[2118] 마우스를 5일 동안 매일, 본 출원에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소좀으로 처리하거나, PBS(음성 대조군)로 처리한다. 최종 처리 후 28일째에, 푸소좀을 받은 마우스 및 PBS 처리를 받은 마우스로부터 말초 혈액을 수합한다. 혈액을 5 μ M EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 수합하고, 응고를 방지하기 위해 즉시 혼합한다. 튜브를 얼음 상에 유지시키고, 적혈구를 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 용액을 사용하여 제거한다. 세포를, 10분 동안 소 혈청 알부민으로 블라킹시킨 후, 묶인 CD3-FITC 항체(Thermo Fisher 카탈로그 #:11-0032-82)로 암실에서 4°C에서 30분 동안 염색한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA.) 상에서 488 nm 레이저 여기를 이용하여 분석하고, FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 진행시키면서 530+/-30 nm에서 방출을 수합한다. CD3+ 세포를 소팅한다.

[2119] 그 후에, 소팅된 CD3+ 세포를, 반응 혼합물을 마우스 IgM(BD Bioscience)의 Fc 부분에 특이적인 PE-공액 염소 항체와 함께 4°C에서 45분 동안 인큐베이션함으로써, IgM 항체로 염색한다. 주목할 만하게는, 항-마우스 IgG1 또는 IgG2 2차 항체를 또한, 사용할 수 있다. 모든 그룹으로부터의 세포를 2% FCS를 함유하는 PBS로 2회 세척하고, 그 후에 FACS 시스템(BD Biosciences) 상에서 분석한다. 형광 데이터를 로그 증폭의 사용에 의해 수합하고, 평균 형광 강도로서 표현한다. 평균 형광 강도를, 푸소좀으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터 소팅된 CD3 세포에 대해 계산한다.

[2120] 낮은 평균 형광 강도는 수여자 세포에 대한 낮은 체액성 반응을 나타낸다. PBS로 처리된 마우스는 낮은 평균 형광 강도를 갖는 것으로 예상된다. 일 구현예에서, 평균 형광 강도는 푸소좀으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터의 수여자 세포에 대해 유사할 것이다.

[2121] 2. 대식세포 식작용

[2122] 이 실시예는 식작용 검정법을 이용하여 수여자 세포에 대한 대식세포 반응의 정량화를 기재한다.

[2123] 수여자 세포의 면역원성의 측정은 대식세포 반응이다. 대식세포는 식작용에 포식 세포를 고용하고, 박테리아 또는 사멸된 세포와 같은 외래 침입자의 격리 및 파괴를 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 대식세포에 의한 수여자 세포의 식작용은 이들의 활성을 감소시킬 것이다.

[2124] 일 구현예에서, 수여자 세포는 대식세포에 의해 표적화되지 않는다. 이 실시예에서, 대상체에서 수여자 세포에 대한 대식세포 반응을 시험한다. 또한, 프로토콜을, 적합한 표면 마커가 존재하는 임의의 세포 유형에 적응시킬 수 있다. 이 실시예에서, 표적 수여자 세포는 CD3+ 세포이다.

[2125] 마우스를 5일 동안 매일, 본 출원에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소좀으로 처리하거나, PBS(음성 대조군)로 처리한다. 최종 처리 후 28일째에, 푸소좀을 받은 마우스 및 PBS 처리를 받은 마우스로부터 말초 혈액을 수합한다. 혈액을 5 μ M EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 수합하고, 응고를 방지하기 위해 즉시 혼합하였다. 튜

브를 얼음 상에 유지시키고, 적혈구를 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 용액을 사용하여 제거하였다.

- [2126] 세포를, 10분 동안 소 혈청 알부민으로 블라킹시킨 후, 뮤린 CD3-FITC 항체(Thermo Fisher 카탈로그 #:11-0032-82)로 암실에서 4℃에서 30분 동안 염색한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA.) 상에서 488 nm 레이저 여기를 이용하여 분석하고, FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 진행시키면서 530+/-30 nm에서 방출을 수합한다. 그 후에, CD3+ 세포를 소팅한다.
- [2127] 식작용 검정법을 진행시켜, 대식세포-매개 면역 청소를 하기 프로토콜에 따라 평가한다. 대식세포를 수합 직후, 공초점 유리 바닥 디쉬에 평판배양한다. 대식세포를 DMEM+10%FBS+1%P/S에서 1시간 동안 인큐베이션하여, 부착되게 한다. 푸소좀 및 PBS를 받은 마우스로부터 유래된, 적절한 수의 소팅되고 FITC-염색된 CD3+ 세포를 프로토콜에서 제시된 바와 같이 대식세포에 첨가하고, 예를 들어 tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf에 기재된 바와 같이 2시간 동안 인큐베이션한다.
- [2128] 2시간 후, 디쉬를 부드럽게 세척하고, 세포내 형광을 검사한다. 대식세포를 식별하기 위해, 우선, Fc 수용체로 표지된 mAb이 결합을 블라킹시키기 위해 세포를 얼음 상에서 Fc-수용체 블라킹 항체(EBioscience cat. no. 14-0161-86, 클론 93)와 함께 15분 동안 인큐베이션하고, 상기 수용체는 대식세포 상에서 풍부하게 발현된다. 이 단계 후, 항-F4/80-PE(ThermoFisher cat. No. 12-4801-82, 클론 BM8) 및 항-CD11b-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences cat. No. 550993, 클론 M1/70) 공액 항체를 첨가하여, 대식세포 표면 항원을 염색한다. 세포를 암실에서 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 뒤이어 원심분리하고 PBS에서 세척한다. 그 후에, 세포를 PBS에 재현탁시킨다. 그 후에, 시료의 유세포분석을 수행하고, 대식세포를 533 nm 및 647 nm 레이저 여기를 각각 사용하여 F4/80-PE 및 CD11b-PerCP-Cy5.5에 대한 양성 형광 신호를 통해 식별한다. 대식세포에 대해 게이팅한 후, 포식된 수여자 세포에 의해 방출된 세포내 형광을 488 nm 레이저 여기에 의해 평가한다. 식세포 양성 대식세포의 수를 이미징 소프트웨어를 사용하여 정량화한다. 데이터를 식세포 지수 = (포식된 세포의 총 수/계수된 대식세포의 총 수) X (포식된 세포를 함유하는 대식세포의 수/계수된 대식세포의 총 수) X 100으로서 표현한다.
- [2129] 낮은 식세포 지수는 대식세포에 의한 낮은 식작용 및 표적화를 나타낸다. PBS로 처리된 마우스는 낮은 식세포 지수를 갖는 것으로 예상된다. 일 구현예에서, 식세포 지수는 푸소좀으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터 유래된 수여자 세포에 대해 유사할 것이다.
- [2130] 3. PBMC 용해에 의해 측정된 세포독성
- [2131] 이 실시예는 세포 용해 검정법을 이용하여 수여자 세포에 대한 PBMC 반응의 정량화를 기재한다.
- [2132] 수여자 세포의 면역원성의 측정은 PBMC 반응이다. 일 구현예에서, PBMC에 의한 수여자 세포의 세포독성-매개 세포 용해는, 용해가 푸소좀의 활성을 감소시키거나, 예를 들어 저해하거나 중단시킬 것이기 때문에, 면역원성의 측정이다.
- [2133] 일 구현예에서, 수여자 세포는 PBMC 반응을 도출하지 않는다. 이 실시예에서, 대상체에서 수여자 세포에 대한 PBMC 반응을 검사한다.
- [2134] 또한, 프로토콜을, 적합한 표면 마커가 존재하는 임의의 세포 유형에 적응시킬 수 있다. 이 실시예에서, 표적 수여자 세포는 CD3+ 세포이다.
- [2135] 마우스를 5일 동안 매일, 본 출원에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소좀으로 처리하거나, PBS(음성 대조군)로 처리한다. 최종 처리 후 28일째에, 푸소좀을 받은 마우스 및 PBS 처리를 받은 마우스로부터 말초 혈액을 수합한다. 혈액을 5 μM EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 수합하고, 응고를 방지하기 위해 즉시 혼합하였다. 튜브를 얼음 상에 유지시키고, 적혈구를 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 용액을 사용하여 제거하였다. 세포를 세포 염색 완충제(Biolgend 카탈로그 #: 420201)에서 10분 동안 Fc 블라킹시킨 후(Biolgend 카탈로그 #: 101319), 암실에서 4℃에서 30분 동안 뮤린 CD3:APC-Cy7 항체(Biolgend 카탈로그 #: 100330) 또는 이소타입 대조군 APC-Cy7(IC:APC-Cy7) 항체(Biolgend 카탈로그 #: 400230)로 염색한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 FACS Aria(BD Biosciences, San Jose, CA.) 상에서 640 nm 레이저 여기를 이용하여 분석하고, FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 진행시키면서 780 +/- 60에서 방출을 수합하여, 이소타입 대조군 APC-Cy7 항체 표지된 세포를 사용하여 음성 게이트를 설정하고, 그 후에, APC-Cy7 양성 세포를 소팅하고 수합한다. 그 후에, 소팅된 CD3+ 세포를 CellMask™ 그린 형질막 염색(CMG, ThermoFisher 카탈로그 #: C37608)으로 표지하거나, 음성 대조군으로서 DMSO로 표지한다.
- [2136] 푸소좀 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 CD3+ 세포를 분리하기 전 7일째에, PBMC를, 문헌[Crop et al. Cell

transplantation (20):1547-1559; 2011]에 기재된 방법에 따라 푸소좀 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 단리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37℃에서 7일 동안 IL-2 재조합 마우스 단백질(R&D 시스템 카탈로그 #: 402-ML-020) 및 CD3/CD28 비드(ThermoFisher 카탈로그 #: 11456D)의 존재 하에 자극시킨다. 제7일에, 자극된 PBMC를, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 PBMC:CD3+/CMG+ 또는 PBMC: CD3+/DMSO 대조군 세포의 평판배양 비에서 CD3+/CMG+ 또는 CD3+/DMSO 대조군 세포와 함께 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 공동-인큐베이션한다. 음성 대조군 웰 세트는 CD3+/CMG+ 및 CD3+/DMSO 대조군 세포만 받을 것이고, PBMC는 받지 않을 것이다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 이들 플레이트를 상기에 따라 무린 CD3:APC-Cy7 항체 또는 IC:APC-Cy7 항체로 표지하도록 가공한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 PBS에 재현탁시키고, FACS Aria (APC-Cy7: 640 nm 레이저 여기/방출은 780 +/- 60 nm 및 CMG 561 nm 레이저 여기에서 수합되고/방출은 585 +/- 16 nm에서 수합된) 상에서 FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 사용하여 분석한다. 그 후에, FSC/SSC 사건 데이터는 처음에, 사건 표지된 "세포"에 대한 게이트를 설정하는 데 사용될 것이다. 그 후에, 이러한 "세포" 게이트를 사용하여, IC:APC-Cy7/DMSO 단독으로 표지된 시료를 분석하는 640 nm 및 561 nm 레이저에 대한 PMT 전압을 설정하도록 사건을 제시한다. 이 시료를 또한 사용하여, APC-Cy7 및 CMG 둘 모두에 대해 음성인 세포에 대한 게이트로서 설정할 것이다. 그 후에, 임의의 PBMC를 받지 않은 CD3+/CMG+ 세포를 사용하여, CD3+ 및 CMG+ 세포에 대한 양성 게이트를 설정할 것이다.

[2137] 총 세포 집단에서 CD3+/CMG+ 세포의 퍼센트를 살펴봄으로써 데이터를 분석한다. 치료군을 비교할 때, PBMC:CD3+/CMG+ 세포의 임의의 주어진 검정법 비에서 CD3+/CMG+ 세포의 상대적으로 더 낮은 퍼센트는 수여자 세포 용해를 나타낸다. 일 구현예에서, CD3+/CMG+의 퍼센트는 푸소좀으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터 유래된 수여자 세포에 대해 유사할 것이다.

[2138] 4. NK 세포 표적화

[2139] 이 실시예는 세포 용해 검정법을 이용하여 수여자 세포에 대한 자연 살해 세포 반응의 정량화를 기재한다.

[2140] 수여자 세포의 면역원성의 측정은 자연 살해 세포 반응이다. 일 구현예에서, 자연 살해 세포에 의한 수여자 세포의 세포독성-매개 세포 용해는, 용해가 푸소좀의 활성을 감소시키거나, 예를 들어 저해하거나 중단시킬 것이기 때문에, 면역원성의 측정이다.

[2141] 일 구현예에서, 수여자 세포는 자연 살해 세포 반응을 도출하지 않는다. 이 실시예에서, 대상체에서 수여자 세포에 대한 자연 살해 반응을 검사한다. 또한, 프로토콜을, 적합한 표면 마커가 존재하는 임의의 세포 유형에 적용시킬 수 있다. 이 실시예에서, 표적 수여자 세포는 CD3+ 세포이다.

[2142] 마우스를 5일 동안 매일, 본 출원에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소좀으로 처리하거나, PBS(음성 대조군)로 처리한다. 최종 처리 후 28일째에, 푸소좀을 받은 마우스 및 PBS 처리를 받은 마우스로부터 말초 혈액을 수합한다. 혈액을 5 μM EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 수합하고, 응고를 방지하기 위해 즉시 혼합하였다. 튜브를 얼음 상에 유지시키고, 적혈구를 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 용액을 사용하여 제거하였다. 세포를 세포 염색 완충제(Biolgend 카탈로그 #: 420201)에서 10분 동안 Fc 블라킹시킨 후(Biolgend 카탈로그 #: 101319), 암실에서 4℃에서 30분 동안 무린 CD3:APC-Cy7 항체(Biolgend 카탈로그 #: 100330) 또는 이소타입 대조군 APC-Cy7 항체(Biolgend 카탈로그 #: 400230)로 염색한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 FACS Aria(BD Biosciences, San Jose, CA.) 상에서 640 nm 레이저 여기를 이용하여 분석하고, FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 진행시키면서 780 +/- 60에서 방출을 수합하여, 이소타입 대조군 APC-Cy7 항체 표지된 세포를 사용하여 음성 게이트를 설정하고, 그 후에, APC-Cy7 양성 세포를 소팅하고 수합한다. 그 후에, 소팅된 CD3+ 세포를 CellMask™ 그린 형질막 염색(CMG, ThermoFisher 카탈로그 #: C37608)으로 표지한다.

[2143] 푸소좀 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 CD3+ 세포를 단리하기 전 7일째에, NK 세포를, 문헌[Crop et al. Cell transplantation (20):1547-1559; 2011]에 기재된 방법에 따라 푸소좀 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 단리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37℃에서 7일 동안 IL-2 재조합 마우스 단백질(R&D 시스템 카탈로그 #: 402-ML-020) 및 CD3/CD28 비드(ThermoFisher 카탈로그 #: 11456D)의 존재 하에 자극시킨다. 제7일에, 자극된 NK 세포를, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 NK 세포:CD3+/CMG+ 또는 NK 세포:CD3+/DMSO 대조군 세포의 평판배양 비에서 CD3+/CMG+ 또는 CD3+/DMSO 대조군 세포와 함께 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 공동-인큐베이션한다. 음성 대조군 웰 세트는 CD3+/CMG+ 및 CD3+/DMSO 대조군 세포만 받을 것이고, NK 세포는 받지 않을 것이다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 이들 플레이트를 상기에 따라 무린 CD3:APC-Cy7 항체 또는 IC:APC-Cy7 항체로 표지하도록 가공한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 PBS에 재현탁시키고, FACS Aria (APC-Cy7: 640 nm 레이저 여기/방출은 780 +/- 60 nm 및 CMG 561 nm 레이저 여기에서 수합되고/방출

은 585 $\pm$ 16 nm에서 수합된) 상에서 FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 사용하여 분석한다. 그 후에, FSC/SSC 사건 데이터는 처음에, 사건 표지된 "세포"에 대한 게이트를 설정하는 데 사용될 것이다. 그 후에, 이러한 "세포" 게이트를 사용하여, IC:APC-Cy7/DMSO 단독으로 표지된 시료를 분석하는 640 nm 및 561 nm 레이저에 대한 PMT 전압을 설정하도록 사건을 제시한다. 이 시료를 또한 사용하여, APC-Cy7 및 CMG 둘 모두에 대해 음성인 세포에 대한 게이트로서 설정할 것이다. 그 후에, 임의의 NK 세포를 받지 않은 CD3+/CMG+ 세포를 사용하여, CD3+ 및 CMG+ 세포에 대한 양성 게이트를 설정할 것이다.

[2144] 총 세포 집단에서 CD3+/CMG+ 세포의 퍼센트를 살펴봄으로써 데이터를 분석한다. 치료군을 비교할 때, NK 세포:CD3+/CMG+ 세포의 임의의 주어진 검정법 비에서 CD3+/CMG+ 세포의 상대적으로 더 낮은 퍼센트는 수여자 세포 용해를 나타낸다. 일 구현예에서, CD3+/CMG+의 퍼센트는 푸소즘으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터 유래된 수여자 세포에 대해 유사할 것이다.

[2145] 5. CD8 T 세포 용해

[2146] 이 실시예는 세포 용해 검정법을 이용하여 수여자 세포(푸소즘과 융합된 세포)에 대한 CD8+ T 세포 반응의 정량화를 기재한다.

[2147] 수여자 세포의 면역원성의 측정은 CD8+ T 세포 반응이다. 일 구현예에서, CD8+ T 세포에 의한 수여자 세포의 세포독성-매개 세포 용해는, 용해가 푸소즘의 활성을 감소시키거나, 예를 들어 저해하거나 중단시킬 것이기 때문에, 면역원성의 측정이다.

[2148] 일 구현예에서, 수여자 세포는 CD8+ T 세포 반응을 도출하지 않는다. 이 실시예에서, 대상체에서 수여자 세포에 대한 CD8+ T 세포 반응을 검사한다. 또한, 프로토콜을, 적합한 표면 마커가 존재하는 임의의 세포 유형에 적응시킬 수 있다. 이 실시예에서, 표적 수여자 세포는 CD3+ 세포이다.

[2149] 마우스를 5일 동안 매일, 본 출원에 기재된 임의의 방법을 통해 생성된 푸소즘으로 처리하거나, PBS(음성 대조군)로 처리한다. 최종 처리 후 28일째에, 푸소즘을 받은 마우스 및 PBS 처리를 받은 마우스로부터 말초 혈액을 수합한다. 혈액을 5 μ M EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 수합하고, 응고를 방지하기 위해 즉시 혼합하였다. 튜브를 얼음 상에 유지시키고, 적혈구를 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 용액을 사용하여 제거하였다. 세포를 세포 염색 완충제(Biolgend 카탈로그 #: 420201)에서 10분 동안 Fc 블라킹시킨 후(Biolgend 카탈로그 #: 101319), 암실에서 4°C에서 30분 동안 튜브 CD3:APC-Cy7 항체(Biolgend 카탈로그 #: 100330) 또는 이소타입 대조군 APC-Cy7 항체(Biolgend 카탈로그 #: 400230)로 염색한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 FACS Aria(BD Biosciences, San Jose, CA.) 상에서 640 nm 레이저 여기를 이용하여 분석하고, FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 진행시키면서 780 $\pm$ 60에서 방출을 수합하여, 이소타입 대조군 APC-Cy7 항체 표지된 세포를 사용하여 음성 게이트를 설정하고, 그 후에, APC-Cy7 양성 세포를 소팅하고 수합한다. 그 후에, 소팅된 CD3+ 세포를 CellMask™ 그린 형질막 염색(CMG, ThermoFisher 카탈로그 #: C37608)으로 표지한다.

[2150] 푸소즘 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 CD3+ 세포를 분리하기 전 7일째에, CD8+ 세포를, 문헌[Crop et al. Cell transplantation (20):1547-1559; 2011]에 기재된 방법에 따라 푸소즘 또는 PBS로 처리된 마우스로부터 분리하고, 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 37°C에서 7일 동안 IL-2 재조합 마우스 단백질(R&D 시스템 카탈로그 #: 402-ML-020) 및 CD3/CD28 비드(ThermoFisher 카탈로그 #: 11456D)의 존재 하에 자극시킨다. 제7일에, 자극된 CD8+ 세포를, 1000:1~1:1 내지 1:1.25~1:1000 범위의 CD8+ 세포:CD3+/CMG+ 또는 CD8+ 세포: CD3+/DMSO 대조군 세포의 평판배양 비에서 CD3+/CMG+ 또는 CD3+/DMSO 대조군 세포와 함께 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 48시간 동안 공동-인큐베이션한다. 음성 대조군 웰 세트는 CD3+/CMG+ 및 CD3+/DMSO 대조군 세포만 받을 것이고, CD8+ 세포는 받지 않을 것이다. 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 이들 플레이트를 상기에 따라 튜브 CD3:APC-Cy7 항체 또는 IC:APC-Cy7 항체로 표지하도록 가공한다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 PBS에 재현탁시키고, FACS Aria (APC-Cy7: 640 nm 레이저 여기/방출은 780 $\pm$ 60 nm 및 CMG 561 nm 레이저 여기에서 수합되고/방출은 585 $\pm$ 16 nm에서 수합된) 상에서 FACSDiva™ 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA.)를 사용하여 분석한다. 그 후에, FSC/SSC 사건 데이터는 처음에, 사건 표지된 "세포"에 대한 게이트를 설정하는 데 사용될 것이다. 그 후에, 이러한 "세포" 게이트를 사용하여, IC:APC-Cy7/DMSO 단독으로 표지된 시료를 분석하는 640 nm 및 561 nm 레이저에 대한 PMT 전압을 설정하도록 사건을 제시한다. 이 시료를 또한 사용하여, APC-Cy7 및 CMG 둘 모두에 대해 음성인 세포에 대한 게이트로서 설정할 것이다. 그 후에, 임의의 CD8+ 세포를 받지 않은 CD3+/CMG+ 세포를 사용하여, CD3+ 및 CMG+ 세포에 대한 양성 게이트를 설정할 것이다.

[2151] 총 세포 집단에서 CD3+/CMG+ 세포의 퍼센트를 살펴봄으로써 데이터를 분석한다. 치료군을 비교할 때, CD8+

세포:CD3+/CMG+ 세포의 임의의 주어진 검정법 비에서 CD3+/CMG+ 세포의 상대적으로 더 낮은 프센트는 수여자 세포 용해를 나타낸다. 일 구현예에서, CD3+/CMG+의 퍼센트는 푸소좀으로 처리된 마우스 및 PBS로 처리된 마우스로부터 유래된 수여자 세포에 대해 유사할 것이다.

[2152] 실시예 149: 푸소좀에서 GAPDH의 측정

[2153] 이 실시예는 푸소좀에서 글리세르알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH)의 수준, 및 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 GAPDH의 상대 수준의 정량화를 기재한다. 푸소좀을 실시예 114 및 154에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[2154] GAPDH를 부모 세포 및 푸소좀에서, GAPDH에 대한 표준의 상업적으로 입수 가능한 ELISA(ab176642, Abcam)를 제조업체의 지시에 따라 측정하였다. 총 단백질 수준을 유사하게는, 비신초닌산 검정법을 통해 측정하였다. 측정된 GAPDH 및 단백질 수준을 하기 표에 제시한다:

	[단백질] (mg/mL)	[GAPDH] (ng/mL)	GAPDH:단백질 (μg/g)
푸소좀	0.82	37.2	45.3
세포	0.45	50.4	112.0

[2155] GAPDH: 총 단백질 비를 또한, 도 41에 제시한다.

[2157] 실시예 150: 푸소좀에서 단백질에 대한 지질의 비

[2158] 이 실시예는 푸소좀에서 단백질 질량에 대한 지질 질량의 비의 정량화를 기재한다. 푸소좀은 단백질 질량에 대한 지질 질량의 비를, 유핵 세포의 비와 유사하게 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다.

[2159] 지질 함량을, 상업적으로 입수 가능한 인지질 검정법 키트(MAK122 Sigma St. Louis, MO)를 제조업체의 설명에 따라 사용하여 콜린-함유 인지질을 총 지질의 하위세트로서 계산하였다. 푸소좀의 총 단백질 함량을 본원에 기재된 바와 같이 비신초닌산 검정법을 통해 측정하였다. 측정된 인지질 수준, 단백질 수준, 및 단백질에 대한 인지질의 비를 도 42 및 하기 표에 제시한다:

	인지질 (μM)	단백질 (g/L)	인지질:단백질 (μmol/g)
푸소좀	115.6	0.82	141.0
세포	47.9	0.45	106.4

[2161] 실시예 151: 푸소좀에서 DNA에 대한 단백질의 비

[2162] 이 실시예는 푸소좀에서 DNA 질량에 대한 단백질 질량의 비의 정량화를 기재한다. 푸소좀은 DNA 질량에 대한 단백질 질량의 비를, 세포의 비보다 훨씬 더 크게 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 푸소좀을 실시예 114 및 154에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[2163] 푸소좀 및 세포의 총 단백질 함량을 본원에 기재된 바와 같이 비신초닌산 검정법을 통해 측정하였다. 푸소좀 및 세포의 DNA 질량을, 상업적으로 입수 가능한 단리 키트(#69504 Qiagen Hilden, Germany)를 제조업체의 설명에 따라 사용하여, 총 DNA의 추출 후 280 nm에서 흡수에 의해 측정하였다. 총 단백질 함량을 총 DNA 함량으로 나누어서, 총 핵산에 대한 단백질의 비를 결정하여, 전형적인 푸소좀 조제물에 대한 주어진 범위 내에서 비를 산출하였다. 측정된 단백질 수준, DNA 수준, 및 DNA에 대한 단백질의 비를 도 43 및 하기 표에 제시한다:

	[단백질] (mg/mL)	[DNA] (ng/μL)	단백질:DNA (g/g)
푸소좀	0.82	29.5	27.8
세포	0.45	15.9	28.3

[2165] 실시예 152: 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비

[2166] 이 실시예는 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 더 큰, DNA에 대한 지질의 비를 가질 것이다. 푸소좀을 실시예 114 및 154에서 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[2167] 이 비는 실시예 49에 상술된 지질 함량으로서 정의되고, 핵산 함량은 실시예 50에 기재된 바와 같이 결정된다.

측정된 지질 수준, DNA 수준, 및 DNA에 대한 지질의 비를 도 44 및 하기 표에 제시한다:

	[지질] (μM)	[DNA] ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	지질:DNA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
푸소솜	115.6	29.5	3.92
세포	47.9	15.9	3.01

[2169] 실시예 153: 디나민-매개 경로를 통한 푸소솜의 전달

[2170] 이 실시예는 디나민-매개 경로를 통한 수여자 세포로의 Cre의 푸소솜-기반 전달을 기재한다. 간략하게는, 본원에 기재된 바와 같이, 세포 표면 상에 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)로부터의 외피 당단백질 G를 발현하는 HEK-293T 세포로부터 생성된 푸소솜의 수합 및 제조의 표준 절차에 의해, Cre를 캡슐화하는 푸소솜을 발생시켰다. 그 후에, 디나민-매개 경로에 대한 Cre 전달의 의존성을 하기와 같이 결정하였다.

[2171] "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내의 완전 배지에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre를 캡슐화하는 푸소솜을 수여자 LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP HEK-293T 세포에 적용하였다.

[2172] Cre 전달이 디나민-매개 경로에 의존하는 정도를 정량화하기 위해, 푸소솜 적용 시, 하나의 수여자 세포 그룹을, 디나민을 통한 세포내이입을 부분적으로 저해하기에 충분한 농도인 $120 \mu\text{M}$ 에서 디나민 저해제 디나소어로 처리하였다. 푸소솜을 37°C 및 5% CO_2 에서 24시간 동안 수여자 세포와 함께 인큐베이션하였다. 24시간 후, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342를 완전 배지에서 희석시키고, 37°C 및 5% CO_2 에서 30분 동안 세포와 함께 인큐베이션하였다. Hoescht의 첨가 후, 세포를 자동화된 현미경을 사용하여 이미지화하였다(www.biotech.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/). 수여자 세포의 Hoechst 형광을, 405 nm LED 및 BFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 GFP를 488 nm LED 및 GFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 수여자 세포의 RFP를 523 nm LED 및 RFP 필터 큐브를 사용하여 이미지화하였다. 우선, 양성-대조군 웰; 즉, $1.25 \mu\text{L}$ 제시클 리컴비나제 제시클 (Takara, Cat # 631449)로 처리된 수여자 세포 상에서 LED 강도 및 통합 시간을 구축함으로써 웰 내의 세포의 이미지를 획득하였다.

[2173] BFP, RFP 및 GFP 강도가 최대 픽셀 강도 값에 있으나 포화되지 않도록 획득 세팅을 설정하였다. 그 후에, 관심 웰을 구축된 세팅을 사용하여 이미지화하였다. BFP 채널 상에서 자동포커싱하고, 그 후에 GFP 및 RFP 채널에 대한 구축된 초점면을 사용함으로써 각각의 웰 상에서 초점을 설정하였다. RFP-양성 세포의 분석을, 자동화된 형광 현미경이 구비된 Gen5 소프트웨어를 이용하여 수행하였다(www.biotech.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/).

[2174] 이미지를 $60 \mu\text{m}$ 폭을 갖는 롤링 볼 백그라운드 차분 알고리즘을 사용하여 예비-가공하였다. 백그라운드 강도보다 유의하게 높은 GFP 강도를 갖는 세포를 역치화하고, GFP-양성 세포이기에는 너무 작거나 너무 큰 영역을 배제하였다. 동일한 분석 단계를 RFP 채널에 적용하였다. 그 후에, RFP-양성 세포(Cre 리컴비나제를 받는 수여자 세포)의 수를 GFP-양성 세포(총 수여자 세포)의 합계로 나누어서, RFP-양성 세포의 퍼센트를, Cre 전달에 대한 메트릭(metric)으로서 정량화하였다.

[2175] 디나소어의 부재 시, Cre-로딩된 푸소솜은 총 GFP-양성 수여자 세포의 $82.1 \pm 4.5\%$ RFP-양성 세포에 상응하는 Cre 전달의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 45). 상기 주지된 바와 같이, 사용된 디나소어 농도는 세포내이입을 부분적으로 저해하기에 충분하였다. 이와 연관되게, 세포내이입 경로를 통해 작동하는 것으로 공지된 이 실시예에 사용된 VSV-G 푸소솜은 $120 \mu\text{M}$ 디나소어의 존재 하에 부분적으로 저해되었으며, 이때, Cre 전달 수준은 $68.5 \pm 5.5\%$ RFP-양성 세포에 상응하였다(도 45). 비처리된 수여자 세포는 임의의 인지 가능한 RFP-양성 세포를 보여주지 않았다. 종합하여, 이들 데이터는 푸소솜-기반 Cre 전달의 디나민-의존성을 예시한다.

[2176] 실시예 154: 푸소솜에서 지질 조성물의 측정

[2177] 이 실시예는 푸소솜의 지질 조성물의 정량화를 기재한다. 푸소솜의 지질 조성물은, 이들이 유래되는 세포와 유사할 수 있는 것으로 여겨진다. 지질 조성물은 푸소솜 및 세포의 중요한 생물물리학적 매개변수, 예컨대 크기, 정전기 상호작용, 및 콜로이드 거동에 영향을 준다.

[2178] 지질 측정은 질량 분광분석에 기초하였다. 푸소솜을 본원에 기재된 바와 같이, 10 cm 디쉬에서 VSV-G 및 GFP의 일시적인 형질감염, 뒤이어 상기 형질감염 후 48시간째에 조건화된 배지의 여과 및 초원심분리에 의해 푸소솜을 수득함으로써 제조하였다. 형질감염된 세포를 조건화된 배지와 병행하여 수합하고, 분석 처리하였다. 엑소솜을

또한, VSV-G 또는 GFP로 형질감염되지 않은 세포로부터 수합하였다.

[2179] 질량 분광분석-기반 지질 분석을 기재된 바와 같이(Sampaio et al. 2011) Lipotype GmbH(Dresden, Germany)에 의해 수행하였다. 지질을 2-단계 클로로포름/메탄올 절차를 사용하여 추출하였다(Ejsing et al. 2009). 시료를 카디오리핀 16:1/15:0/15:0/15:0(CL), 세라마이드 18:1/2/17:0(Cer), 디아실글리세롤 17:0/17:0(DAG), 헥소실 세라마이드 18:1/2/12:0(HexCer), 리소-포스파티데이트 17:0(LPA), 리소-포스파티딜콜린 12:0(LPC), 리소-포스파티딜에탄올아민 17:1(LPE), 리소-포스파티딜글리세롤 17:1(LPG), 리소-포스파티딜이노시톨 17:1(LPI), 리소-포스파티딜세린 17:1(LPS), 포스파티데이트 17:0/17:0(PA), 포스파티딜콜린 17:0/17:0(PC), 포스파티딜에탄올아민 17:0/17:0(PE), 포스파티딜글리세롤 17:0/17:0(PG), 포스파티딜이노시톨 16:0/16:0(PI), 포스파티딜세린 17:0/17:0(PS), 콜레스테롤 에스테르 20:0(CE), 스펅고미엘린 18:1/2/12:0/0(SM), 트리아실글리세롤 17:0/17:0/17:0(TAG) 및 콜레스테롤 D6(Chol)의 내부 지질 표준 혼합물을 이용하여 스카이크하였다.

[2180] 추출 후, 유기상을 주입 플레이트로 이송하고, 속도 진공 농축기에서 건조하였다. 제1 단계 건조 추출물을 클로로포름/메탄올/프로판올 중 7.5 mM 암모늄 아세테이트(1:2:4, V:V:V)에 재현탁시키고, 제2 단계 건조 추출물을 클로로포름/메탄올 중 메틸아민의 33% 에탄올 용액(0.003:5:1; V:V:V)에 재현탁시켰다. 모든 액체 취급 단계를, 유기 용매 피펫팅에 대한 항-액적 조절 특징을 갖는 Hamilton Robotics STARlet 로봇 플랫폼을 사용하여 수행한다.

[2181] 시료를 TriVersa NanoMate 이온 공급원(Advion Biosciences)이 장착된 QEx활성 질량 분광광도계(Thermo Scientific) 상에서 직접 주입에 의해 분석하였다. 시료를, 단일 획득에서 MS를 위해 $Rm/z=200=280000$ 및 MSMS 실험을 위해 $Rm/z=200=17500$ 의 분해능을 갖는 양이온 모드와 음이온 모드 둘 모두에서 분석하였다. MS/MS는 1 Da 증분에서 스캐닝된 상응하는 MS 질량 범위를 포괄하는 포함 목록에 의해 촉발되었다(Surma et al. 2015). MS 데이터와 MSMS 데이터 둘 모두를 조합하여, CE, DAG 및 TAG 이온을 암모늄 부가물로서; PC, PC O-를 아세테이트 부가물로서; 그리고 CL, PA, PE, PE O-, PG, PI 및 PS를 탈양자화된 음이온로서 모니터링하였다. MS만 사용하여, LPA, LPE, LPE O-, LPI 및 LPS를 탈양자화된 음이온으로서; Cer, HexCer, SM, LPC 및 LPC O-를 아세테이트로서, 그리고 콜레스테롤을 아세틸화된 유도체의 암모늄 부가물로서 모니터링하였다(Liebisch et al. 2006).

[2182] 데이터를 LipidXplorer에 기초하여 인-하우스 개발된 지질 식별 소프트웨어를 이용하여 분석하였다(Herzog et al. 2011; Herzog et al. 2012). 인-하우스 개발된 데이터 관리 시스템을 사용하여, 데이터 후-가공 및 정규화를 수행하였다. 5 초과의 신호-대-노이즈 비, 및 상응하는 블랭크 시료에서보다 5배 더 높은 신호 강도를 갖는 지질 식별만 추가의 데이터 분석을 위해 고려되었다.

[2183] 푸소좀 지질 조성물을 부모 세포의 지질 조성물과 비교하였으며, 이때 비검출된 지질 화학종에 제로의 값을 할당하였다. 푸소좀 및 부모 세포에서 식별된 지질 화학종을 하기 표에 제시한다:

	식별된 총 지질 화학종	공유된 지질 화학종 (부모 세포와 푸소좀 둘 모두에서)	푸소좀에서의 부모 발현의 25%를 갖는 공유된 지질 화학종	총 지질에 대한 공유된 지질 화학종의 분획
푸소좀	679	569	548	0.700
부모 세포	783			

[2184] 부모 세포의 임의의 복제물 시료에서 식별된 $\geq 70\%$ 의 지질 화학종이 푸소좀의 임의의 복제물 시료에 존재하다면, 푸소좀 및 부모 세포는 유사한 지질 조성물을 가질 수 있으며, 이들 식별된 지질 중에서, 푸소좀 내 평균 수준은 부모 세포에서 상응하는 평균 지질 화학종 수준의 25% 초과일 수 있는 것으로 여겨진다.

[2186] 실시예 155: 푸소좀에서 단백질 조성물의 측정

[2187] 이 실시예는 푸소좀의 단백질 조성물의 정량화를 기재한다. 푸소좀의 단백질 조성물은, 이들이 유래되는 세포와 유사할 수 있는 것으로 여겨진다.

[2188] 푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다.

[2189] 각각의 시료를 용해 완충제(6 M 우레아, 2 M 티오우레아, 4% CHAPS, 50 mM Tris pH 8.0)에 재현탁시키고, 얼음 배스 상에서 초음파처리하고, 작은 게이지 주사기를 통해 진행시켰다. 단백질을 65°C에서 10 mM DTT를 이용하여 15분 동안 환원시키고, 암실에서 실온에서 15 mM 요오도아세타미드(IAA)를 이용하여 30분 동안 알킬화시켰다. 부가적인 10 mM DTT를 이용하여 과량의 IAA를 퀀칭시켰다. 그 후에, 8 용적의 빙냉 아세톤 + 1 용적의 빙냉 메

탄올의 첨가에 의해 단백질을 침전시키고, -80℃에서 밤새 놔두었다. 침전된 단백질을 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 잔여 용해 완충제를 200 μ l의 빙냉 메탄올 3회 세척하였다. 단백질을 0.75 M 우레아 + 50 mM Tris pH 8.0 + 1 μ g 트립신/LysC에 재현탁시키고, 37℃에서 4시간 동안 교반하면서 예비-분해하였다. 추가적인 1 μ g의 트립신/LysC를 단백질에 첨가하고, 분해를 밤새 계속하였다. 펩타이드를 역상 SPE에 의해 정제하고, LC-MS에 의해 분석하였다.

[2190] 각각의 조건에 대한 복제물 시료를 용해시키고, 하나의 튜브에서 조합하였다. 그 후에, 이러한 풀(pool)을 시료와 동일한 제조 프로토콜을 받게 하였고, 정보 의존적 획득에서 LC-MS에 의해 분석하거나 하기 기재된 바와 같이 겔 상에서 분리하였다.

[2191] 총 100 μ g의 풀링된 단백질을 2x Laemmli 로딩 완충제에 넣고, 12.5% SDS PAGE 상에서 분리하였다. 단백질을 간략하게는 쿠마시 블루로 염색하고, 단백질 레인을 12개 분획으로 분리하였다. 그 후에, 각각의 분획을 50% 아세토니트릴로 탈수시키고, 환원을 위해 10 mM DTT로 재수화시켰다. 겔 조각을 65℃에서 15분 동안 넣고, 실온에서 30분 동안 알킬화시켰으며, 이때 15 mM IAA를 암실에 두었다. 겔을 50% 아세토니트릴로 추가로 탈수시키고, 1 μ g의 트립신/LysC와 함께 50 mM Tris pH 8에서 37℃에서 밤새 재수화시켰다. 펩타이드를 탈수 및 초음파처리 에 의해 겔로부터 추출하였다. 펩타이드를 역상 SPE에 의해 정제하고, LC-MS/MS에 의해 분석하였다(1개 분획 당 1xIDA).

[2192] 획득을, 25 μ m iD 모세관을 갖는 전기분무 중간면이 장착되고 Eksigent μ UHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA)와 커플링된 ABSciex TripleTOF 5600 (ABSciex, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. Analyst TF 1.7 소프트웨어를, 장비를 조절하고 데이터 가공 및 획득을 위해 사용하였다. 획득을, 겔 또는 비분획화된 풀로부터의 12개 분획에 대해 정보 의존적 획득(IDA) 모드에서 수행하였다. 시료를 SWATH 획득 모드에서 분석하였다. IDA 모드를 위해, 공급원 전압을 5.2 kV로 설정하고 225℃에서 유지시켰으며, 커튼 가스를 27 psi로 설정하고, 12 psi에서 가스 1, 및 10 psi에서 가스 2이었다. SWATH 모드를 위해, 공급원 전압을 5.5 kV로 설정하고 225℃에서 유지시켰으며, 커튼 가스를 25 psi로 설정하고, 16 psi에서 가스 1, 및 15 psi에서 가스 2이었다. 분리를 60℃에서 유지된, 0.3 μ m i.d., 2.7 μ m 입자, 150 mm 길이의 역상 HALO C18-ES 컬럼(Advance Materials Technology, Wilmington, DE) 상에서 수행하였다. 시료를 루프 과충전에 의해 5 μ L 루프 내로 주입하였다. 60분 LC 구배를 위해, 이동상은 3 μ L/분의 유속에서 하기 용매 A(수 중 0.2% v/v 포름산 및 3% DMSO v/v) 및 용매 B(EtOH 중 0.2% v/v 포름산 및 3% DMSO)로 구성되었다.

[2193] 시료 분석용 이온 라이브러리를 발생시키기 위해, ProteinPilot 소프트웨어를, IDA 진행에 의해 발생된 wiff 파일 상에서 진행시켰다. 이 데이터베이스를 Peakview 소프트웨어 (ABSciex)에서 사용하여, 각각의 시료에서 단백질을 3 전이/펩타이드 및 15 펩타이드/단백질을 사용하여 정량화하였다. 정량화된 단백질의 수를 최대화하기 위해, 시료를, 동일한 매개변수를 갖는 공개적으로 입수 가능한 인간 SWATH 데이터베이스(Atlas) 상에서 정량화하였다. Peakview에 의해 컴퓨터화된 점수가 1.5보다 우수하거나 1% 미만의 FDR을 가졌다면, 펩타이드는 적당하게 측정되는 것으로 간주되었다. 각각의 데이터베이스로부터의 정량화를, 두 데이터베이스 모두로부터의 단백질 명칭을 사용하여 하나의 최종 정량화로 조합하였다. 모든 시료에 대한 총 신호의 평균과 비교할 때, 해당 시료 내 모든 단백질의 총 신호를 고려함으로써 모든 시료에 대해 교정 인자를 컴퓨터화하였다.

[2194] 푸소좀 단백질 조성물을 부모 세포 단백질 조성물과 비교하였다. >33%의 식별된 단백질이 푸소좀에 존재할 때, 푸소좀과 부모 세포 사이에서 유사한 단백질 조성물이 관찰되었고, 이들 식별된 단백질 중에서, 수준은 하기 표에서 제시된 바와 같이 부모 세포에서 상응하는 단백질 수준의 25% 초과였다.

	식별된 총 단백질	공유된 단백질 (부모 세포와 푸소좀 둘 모두에서 식별됨)	푸소좀에서 부모 발현의 25%를 갖는 공유된 단백질	총 단백질에 대한 공유된 단백질의 분획
푸소좀	1926	1487	957	0.333
세포	2870			

[2195] 실시예 156: 1개 푸소좀 당 내인성 또는 합성 단백질 수준의 정량화

[2197] 이 실시예는 푸소좀에서 내인성 또는 합성 단백질 적재물의 정량화를 기재한다. 일부 상황에서, 푸소좀은 내인성 또는 합성 단백질 적재물을 포함할 수 있다. 이 실시예에서 기재된 푸소좀 또는 부모 세포를, 내인성 단백질의 발현을 변경하거나 또는 치료적 또는 신규 세포 기능을 매개하는 합성 적재물을 발현하도록 조작하였다.

[2198] GFP를 발현하는 푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀에서 GFP의 정량화를 상업적으로 입수 가능한 ELISA 키트(ab171581 Abcam Cambridge, United Kingdom)를 제조업체의 설명에 따라 사용하여 달성하였다. NanoSight NS300(Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, United Kingdom)을 사용한 나노입자 추적 분석에 의해 푸소좀 정량화를 수행하였다. 그 결과를 하기 표에 제시한다.

	농도 (#/mL)
GFP 단백질	4.41×10^{13}
푸소좀	2.66×10^{11}
GFP:푸소좀	165.8

[2199]

[2200] 푸소좀은 1개 푸소좀 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 이상의 단백질 작용제 분자를 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 일 구현예에서, 푸소좀은 1개 푸소좀 당 166개의 단백질 작용제 분자를 가질 것이다.

[2201] **실시예 157: 푸소좀에서 엑소좀 단백질의 마커의 측정**

[2202] 이 검정법은 엑소좀의 특이적인 마커인 것으로 공지된 단백질의 비율의 정량화를 기재한다.

[2203] 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 엑소좀을, 부모 세포가 VSV-G 또는 GFP로 형질감염되지 않은 것임을 제외하고는, 푸소좀에 대해 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀 및 엑소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[2204] 생성된 단백질 정량화 데이터를 분석하여, 공지된 엑소좀 마커 CD63의 단백질 수준 및 비율을 결정하였다. 질량 분광분석으로부터의 강도 값에 1을 더하고, log10에 의해 변환시키고, 복제물에 걸쳐 평균을 컴퓨터화함으로써, 1개 그룹 당 평균 log 강도를 계산하였다. 그 결과를 도 46에 제시한다.

[2205] **실시예 158: 푸소좀에서 칼넥신의 측정**

[2206] 이 검정법은 푸소좀에서 칼넥신(CNX)의 수준, 및 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 CNX의 상대 수준의 정량화를 기재한다.

[2207] 푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 칼넥신 및 총 단백질을 실시예 42의 방법에 따라 수행된 질량 분광분석을 사용하여 측정하였다. 부모 세포 및 푸소좀에 대해 결정된 칼넥신 신호 강도를 도 47에 제시한다.

[2208] 구현예에서, 이 검정법을 사용하여, 푸소좀 내 CNX의 평균 분획 함량(본원의 실시예 42에 기재된 바와 같이 계산됨)은 $< 2.43 \times 10^{-4}$ 일 것이다.

[2209] 일 구현예에서, 부모 세포로부터 조제물로의 총 단백질 당 칼넥신 ng/ μ g의 저하는 88% 초과일 것이다.

[2210] **실시예 159: 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비**

[2211] 이 실시예는 부모 세포와 비교하여 푸소좀에서 DNA에 대한 지질의 비의 정량화를 기재한다. 일 구현예에서, 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 더 큰, DNA에 대한 지질의 비를 가질 것이다. 푸소좀을 실시예 114 및 154에서 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[2212] 이 비는 실시예 49에 상술된 지질 함량으로서 정의되고, 핵산 함량은 실시예 50에 기재된 바와 같이 결정된다. 도 48 및 하기 표에 제시된 바와 같이, 푸소좀은 부모 세포보다 더 큰 지질:DNA 비를 나타내는 것으로 확인되었다.

	[지질] (μ M)	[DNA] (ng/ μ L)	지질:DNA (μ mol/mg)
푸소좀	115.6	29.5	3.92
세포	47.9	15.9	3.01

[2213]

[2214] **실시예 160: 푸소좀 상에서 표면 마커의 분석**

[2215] 이 검정법은 푸소좀 상에서 표면 마커의 식별을 기재한다.

[2216] 푸소좀을 실시예 114 및 154에서 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다. 포스포티딜세린을 실시예 114 및 154에

서 본원에 기재된 바와 같은 질량 분광분석에 의해 측정하였다. 푸소좀에서 총 지질에 비한 포스파티딜세린의 양은 하기 표에 제시된 바와 같이, 부모 세포에서 총 지질에 비한 포스파티딜세린의 양보다 121% 더 큰 것으로 결정되었다.

	포스파티딜세린 (molar%)	포스파티딜세린 퍼센트 변화
푸소좀	14.6	121%
부모 세포	6.6	

실시예 161: 푸소좀에서 바이러스 캡시드 단백질의 분석

이 실시예에서, 시료 조제물의 구성을 분석하고, 바이러스 캡시드 공급원으로부터 유래된 단백질의 비율을 평가하였다.

푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. 바이러스 캡시드 단백질의 분획 함량을 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 계산하였고, 푸소좀 시료에 걸쳐 평균을 내었으며, 퍼센트로서 표현하였다.

이러한 접근법을 사용하여, 시료는 하기 표에 제시된 바와 같이, 0.05% 바이러스 캡시드 단백질을 함유하는 것으로 확인되었다. 검출되는 유일한 바이러스 캡시드 단백질은 토끼 내인성 렌티바이러스(RELIK) 캡시드와 사이클로필린 A(PDB 2XGY|B)의 복합체였다.

	원(raw) MS 강도	바이러스:총 단백질 (%)
바이러스 캡시드 단백질	5.10×10^5	0.05
총 단백질	9.46×10^8	

실시예 162: 푸소좀에서 푸소젠 단백질 비의 정량화

이 실시예는 푸소좀 내의 관심의 다른 단백질 또는 총 단백질에 대한 푸소젠 단백질의 비의 정량화를 기재한다. 관심의 다른 단백질은 EGFP, CD63, ARRDC1, GAPDH, 칼넥신(CNX), 및 TSG101을 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. 모든 단백질의 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 계산하고, 푸소좀 시료에 걸쳐 평균을 내고, 분획으로서 표현하였다.

하기 표에 제시된 바와 같이, 푸소젠은 EGFP에 대한 비 156.9, CD63에 대한 비 2912.0, ARRDC1에 대한 비 664.9, GAPDH에 대한 비 69.0, CNX에 대한 비 558.4, 및 TSG101에 대한 비 3064.1을 갖는 것으로 확인되었다.

단백질	원 MS 강도	푸소젠:단백질(들) 비
VSV-G	1.29×10^8	N/A
총 단백질	9.46×10^8	0.136
EGFP	8.22×10^5	156.9
CD63	4.43×10^4	2912.0
ARRDC1	1.94×10^5	664.9
GAPDH	1.87×10^6	69.0
CNX	2.31×10^5	558.4
TSG101	4.21×10^4	3064.1

실시예 163: 푸소좀에서 내인성 단백질 및 합성 단백질 비의 정량화

이 실시예는 푸소좀 내의 관심의 다른 단백질 또는 총 단백질에 비한 내인성 또는 합성 단백질 적재물의 정량화를 기재한다. 관심의 다른 단백질은 VSV-G, CD63, ARRDC1, GAPDH, 칼넥신(CNX), 또는 TSG101을 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. 모든 단백질의 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 계산하고, 푸소좀 시료에 걸쳐 평균을 내고, 분획으로서 표현하였다.

[2229] 하기 표에 제시된 바와 같이, 푸소좀은 VSV-G에 대한 비 6.37×10^{-3} , CD63에 대한 비 18.6, ARRDC1에 대한 비 4.24, GAPDH에 대한 비 0.44, CNX에 대한 비 3.56, 및 TSG101에 대한 비 19.52를 갖는 것으로 확인되었다.

단백질	원 MS 강도	단백질 적재물:단백질(들) 비
EGFP	8.22×10^5	N/A
총 단백질	9.46×10^8	8.69×10^{-4}
VSV-G	1.29×10^8	6.37×10^{-3}
CD63	4.43×10^4	18.6
ARRDC1	1.94×10^5	4.24
GAPDH	1.87×10^6	0.44
CNX	2.31×10^5	3.56
TSG101	4.21×10^4	19.52

[2230]

[2231]

실시예 164: 푸소좀에서 농화된 지질 조성물

[2232]

이 실시예는 푸소좀의 지질 조성물, 부모 세포, 및 엑소좀의 정량화를 기재한다. 푸소좀의 지질 조성물은, 이들이 유래되는 세포에 비해 특이적인 지질에 대해 농화되며 및/또는 결실될 수 있는 것으로 여겨진다. 지질 조성물은 푸소좀 및 세포의 중요한 생물물리학적 매개변수, 예컨대 크기, 정전기 상호작용, 및 콜로이드 거동에 영향을 준다.

[2233]

지질 조성을 실시예 114 및 154에 기재된 바와 같이 측정하였다. 푸소좀을 본원에 기재된 바와 같이, 10 cm 디쉬에서 VSV-G 및 GFP의 일시적인 형질감염, 뒤이어 상기 형질감염 후 48시간째에 조건화된 배지의 여과 및 초원심분리에 의해 푸소좀을 수득함으로써 제조하였다. 형질감염된 세포를 조건화된 배지와 병행하여 수합하고, 분석 처리하였다. 엑소좀을 또한, 부모 세포가 VSV-G 또는 GFP로 형질감염되지 않은 것임을 제외하고는, 푸소좀에 대해 본원에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[2234]

푸소좀, 엑소좀, 및 부모 세포에 대한 지질 조성물은 도 49a 내지 49b에 제시된다. 부모 세포와 비교하여, 푸소좀을 콜레스테릴 에스테르, 자유 콜레스테롤, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜세린, 포스파티데이트, 에테르-연결된 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 및 스펅고미엘린에 대해 농화시켰다. 부모 세포와 비교하여, 푸소좀을 세라마이드, 카디오리핀, 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 리소-포스파티딜글리세롤, 리소-포스파티딜이노시톨, 에테르-연결된 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 및 트리아실글리세롤에 대해 결실시켰다. 엑소좀과 비교하여, 푸소좀을 콜레스테릴 에스테르, 세라마이드, 디아실글리세롤, 리소-포스파티데이트, 및 포스파티딜에탄올아민, 트리아실글리세롤에 대해 농화시켰다. 엑소좀과 비교하여, 푸소좀을 자유 콜레스테롤, 헥소실 세라마이드, 리소-포스파티딜콜린, 에테르-연결된 리소-포스파티딜콜린, 리소-포스파티딜에탄올아민, 에테르-연결된 리소-포스파티딜에탄올아민, 및 리소-포스파티딜세린에 대해 결실시켰다.

[2235]

실시예 165: 푸소좀의 구획-특이적인 단백질 함량의 측정

[2236]

이 실시예는, 푸소좀, 푸소좀 부모 세포, 및 엑소좀에서 특이적인 세포성 구획으로부터 유래되는 것으로 공지된 단백질의 비율의 정량화를 기재한다.

[2237]

푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 엑소좀을, 부모 세포가 VSV-G 또는 GFP로 형질감염되지 않은 것임을 제외하고는, 푸소좀에 대해 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀 및 엑소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. 생성된 단백질 정량화 데이터를 분석하여, 공지된 엑소좀, 소포체, 리보솜, 핵, 및 미토콘드리아 단백질의 단백질 수준 및 비율을 유전자 종양학 세포 구획 주석 용어에 의해 주석달린 바와 같이 결정하였으며(엑소좀: GO:0070062, 소포체: GO:0005783, 리보솜: GO:0005840, GO:0022625, GO:0022626, GO:0022627, GO:0044391, GO:0042788, GO:0000313), 이때 증거 코드는 IDA(직접 검정법에 의해 추론됨)이었다. 각각의 시료에서 총 단백질에 비해 구획-특이적인 단백질의 분획을 푸소좀 시료, 엑소좀 시료 및 부모 세포에 대해 결정하였다.

[2238]

도 50에 제시된 바와 같이, 푸소좀은 부모 세포 및 엑소좀과 비교하여 소포체 단백질이 결실되어 있는 것으로 확인되었다. 푸소좀은 엑소좀과 비교하여 엑소좀 단백질에 대해 결실되어 있는 것으로 확인되었다. 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 미토콘드리아 단백질에 대해 결실되어 있었다. 푸소좀은 부모 세포와 비교하여 핵 단백질에 대해 농화되어 있었다. 푸소좀은 부모 세포 및 엑소좀과 비교하여 리보솜 단백질에 대해 농화되어 있었다.

[2239] **실시예 166: 푸소좀에서 TSG101 및 ARRDC1 함량의 측정**

[2240] 이 실시예는 세포로부터 푸소좀 방출에 중요한 것으로 공지된 단백질의 비율의 정량화를 기재한다.

[2241] 푸소좀 및 부모 세포를 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 엑소좀을, 부모 세포가 VSV-G 또는 GFP로 형질감염되지 않은 것임을 제외하고는, 푸소좀에 대해 본원에 기재된 바와 같이 실시예 114 및 154의 방법에 의해 제조하였다. 푸소좀 및 엑소좀에 대한 질량 분광분석에 의한 단백질 정량화를 실시예 42에서 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. 생성된 단백질 정량화 데이터를 분석하여, 단백질 TSG101 및 ARRDC1의 단백질 수준 및 비율을 결정하였다. 질량 분광분석으로부터의 강도 값에 1을 더하고, log10에 의해 변환시키고, 복제물에 걸쳐 평균을 컴퓨터화함으로써, 1개 그룹 당 평균 log 강도를 계산하였다. 엑소좀 또는 부모 세포에 비해, 푸소좀 내 TSG101 또는 ARRDC1의 총 단백질 함량의 퍼센트는 각각의 시료에 대한 TSG101 또는 ARRDC1의 평균 log 강도로서 결정되었으며, 이는 동일한 시료 내 모든 단백질의 강도의 합계로 나누고 복제물에 걸쳐 평균을 내고 퍼센트로서 표현한 것이다.

[2242] 도 51에 제시된 바와 같이, ARRDC1은 부모 세포 또는 엑소좀에서보다 푸소좀에서 더 큰 수준의 총 단백질 함량 퍼센트로서 존재하는 것으로 확인되었다. 총 단백질 함량의 퍼센트로서 ARRDC1의 수준은 푸소좀에서 적어도 0.02%였다. TSG101은 부모 세포 또는 엑소좀에서보다 푸소좀에서 더 큰 수준의 총 단백질 함량 퍼센트로서 존재하는 것으로 확인되었다. 총 단백질 함량의 퍼센트로서 TSG101의 수준은 푸소좀에서 적어도 0.004%였다.

[2243] **실시예 167: 푸소좀의 기존의 혈청 불활성화의 측정**

[2244] 이 실시예는 시험관내 전달 검정법을 사용하여 푸소좀의 기존의 혈청 불활성화의 정량화를 기재한다.

[2245] 푸소좀에 대한 면역원성의 측정은 혈청 불활성화이다. 푸소좀의 혈청 불활성화는 항체-매개 중화 또는 보체-매개 분해로 인한 것일 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 푸소좀의 일부 수여자는 푸소좀에 결합하고 인지하는 인자를 이들의 혈청에 가질 것이다.

[2246] 이 실시예에서, 푸소좀 미접촉 마우스를 혈청에서 푸소좀을 불활성화시키는 인자의 존재에 대해 평가한다. 주목할만하게는, 본원에 기재된 방법을 프로토콜에 대한 최적화와 함께 인간, 래트, 원숭이에 동등하게 적용할 수 있다. 음성 대조군은 가열 불활성화된 마우스 혈청이고, 양성 대조군은 이중성 공급원 세포로부터 발생된 푸소좀의 다수의 주사를 받은 마우스로부터 유래된 혈청이다. 신선한 전혈을 수합하고 상기 전혈을 수 시간 동안 완전히 응고되게 함으로써 혈청을 마우스로부터 수합한다. 혈병(clot)을 원심분리에 의해 펠렛화하고, 혈청 상층액을 제거한다. 음성 대조군 시료를 56℃에서 1시간 동안 가열한다. 혈청을 분취물에서 냉동시킬 수 있다.

[2247] 수여자 집단 내 50%의 세포가 푸소좀에서 페이로드를 받는 용량에 대해 푸소좀을 시험한다. 푸소좀은 본원에 기재된 다른 임의의 실시예를 통해 생성될 수 있고, 본원에 기재된 임의의 페이로드를 함유할 수 있다. 수여자 세포의 페이로드의 푸소좀 전달을 검정하는 많은 방법이 또한, 본원에 기재되어 있다. 이러한 특정 실시예에서, 페이로드는 Cre 단백질이고, 수여자 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 RPMI8226 세포이며, 이는 재조합 시 Cre를 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다. 50%의 수여자 세포가 RFP 양성인 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다. 다른 구현예에서, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받는 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다. 바람직한 구현예에서, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받는 식별된 용량은 푸소좀에 걸쳐 유사하다.

[2248] 푸소좀의 혈청 불활성화를 평가하기 위해, 푸소좀을 정상 혈청 또는 가열-불활성화된 혈청(또는 10% 가열-불활성화된 FBS를 무-혈청 대조군으로서 함유하는 배지) 내로 1:5 희석시키고, 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 배지를 부가적인 1:5 희석을 위해 반응에 첨가하고, 그 후에 1:10 비에서 2회 연속 희석하였다. 이 단계 후, 푸소좀은, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받은(예를 들어 RFP 양성인) 이전에 식별된 용량에서 존재해야 한다.

[2249] 그 후에, 혈청에 노출된 푸소좀을 수여자 세포와 함께 인큐베이션한다. 페이로드를 받고, 따라서 RFP 양성인 세포의 퍼센트를 계산한다. 일부 구현예에서, 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, 푸소좀 미접촉 마우스로부터의 혈청 및 가열-불활성화된 혈청과 함께 인큐베이션된 푸소좀 시료 사이에서 상이하지 않으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화가 존재하지 않음을 나타낸다. 일부 구현예에서, 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, 푸소좀 미접촉 마우스로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 푸소좀 시료와 무-혈청 대조군 인큐베이션 사이에서 상이하지 않으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화가 존재하지 않음을 나타낸다. 일부 구현예에서, 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, 푸소좀 미접촉 마우스로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 푸소좀 시료에서보다 양성 대조군 혈청과

함께 인큐베이션된 푸소좀 시료에서 더 작으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화가 존재하지 않음을 나타낸다.

[2250] **실시예 168: 다수의 투여 후 푸소좀의 혈청 불활성화의 측정**

[2251] 이 실시예는 푸소좀의 다수의 투여 후 시험관내 전달 검정법을 사용한 푸소좀의 혈청 불활성화의 정량화를 기재한다. 변형된 푸소좀, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 변형된 푸소좀은 상기 변형된 푸소좀의 다수의(예를 들어 1 초과, 예를 들어 2 이상의) 투여 후, 감소된(예를 들어 비변형된 푸소좀의 투여와 비교하여 감소된) 혈청 불활성화를 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 상황에서, 본원에 기재된 푸소좀은 다수의 투여 후 혈청에 의해 불활성화되지 않을 것이다.

[2252] 푸소좀에 대한 면역원성의 측정은 혈청 불활성화이다. 일 구현예에서, 푸소좀의 반복된 주사는 항-푸소좀 항체, 예를 들어 푸소좀을 인지하는 항체의 발달을 초래할 수 있다. 일 구현예에서, 푸소좀을 인지하는 항체는, 푸소좀 활성 또는 수명을 제한하고 보체 분해를 매개할 수 있는 방식으로 결합할 수 있다.

[2253] 이 실시예에서, 혈청 불활성화를 1회 이상의 푸소좀 투여 후 검사한다. 푸소좀을 이전의 실시예 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 이 실시예에서, 푸소좀을 하기로부터 발생시켰다: HLA-G의 렌티바이러스-매개 발현에 의해 변형된 HEK293 세포(이하 HEK293-HLA-G), 및 빈 벡터의 렌티바이러스-매개 발현에 의해 변형된 HEK293(이하 HEK293). 일부 구현예에서, 푸소좀은 다른 면역조절 단백질을 발현하는 세포로부터 유래된다.

[2254] 혈청을 상이한 코호트로부터 유도한다: 비히클(푸소좀 미접촉 군), HEK293-HLA-G 푸소좀, 또는 HEK293 푸소좀의 1, 2, 3, 5, 10 주사를 전신적으로 및/또는 국소적으로 주사한 마우스. 신선한 전혈을 수합하고 상기 전혈을 수 시간 동안 완전히 응고되게 함으로써 혈청을 마우스로부터 수합한다. 혈청을 원심분리에 의해 펠렛화하고, 혈청 상층액을 제거한다. 음성 대조군은 가열 불활성화된 마우스 혈청이다. 음성 대조군 시료를 56°C에서 1시간 동안 가열한다. 혈청을 분취물에서 냉동시킬 수 있다.

[2255] 수여자 집단 내 50%의 세포가 푸소좀에서 페이로드를 받는 용량에 대해 푸소좀을 시험한다. 푸소좀은 본원에 기재된 다른 임의의 실시예를 통해 생성될 수 있고, 본원에 기재된 임의의 페이로드를 함유할 수 있다. 수여자 세포의 페이로드의 푸소좀 전달을 검정하는 많은 방법이 또한, 본원에 기재되어 있다. 이러한 특정 실시예에서, 페이로드는 Cre 단백질이고, 수여자 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 RPMI8226 세포이며, 이는 재조합 시 Cre를 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다. 50%의 수여자 세포가 RFP 양성인 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다. 다른 구현예에서, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받는 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다.

[2256] 푸소좀의 혈청 불활성화를 평가하기 위해, 푸소좀을 정상 혈청 또는 가열-불활성화된 혈청(또는 10% 가열-불활성화된 FBS를 무-혈청 대조군으로서 함유하는 배지) 내로 1:5 희석시키고, 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 배지를 부가적인 1:5 희석을 위해 반응에 첨가하고, 그 후에 1:10 비에서 2회 연속 희석하였다. 이 단계 후, 푸소좀은, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받은(예를 들어 RFP 양성인) 이전에 식별된 용량에서 존재해야 한다. 수여자 세포 중 50%가 페이로드를 받는 식별된 용량은 푸소좀에 걸쳐 유사할 수 있는 것으로 여겨진다.

[2257] 그 후에, 혈청에 노출된 푸소좀을 수여자 세포와 함께 인큐베이션한다. 페이로드를 받고, 따라서 RFP 양성인 세포의 퍼센트를 계산한다. 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, HEK293-HLA-G 푸소좀으로 처리된 마우스로부터의 혈청 및 가열-불활성화된 혈청과 함께 인큐베이션된 푸소좀 시료 사이에서 상이하지 않을 수 있으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화 또는 적응 면역 반응이 존재하지 않음을 나타낸다. 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, HEK293-HLA-G 푸소좀으로 1, 2, 3, 5 또는 10회 처리된 마우스로부터 인큐베이션된 푸소좀 시료 사이에서 상이하지 않을 수 있으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화 또는 적응 면역 반응이 존재하지 않았음을 나타낸다. 일부 상황에서, 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, 비히클로 처리된 마우스로부터의 혈청 또는 HEK293-HLA-G 푸소좀으로 처리된 마우스로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 푸소좀 시료 사이에서 상이하지 않으며, 이는 푸소좀의 혈청 불활성화 또는 적응 면역 반응이 존재하지 않았음을 나타낸다. 일부 상황에서, 페이로드를 받는 세포의 퍼센트는, HEK293-HLA-G 푸소좀에서보다 HEK293에 의해 유래된 푸소좀에 대해 더 작으며, 이는 HEK293-HLA-G 푸소좀의 혈청 불활성화 또는 적응 면역 반응이 존재하지 않음을 나타낸다.

[2258] **실시예 169: 푸소좀의 보체 표적화의 측정**

[2259] 이 실시예는 시험관내 검정법을 사용하여 푸소좀에 대한 보체 활성의 정량화를 기재한다. 본원에 기재된 변형된 푸소좀은 상응하는 비변형된 푸소좀과 비교하여 감소된 보체 활성을 유도할 수 있는 것으로 여겨진다.

- [2260] 이 실시예에서, 마우스로부터의 혈청을 푸소즘에 대한 보체 활성화에 대해 평가한다. 실시예는 모든 보체 경로에서 중심절(central node)인 보체 C3a의 수준을 측정한다. 주목할만하게는, 본원에 기재된 방법을 프로토콜에 대한 최적화와 함께 인간, 래트, 원숭이에 동등하게 적용할 수 있다.
- [2261] 이 실시예에서, 푸소즘을 이전의 실시예 중 임의의 하나에 의해 생성한다. 푸소즘을, 보체 조절 단백질 DAF의 렌티바이러스-매개 발현으로 변형된 HEK293 세포(HEK293-DAF 푸소즘) 또는 보체 조절 단백질을 발현하지 않는 HEK 293 세포(HEK293 푸소즘)로부터 발생시킨다. 다른 보체 조절 단백질, 예컨대 붕괴-가속 인자 인자에 결합하는 단백질(DAF, CD55), 예를 들어 인자 H(FH)-유사 단백질-1(FHL-1), 예를 들어 C4b-결합 단백질(C4BP), 예를 들어 보체 수용체 1(CD35), 예를 들어 막 보조인자 단백질(MCP, CD46), 예를 들어 프로텍틴(CD59), 예를 들어 전형적인 및 대안적인 보체 경로 CD/C5 컨버타제 효소를 저해하는 단백질, 예를 들어 MAC 조립을 조절하는 단백질이 또한, 사용될 수 있다.
- [2262] 혈청을 미접촉 마우스, HEK293-DAF 푸소즘이 투여된 마우스, 또는 HEK293 푸소즘이 투여된 마우스로부터 회수한다. 신선한 전혈을 수합하고 상기 전혈을 수 시간 동안 완전히 응고되게 함으로써 혈청을 마우스로부터 수합한다. 혈청을 원심분리에 의해 펠렛화하고, 혈청 상층액을 제거한다. 음성 대조군은 가열 불활성화된 마우스 혈청이다. 음성 대조군 시료를 56°C에서 1시간 동안 가열한다. 혈청을 분취물에서 냉동시킬 수 있다.
- [2263] 수여자 집단 내 50%의 세포가 푸소즘에서 페이로드를 받는 용량에 대해 상이한 푸소즘을 시험한다. 푸소즘은 본원에 기재된 다른 임의의 실시예를 통해 생성될 수 있고, 본원에 기재된 임의의 페이로드를 함유할 수 있다. 수여자 세포로의 페이로드의 푸소즘 전달을 검정하는 많은 방법이 또한, 본원에 기재되어 있다. 이러한 특정 실시예에서, 페이로드는 Cre 단백질이고, 수여자 세포는 CMV 프로모터 하에 "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 안정하게 발현하는 RPMI8226 세포이며, 이는 재조합 시 Cre를 GFP 발현으로부터 RFP 발현으로 스위치하며, 이는 융합 및 마커로서 Cre 전달을 나타낸다. 50%의 수여자 세포가 RFP 양성인 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다. 다른 구현예에서, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받는 식별된 용량을 추가의 실험에 사용한다. 바람직한 구현예에서, 50%의 수여자 세포가 페이로드를 받는 식별된 용량은 푸소즘에 걸쳐 유사하다.
- [2264] 50%의 수여자 세포가 포스페이트-완충 식염수(PBS, pH 7.4) 중 페이로드를 받는 푸소즘의 용량에서 출발하는 푸소즘의 2-배 희석물을, 동일한 푸소즘으로 처리된 마우스 또는 미접촉 마우스로부터의 혈청의 1:10 희석물과 혼합하고(검정법 용적, 20 μ l), 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 시료를 추가로 1:500 희석시키고, C3a에 특이적인 효소-연결된 면역흡착 검정법(ELISA)에 사용한다. ELISA는 LifeSpan BioSciences Inc에 의해 판매되는 마우스 보체 C3a ELISA 키트 제품 LS-F4210이며, 이는 시료 내 C3a의 농도를 측정한다. 200 pg/ml의 C3a가 존재하는 푸소즘의 용량을, 마우스로부터 분리된 혈청에 걸쳐 비교한다.
- [2265] 일부 상황에서, 200 pg/ml의 C3a가 존재하는 푸소즘의 용량은, HEK293 마우스 혈청과 함께 인큐베이션된 HEK293 푸소즘에 대해서보다 HEK-293 DAF 마우스 혈청과 함께 인큐베이션된 HEK293-DAF 푸소즘에 대해 더 크며, 이는 푸소즘을 표적화하는 보체 활성화가 HEK293-DAF 푸소즘보다 HEK293 푸소즘으로 처리된 마우스에서 더 큼을 나타낸다. 일부 상황에서, 200 pg/ml의 C3a가 존재하는 푸소즘의 용량은, 미접촉 마우스 혈청과 함께 인큐베이션된 HEK293 푸소즘에 대해서보다 미접촉 마우스 혈청과 함께 인큐베이션된 HEK293-DAF 푸소즘에 대해 더 크며, 이는 푸소즘을 표적화하는 보체 활성화가 HEK293-DAF 푸소즘보다 HEK293 푸소즘으로 처리된 마우스에서 더 큼을 나타낸다.
- [2266] **실시예 170: 푸소즘 생성 프로토콜 내로의 ARRDC1의 혼입**
- [2267] 이 실시예는, 푸소즘 생성 프로토콜 내로의 어레스틴 도메인-함유 단백질 1 (ARRDC1)의 용도를 기재하고, 푸소즘 수에 대한 ARRDC1의 효과 및 생성된 푸소즘에 의한 Cre의 전달을 기재한다. 세포 표면 상에 니파 바이러스 부착(NiV-G) 및 융합(NiV-F) 외피 당단백질, 박테리오파지 P1 리컴비나제 Cre 및 ARRDC1 단백질을 발현하는 HEK-293T 세포로부터 생성된 푸소즘을 수합하고 제조하는 표준 절차에 의해, Cre를 캡슐화하는 푸소즘을 발생시켰다. 대조군 푸소즘을, Cre 및 NiV-G 및 NiV-F 당단백질만 발현하는 HEK-293T 세포로부터 생성하였다. 그 후에, Cre를 전달하는 푸소즘의 능력 및 푸소즘 수에 대한 ARRDC1의 효과를 하기와 같이 결정하였다.
- [2268] "LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP" 카세트를 발현하도록 조작된 수여자 HEK-293T 세포를 블랙, 투명-바닥 96-웰 플레이트 내의 완전 배지에 30,000 세포/웰로 평판배양하였다. 수여자 세포를 평판배양한 후 24시간째에, Cre를 캡슐화하는 푸소즘의 범위를 수여자 LoxP-GFP-정지-LoxP-RFP HEK-293T 세포에 적용하였다.
- [2269] Cre 전달이 생성 프로토콜 내로의 ARRDC1 혼입에 의해 증강된 정도를 정량화하기 위해, 하나의 수여자 세포 그룹을 ARRDC1에 의해 형질감염된 세포로부터 생성된 푸소즘(NiV-G + NiV-F + NLS-Cre + ARRDC1)으로 처리하고,

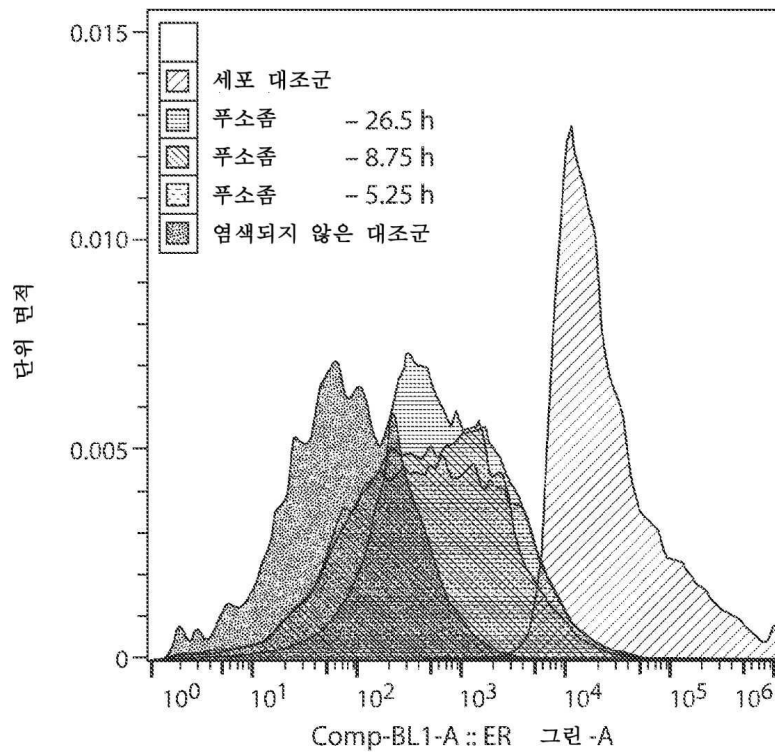
하나의 수여자 세포 그룹을 대조군 푸소좀 (NiV-G + NiV-F + NLS-Cre)으로 처리하였다. 푸소좀을 37℃ 및 5% CO₂에서 24시간 동안 수여자 세포와 함께 인큐베이션하였다. 대조군으로서, 수여자 세포의 부가적인 그룹을 또한, 1.25 uL cer 리컴비나제 제시클(Takara, Cat # 631449)로 처리하였다. 24시간 후, 1 µg/mL Hoechst 33342를 완전 배지에서 희석시키고, 37℃ 및 5% CO₂에서 30분 동안 세포와 함께 인큐베이션하였다.

[2270] Hoescht의 첨가 후, 세포를 유세포분석을 통해 분석하였다. 간략하게는, 수여자 세포 시료를 해리시키고, 수합하고, 1xPBS 완충제로 3회 세척하고, 1xPBS 완충제에 재현탁시키고, 여기를 위해 405 nm, 488 nm 및 561 nm 레이저를 사용하여 유세포분석에 의해 분석하고(Attune, ThermoFisher), 획득을 위해 440/50BP (Hoescht), 530/30BP (GFP) 및 585/16BP (RFP) 방출 필터를 각각 설정하였다. Attune NxT 소프트웨어를 획득에 사용하였고, FlowJo 소프트웨어를 분석에 사용하였다. 데이터 획득 및 분석을 위해, FSC 및 SSC 채널을 선형 축 상에서 설정하여, 수여자 세포를 나타내는 집단을 결정하였다. 그 후에, 이 집단을 게이팅하고, 이 세포 게이트 내에서 최소 10,000 사건을 각각의 조건에 대해 수합하였다. 그 후에, Hoescht (440/50BP) 방출 채널에서 수여자 세포를 나타내는 집단을 게이팅하고, 이 게이트를 사용하여 GFP (530/30BP) 사건을 제시하였다. 그 후에, GFP+ 수여자 세포를 나타내는 집단을 게이팅하고, 이 게이트를 사용하여 RFP (585/16BP) 사건을 제시하였다. 그 후에, RFP-양성 세포 (Cre를 받는 수여자 세포)를 우선, 비처리된 세포에 기초하여 음성 게이트 및 Cre 리컴비나제 제시클로 처리된 RFP-양성 세포에 기초하여 양성 게이트를 설정함으로써, Cre 전달에 대한 메트릭으로서 정량화하였다. 최고 용량에서, ARRDC1에 의해 형질감염된 세포로부터 생성된 Cre-로딩된 푸소좀은 총 GFP-양성 수여자 세포의 9.2% RFP-양성 세포에 상응하는 Cre 전달의 관찰 가능한 수준을 보여주었다(도 52a). 그러나, ARRDC1의 부재 하에, Cre의 전달은 실질적으로 감소되었으며, 이때 전달 수준은 1.8% RFP-양성 세포에 상응하였다(도 52a). 비처리된 수여자 세포는 임의의 인지 가능한 RFP-양성 세포를 보여주지 않았다. 종합하여, 이들 데이터는 푸소좀-기반 Cre 전달을 증강시키는 ARRDC1의 능력을 예시한다.

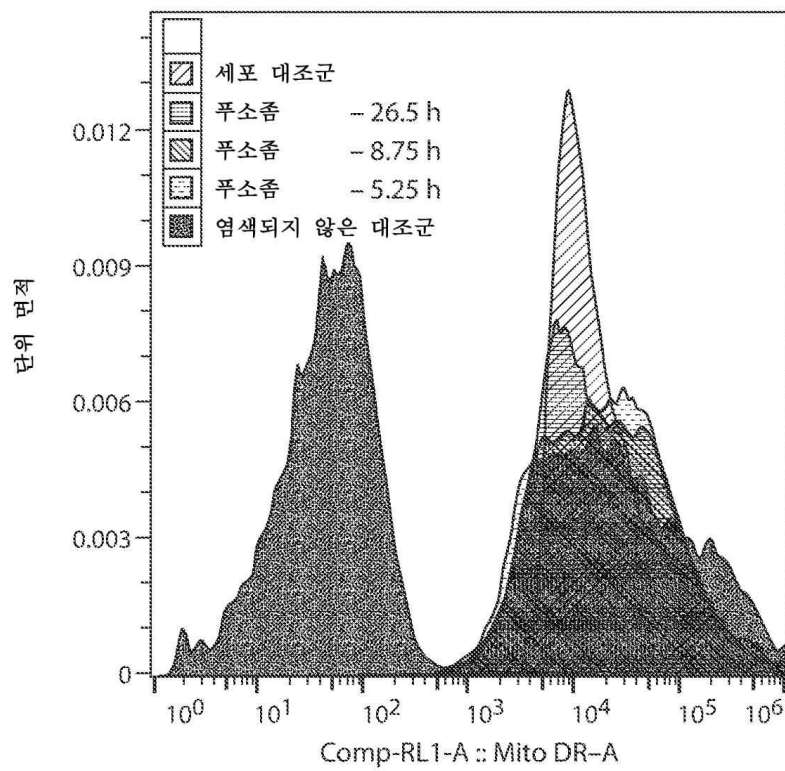
[2271] 형광 나노입자 추적 분석(fNTA)을 사용하여, ARRDC1에 의해 형질감염된 세포로부터 생성된 푸소좀은 2.8×10^{11} 입자/mL의 농도를 나타낸 반면, ARRDC1의 부재 하에 생성된 푸소좀은 1.2×10^{11} 입자/mL의 농도를 나타내었고(도 52b), 이는 생성자 세포에서 ARRDC1의 존재가 더 많은 CellMask Orange+ (fNTA) 입자의 생성을 초래함을 실증한다.

도면

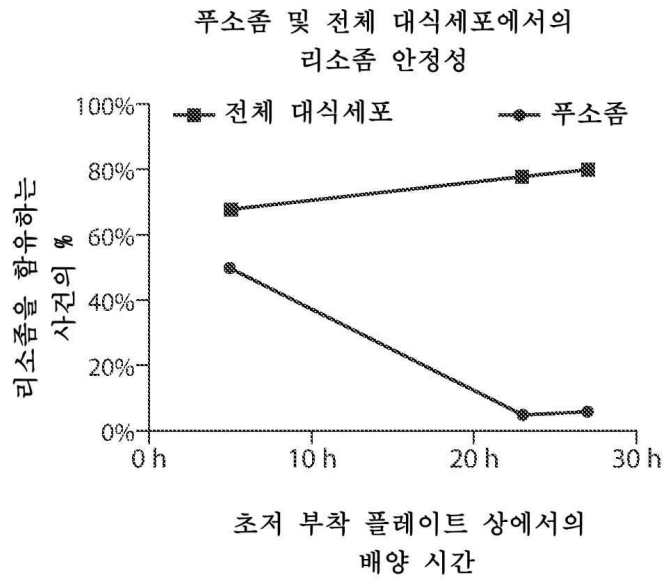
도면1



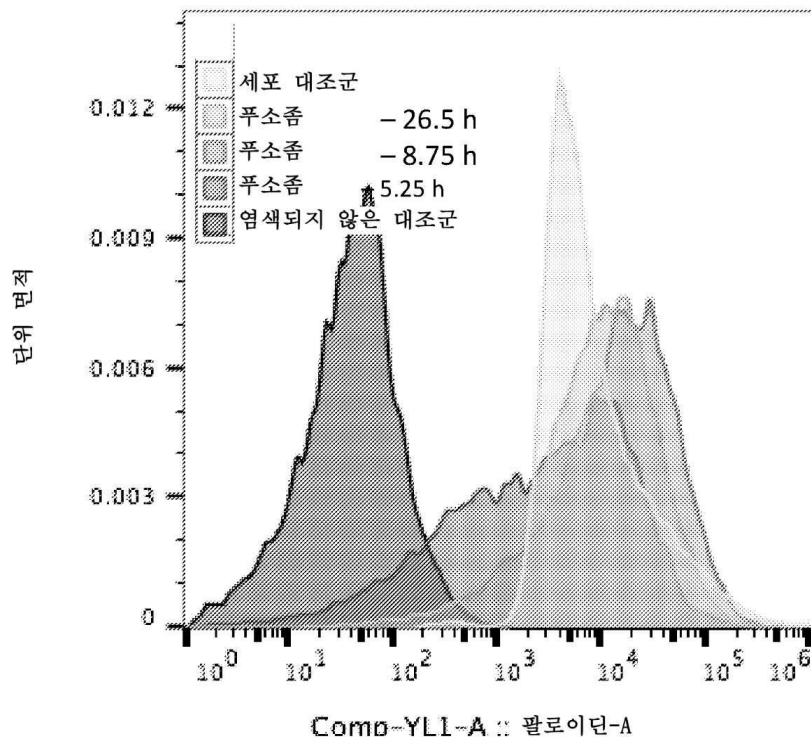
도면2



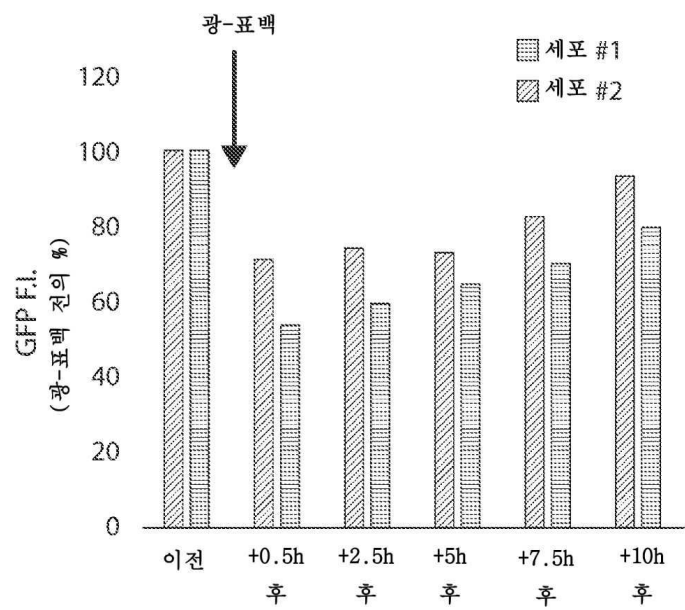
도면3



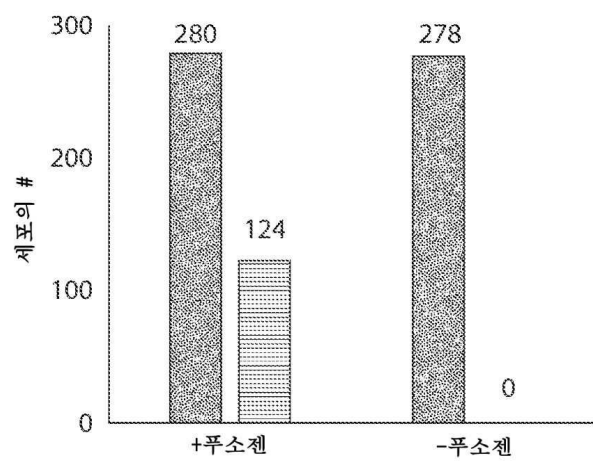
도면4



도면5

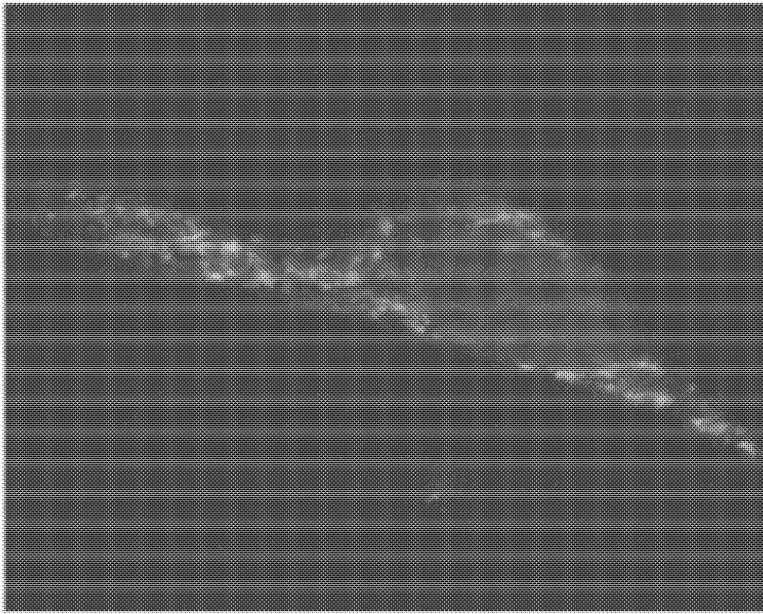


도면6

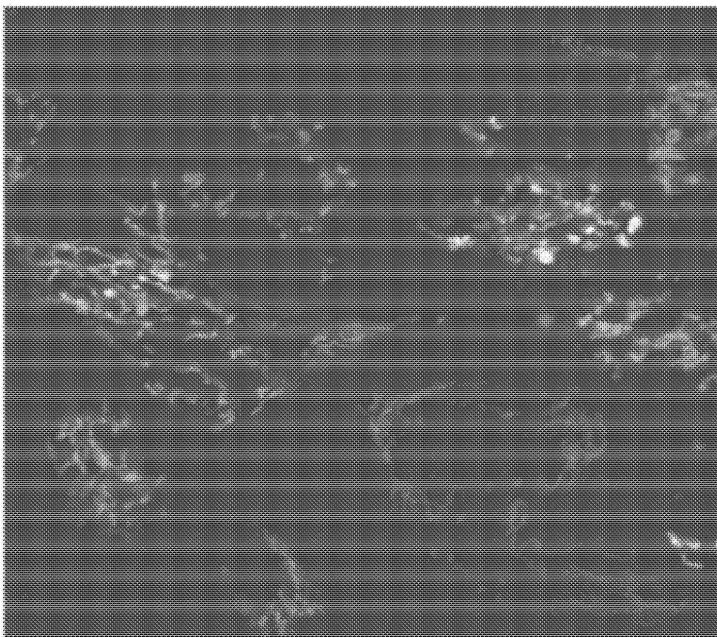


푸소좀 전달 분획: 0.44 0.00

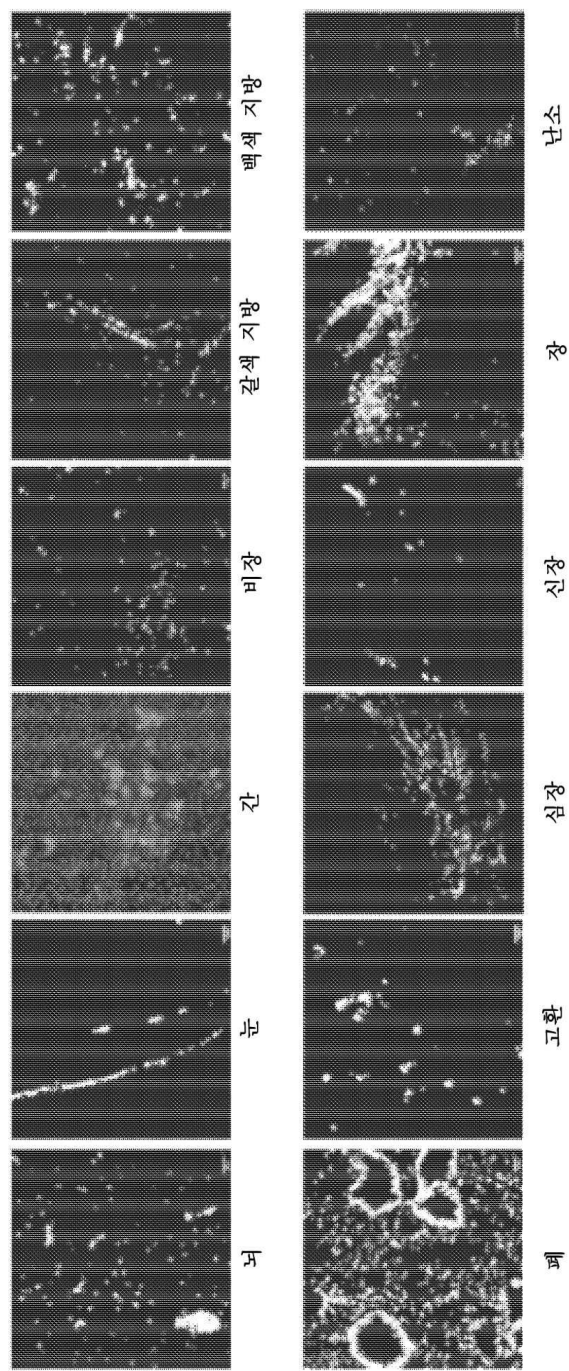
도면7



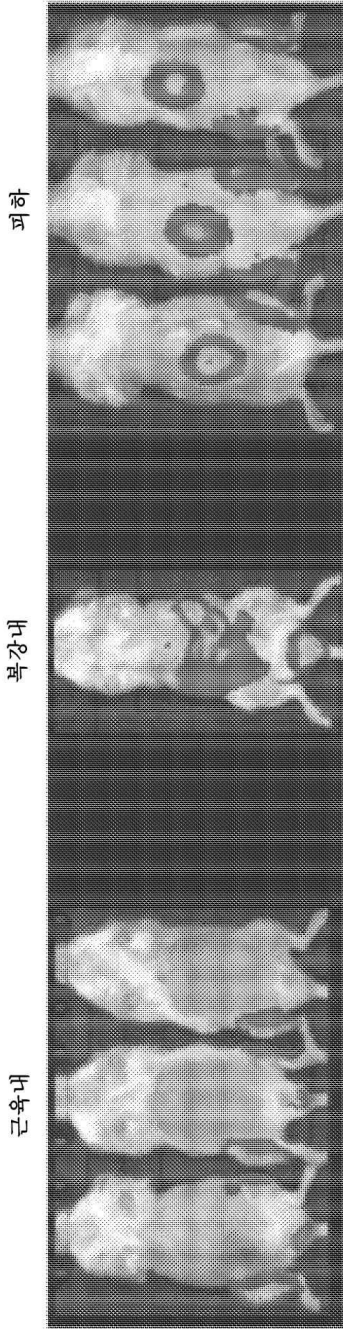
도면8



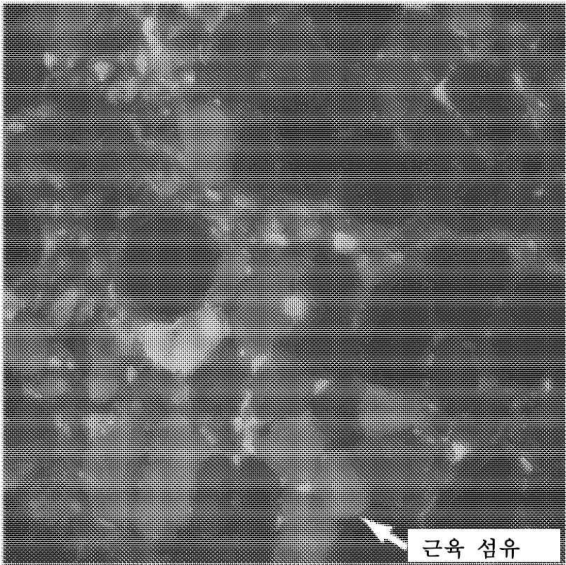
도면9



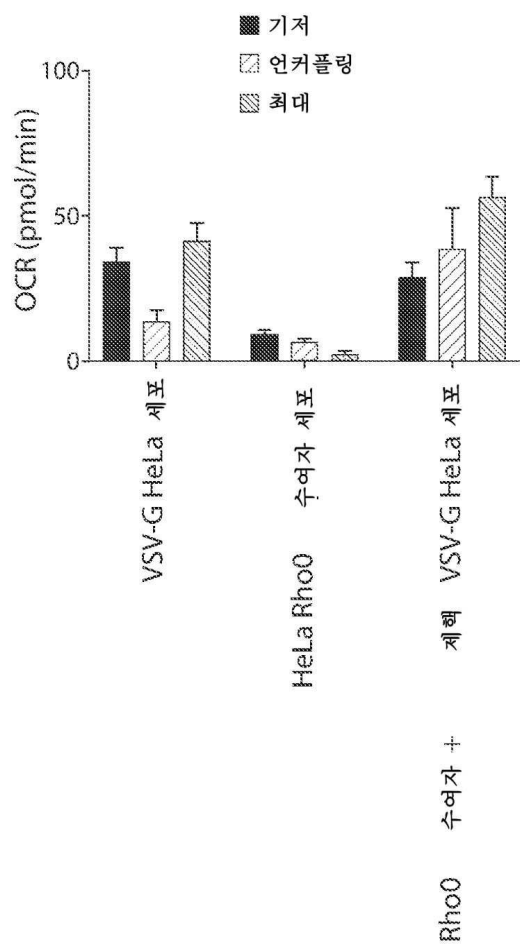
도면10



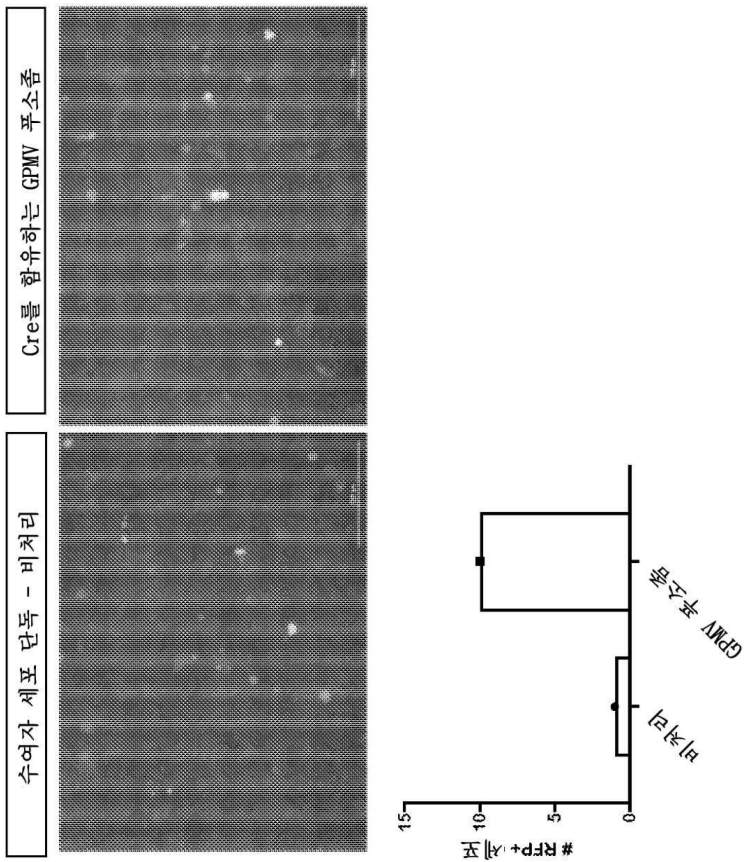
도면11



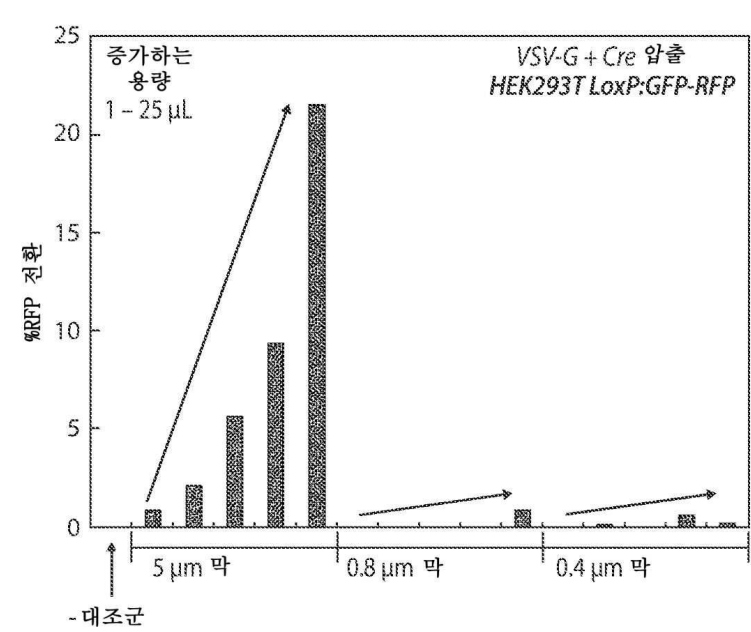
도면12



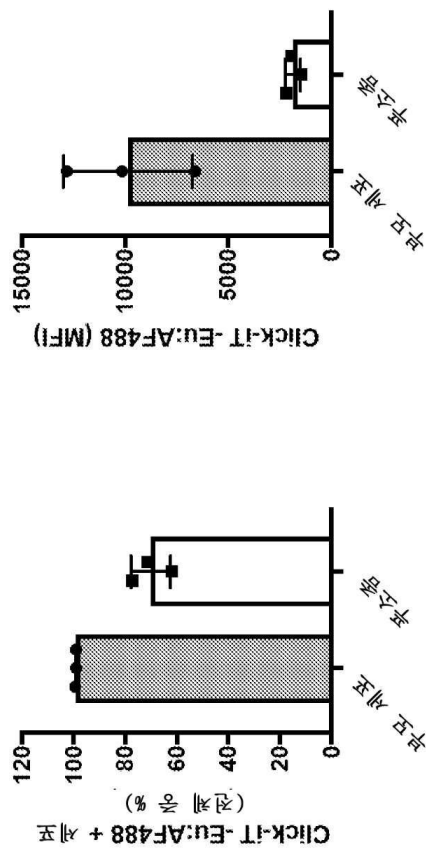
도면13



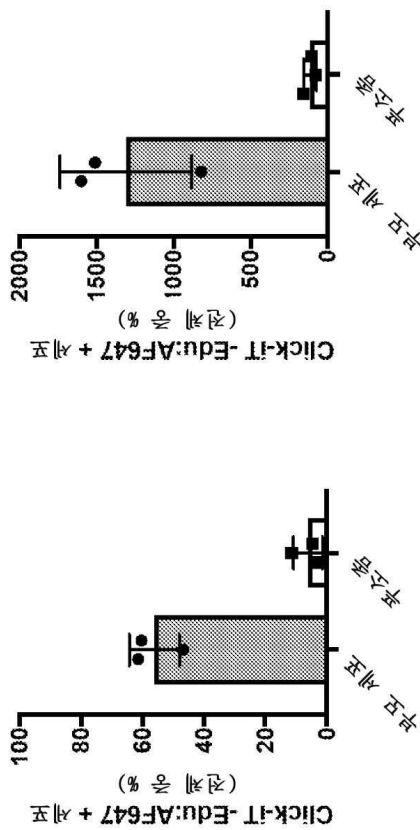
도면14a



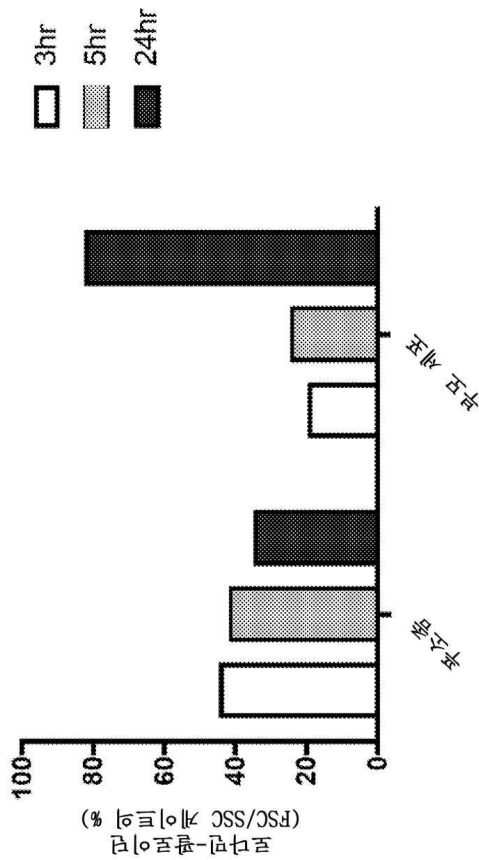
도면14b



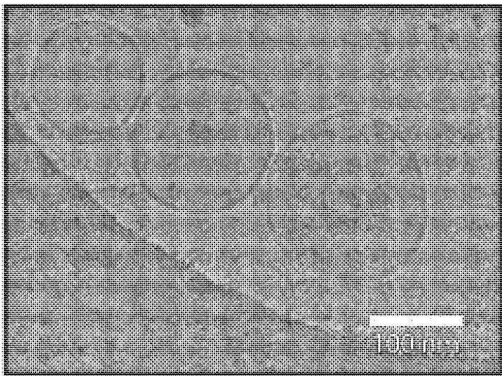
도면14c



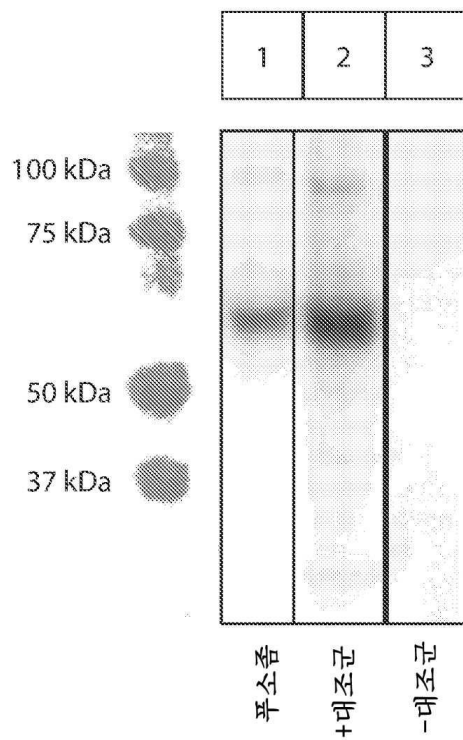
도면14d



도면15



도면16



도면17a

Nanosight NS300 조건			Nanosight NS300 설정	
온도	/C	24.089	검출 역치	17
점도	/cP	0.907452	최대 점프 모드	Auto
카메라 유형		sCMOS	최대 점프 거리	24.9209
레이저 유형		Green	블리(blur)	Auto
카메라 수준		15	최소 트랙 길이	Auto
슬라이더 셔터		1206	제1 프레임	0
슬라이드 게인		366	분석된 총 프레임	1498
셔터	/ms	30.15		
카메라 히스토그램 상한		3294		
카메라 히스토그램 하한		0		
프레임 속도/fps		24.9825		
주사기 펌프 속도	/AU	50		

도면17d

		푸소좁	부모 세포
평균 직경	(nm)	128.7	175.4
평균 용적	(μm^3)	0.067	7.421

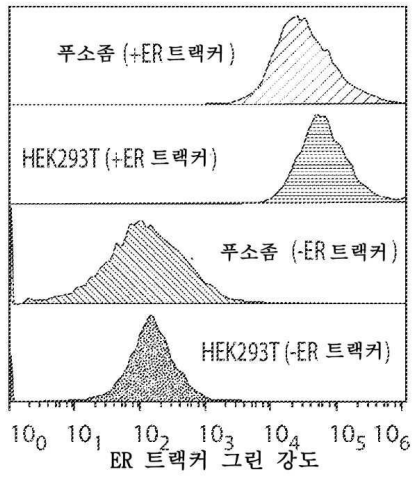
도면18

		푸소좁	부모 세포
평균 직경	(nm)	128.7	175.4
최소 직경	(nm)	14	29
최대 직경	(nm)	18720	19802
중앙값 직경	(nm)	134	99
10% 변위치	(nm)	53	52
25% 변위치	(nm)	88	66
75% 변위치	(nm)	226	241
90% 변위치	(nm)	4450	10649
평균 용적	(μm^3)	0.067	7.421

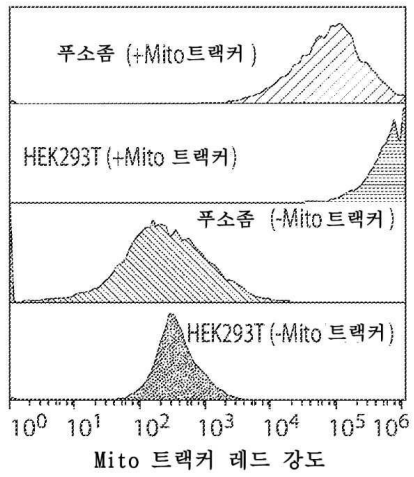
도면19

		푸소좁	부모 세포
평균 직경	(nm)	128.7	175.4
평균 용적	(μm^3)	0.067	7.421

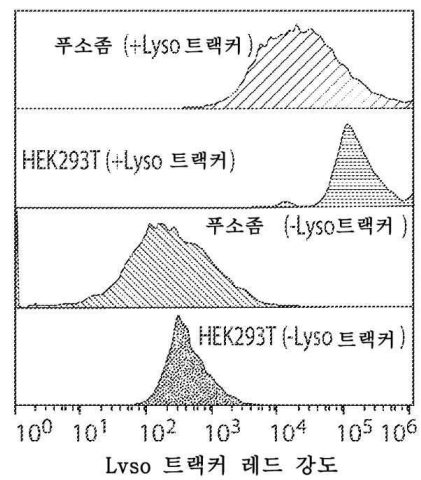
도면20a



도면20b

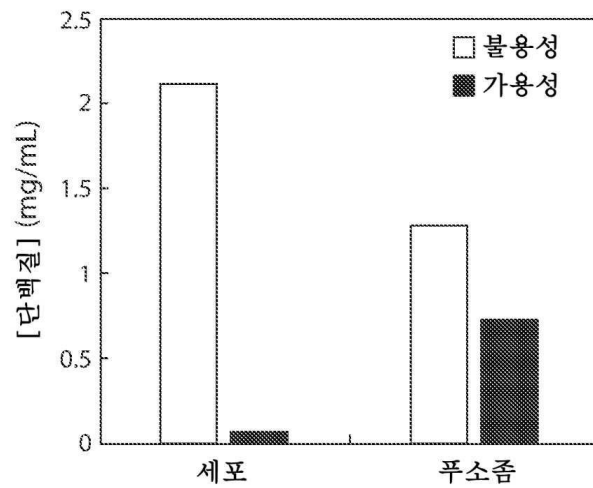


도면20c

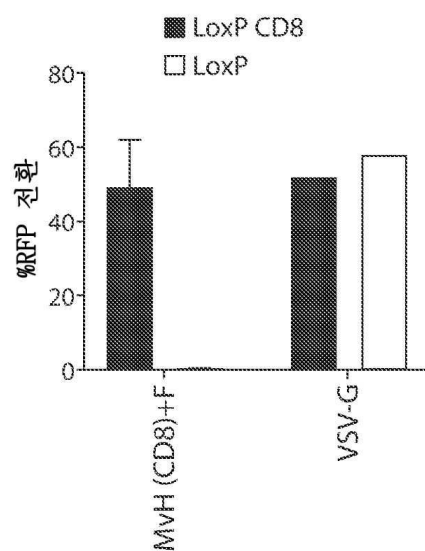


도면21

	[단백질] (mg/mL)		비
	불용성	가용성	
세포	2.12	0.06	0.028
푸소좀	1.28	0.72	0.563

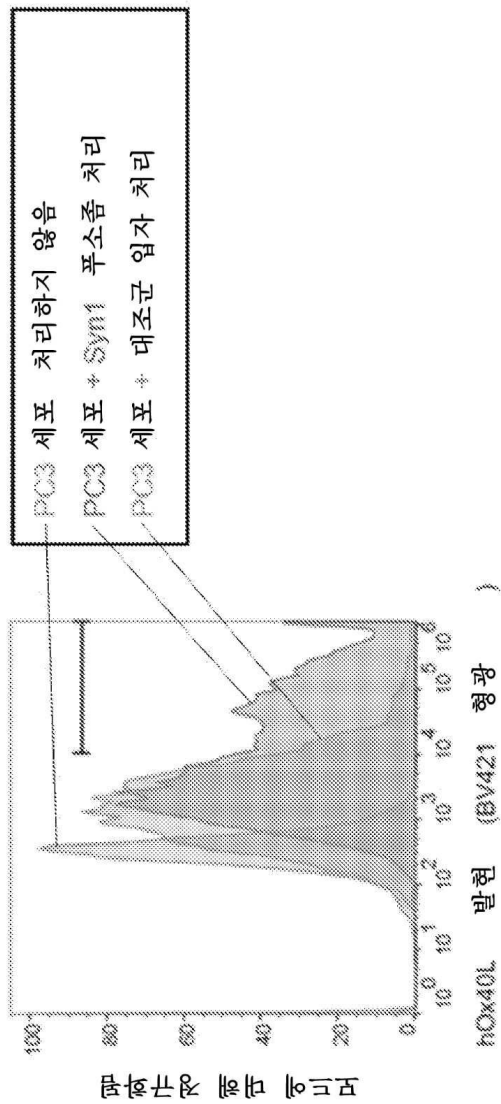


도면22

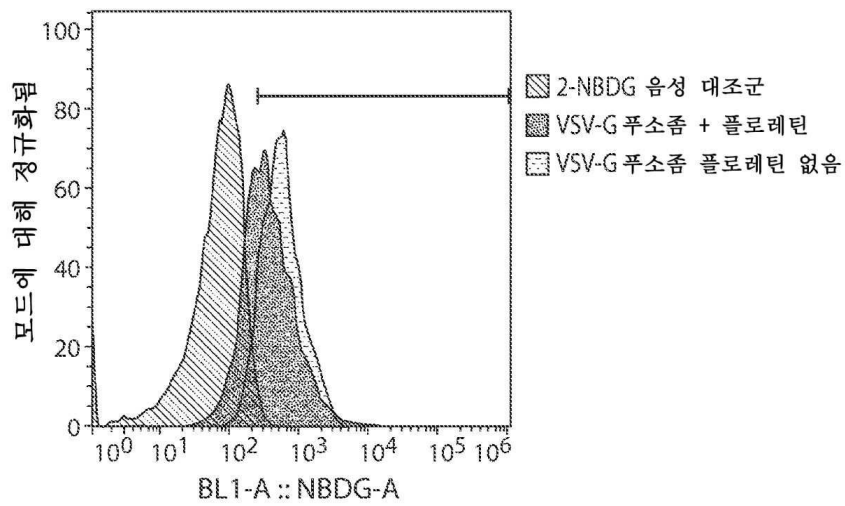


푸소좀	표적화된 융합의 절대량
MvH(CD8)+F	48.8%
VSV-G	0%

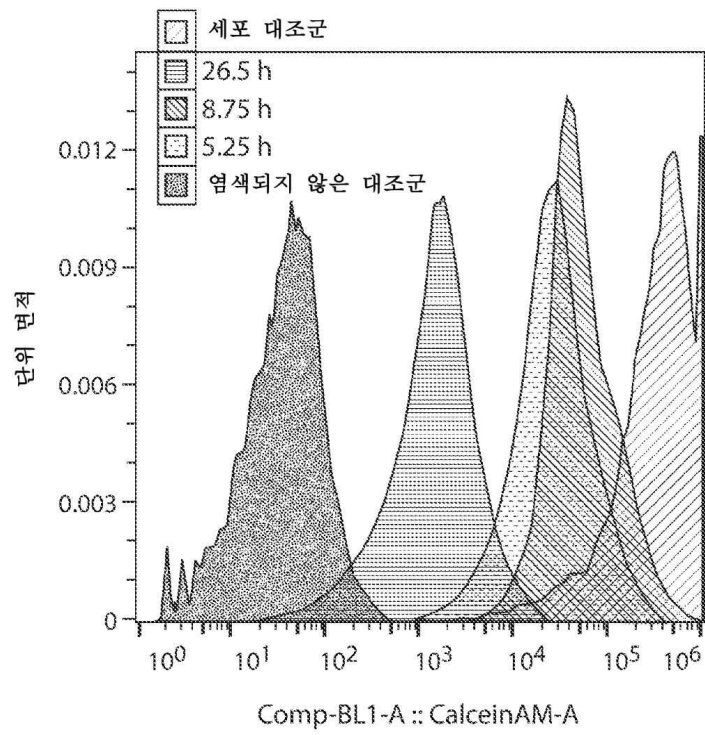
도면23



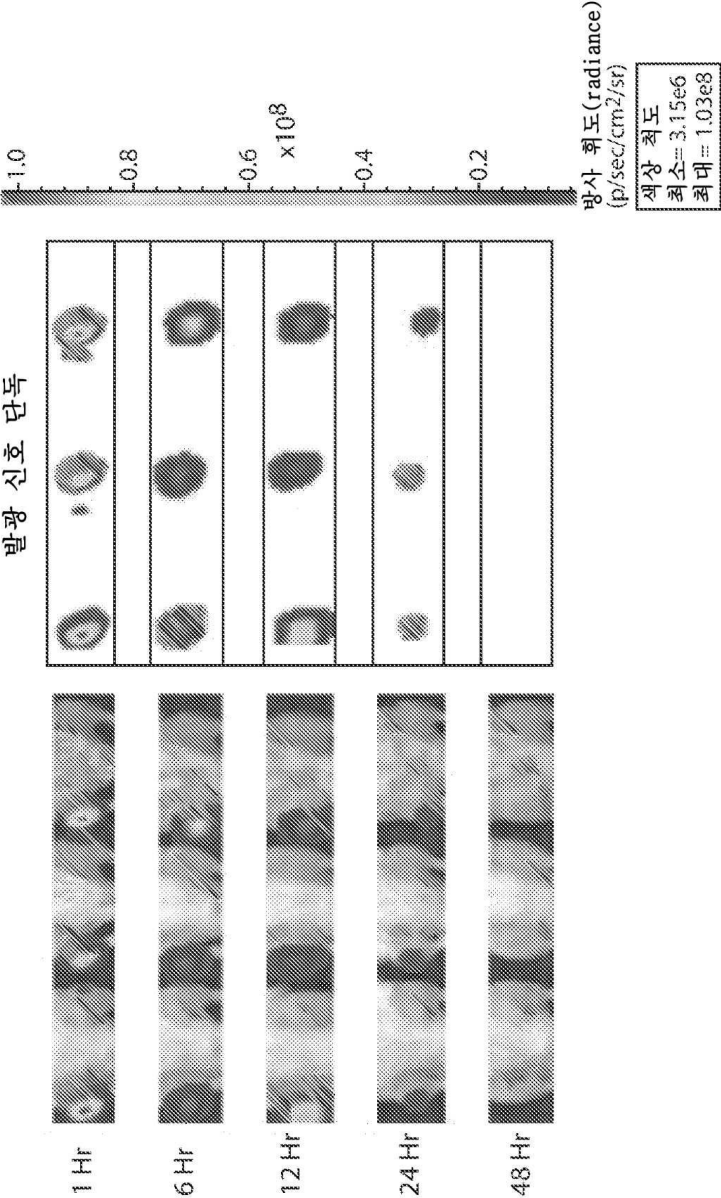
도면24



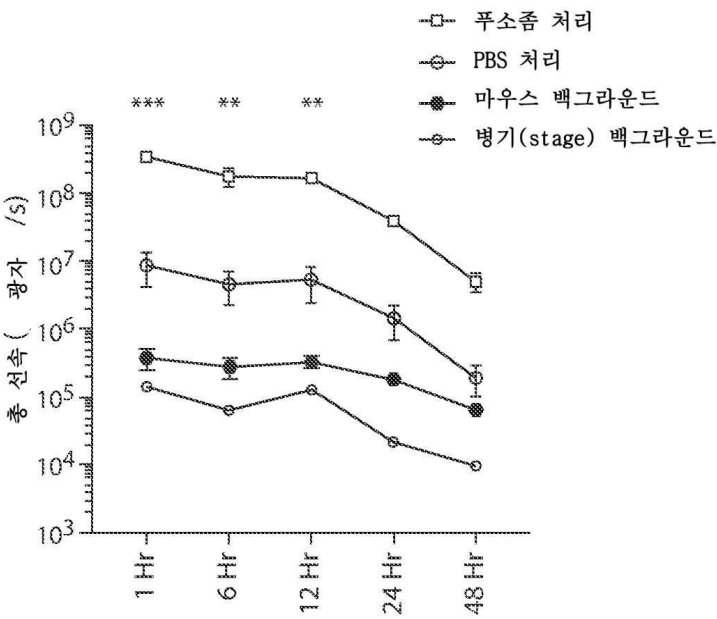
도면25



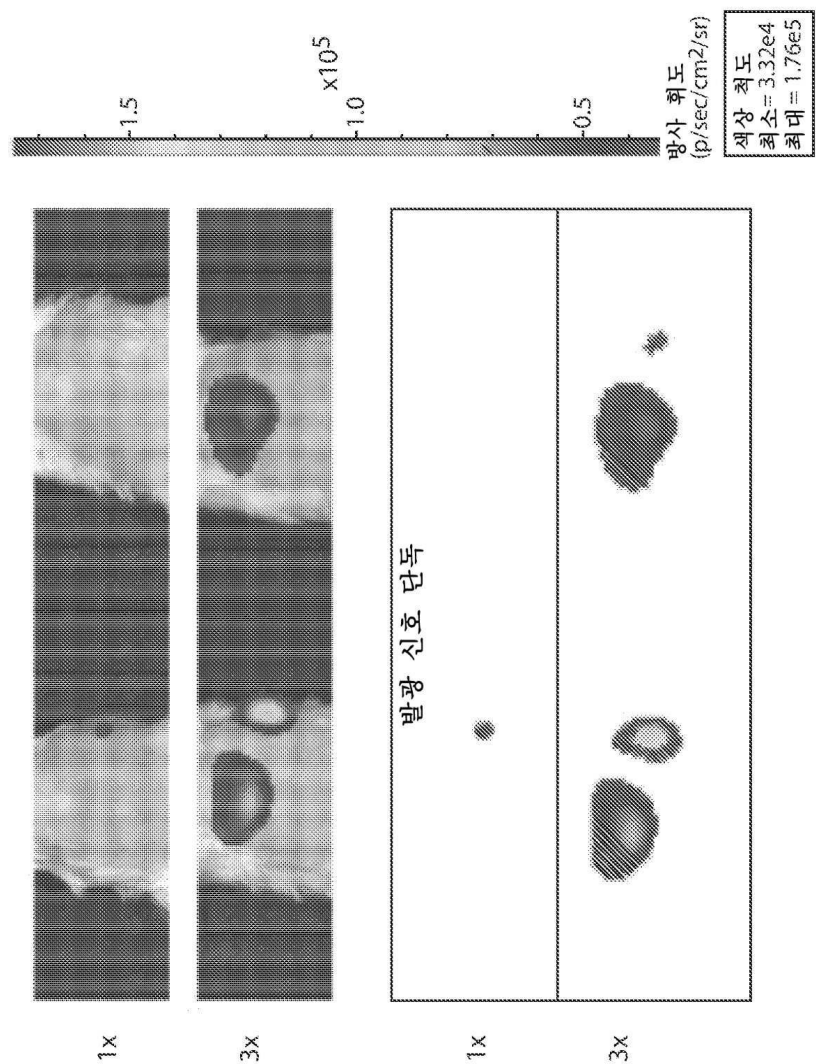
도면26a



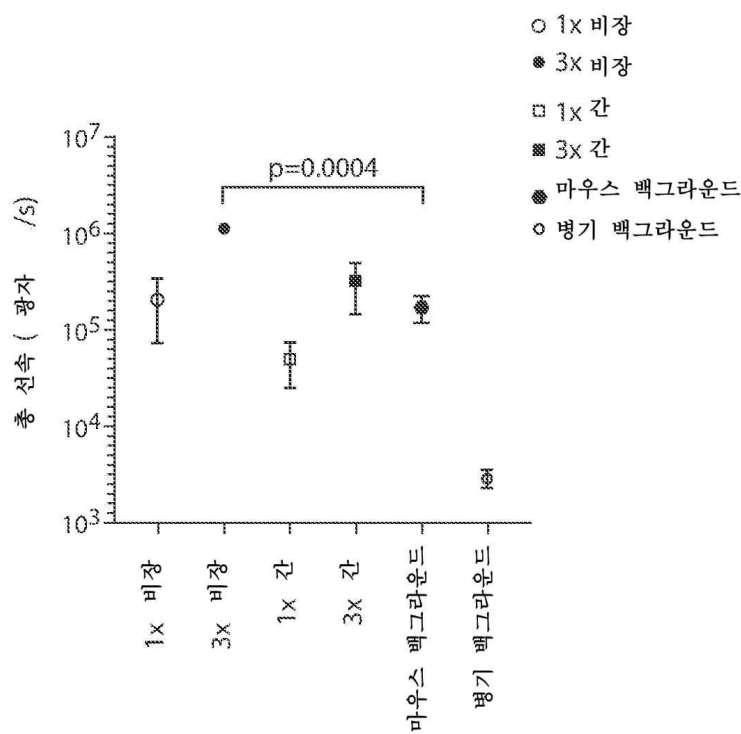
도면26b



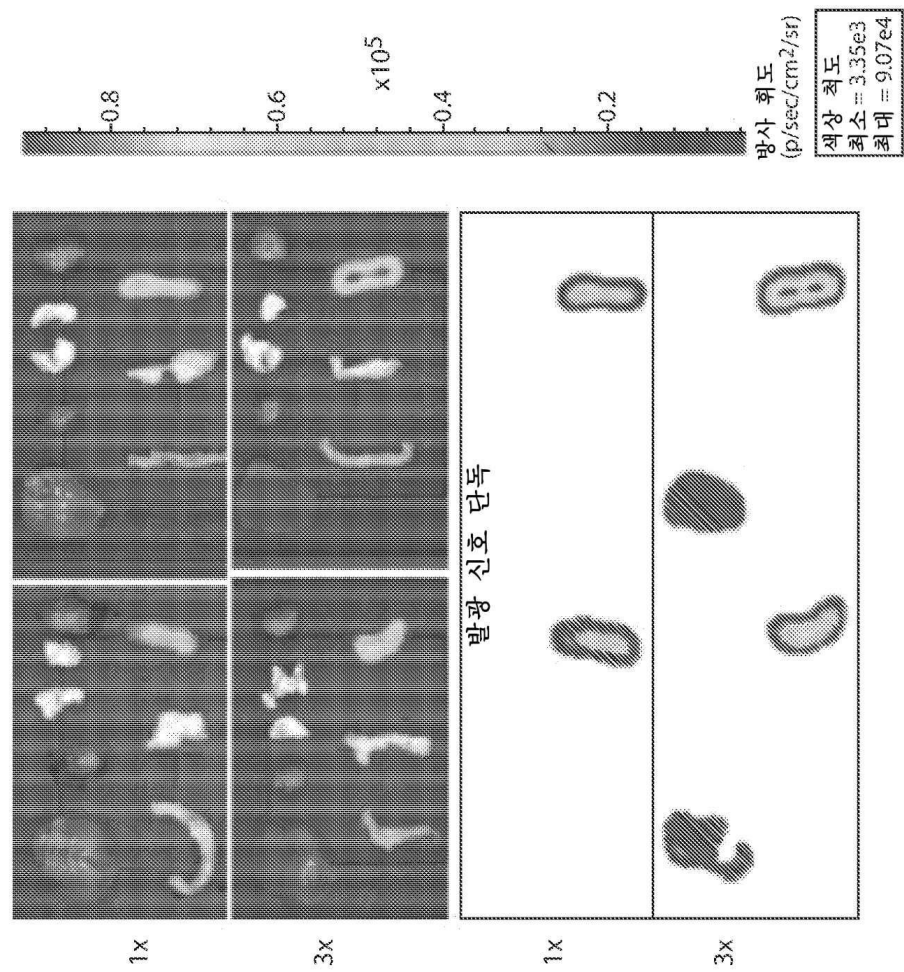
도면27a



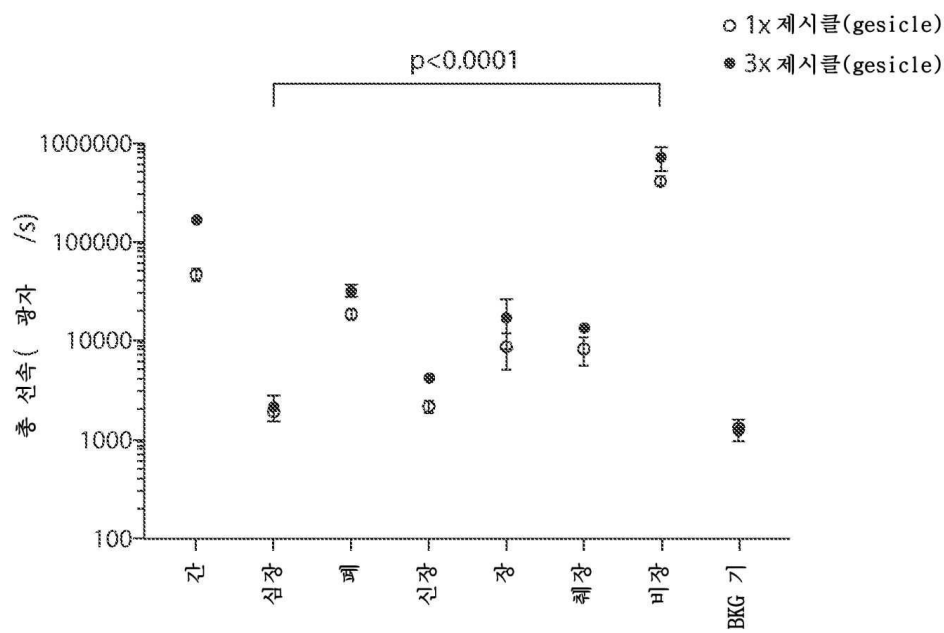
도면27b



도면28a



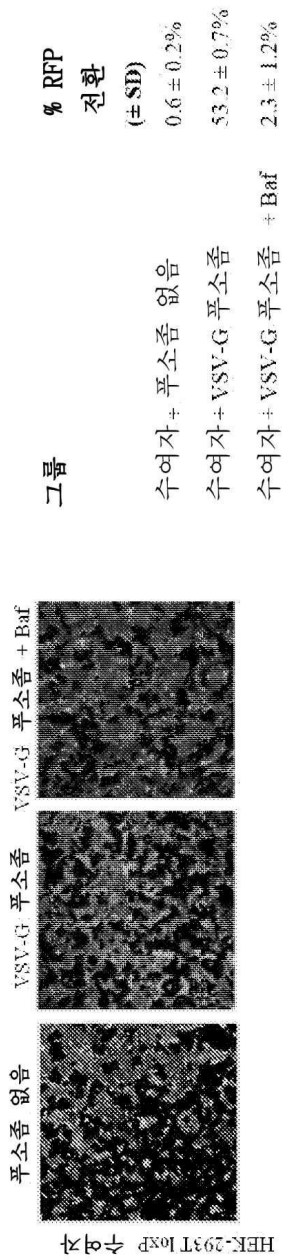
도면28b



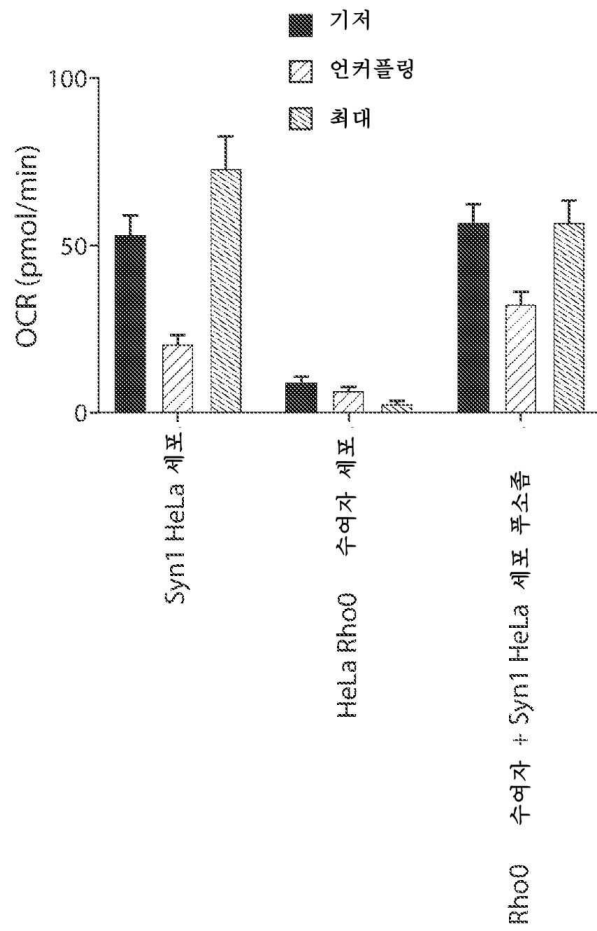
도면29

그룹	% RFP 전환 (±SD)
수여자+ 푸소좀 없음	0.4 ± 0.2%
수여자+ NivG+ 푸소좀	88.9 ± 3.4%
수여자+ NivG+ 푸소좀 + Baf	68.1 ± 2.7%

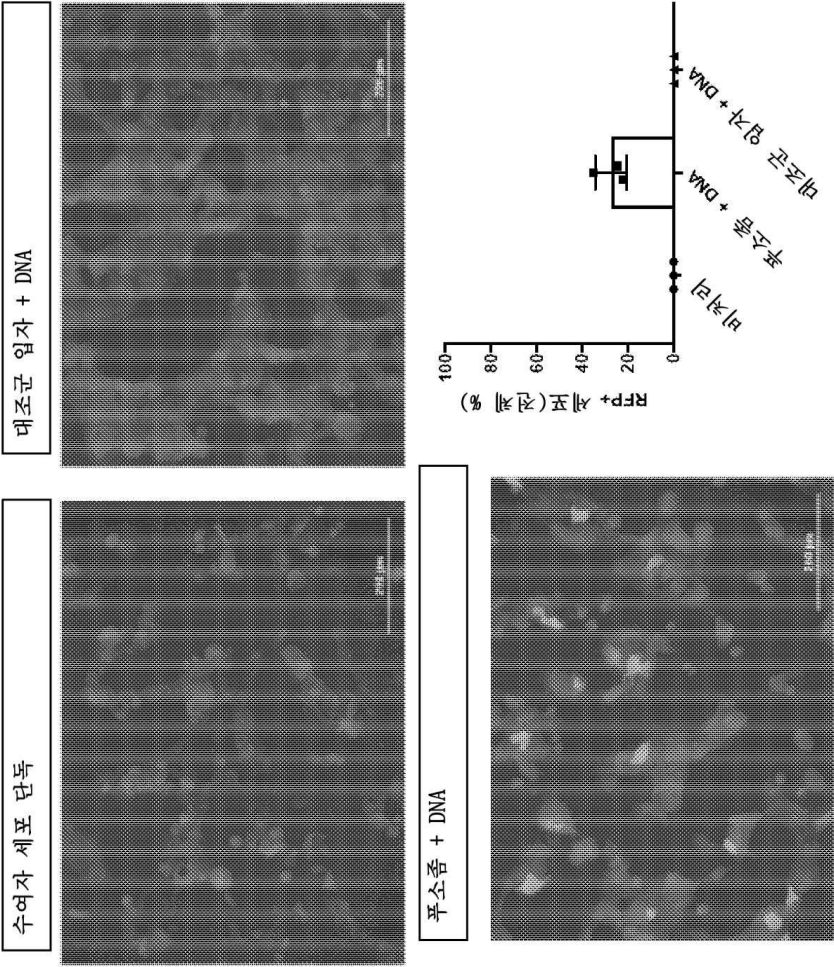
도면30



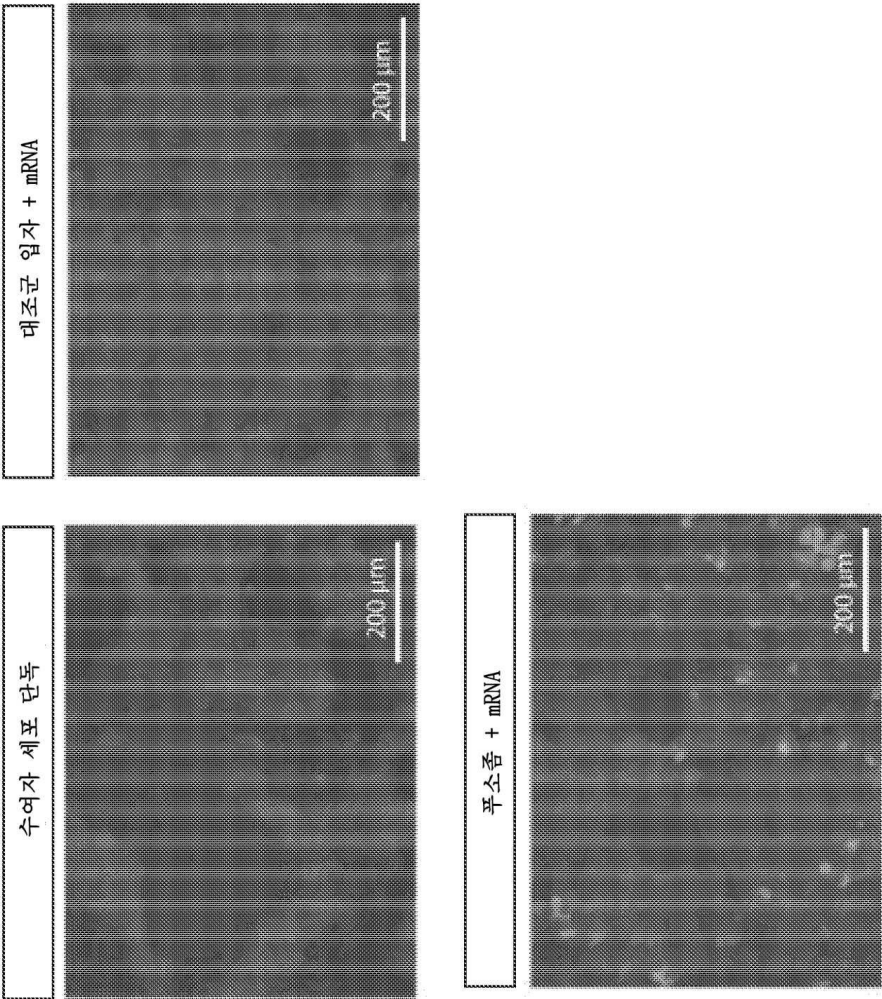
도면31



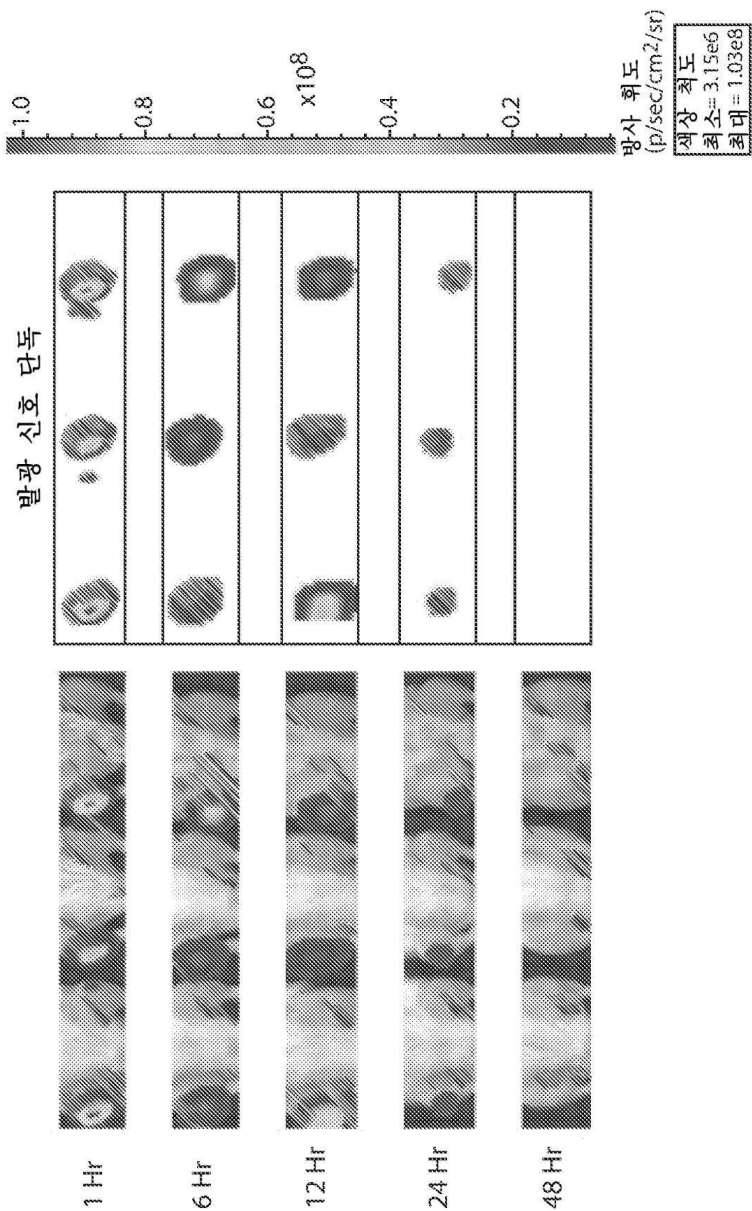
도면32



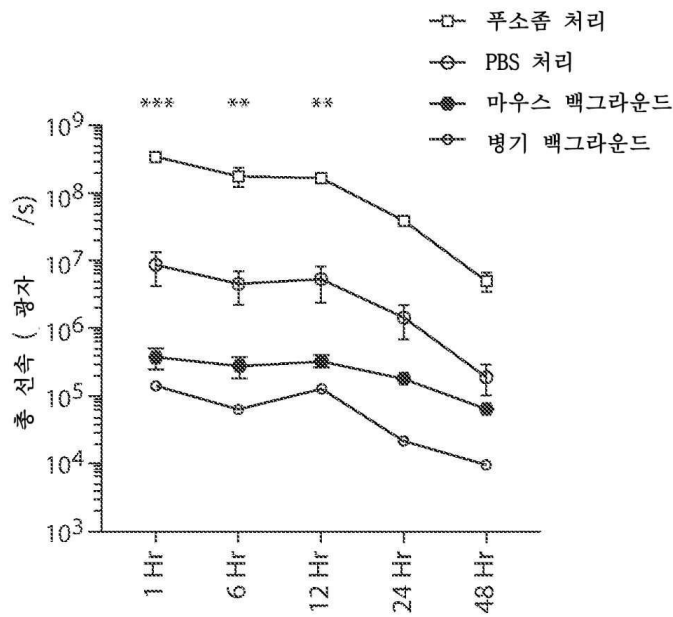
도면33



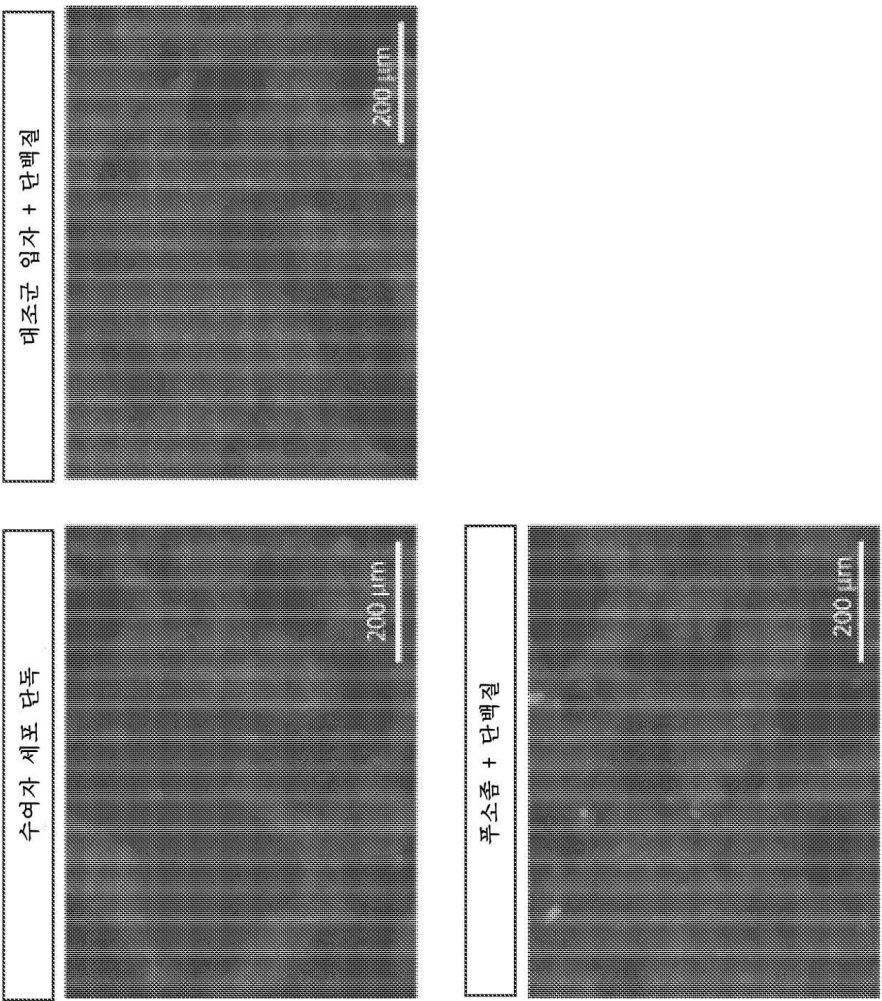
도면34a



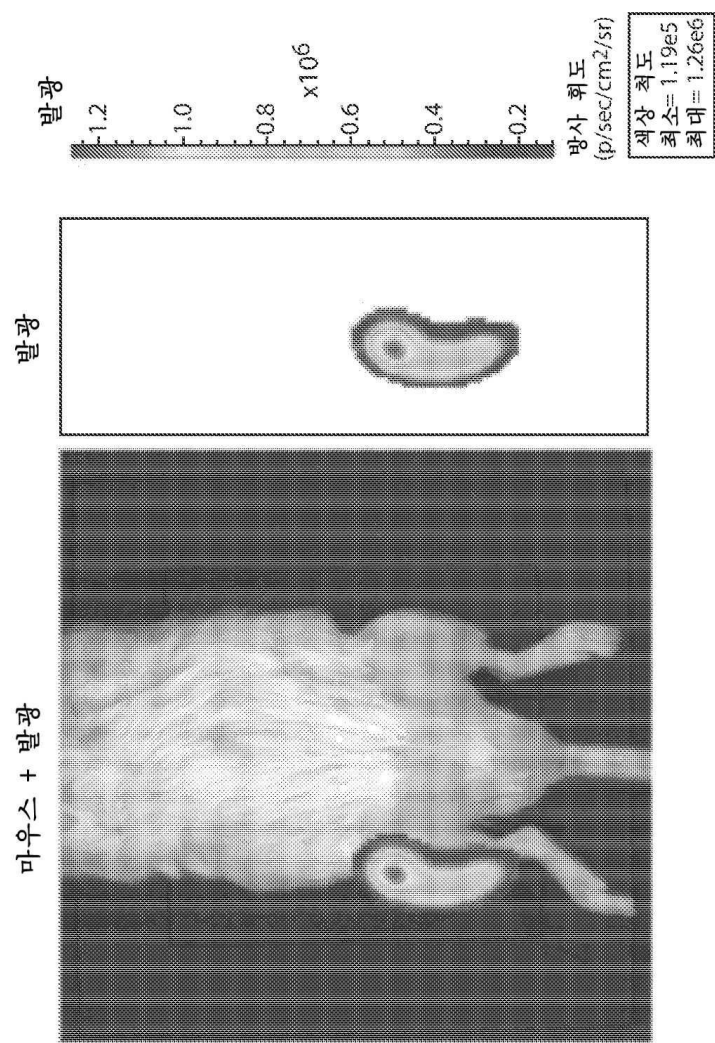
도면34b



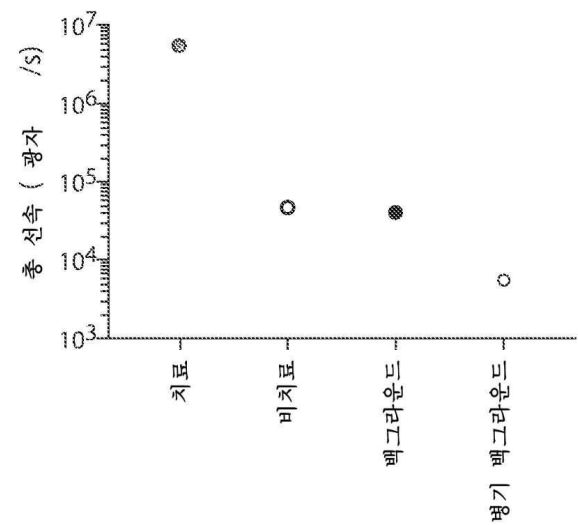
도면35



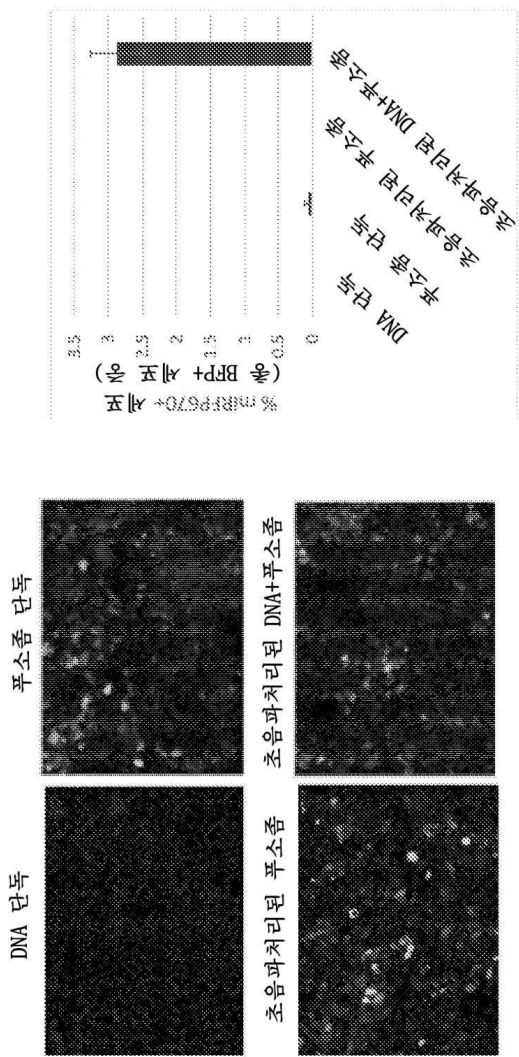
도면36a



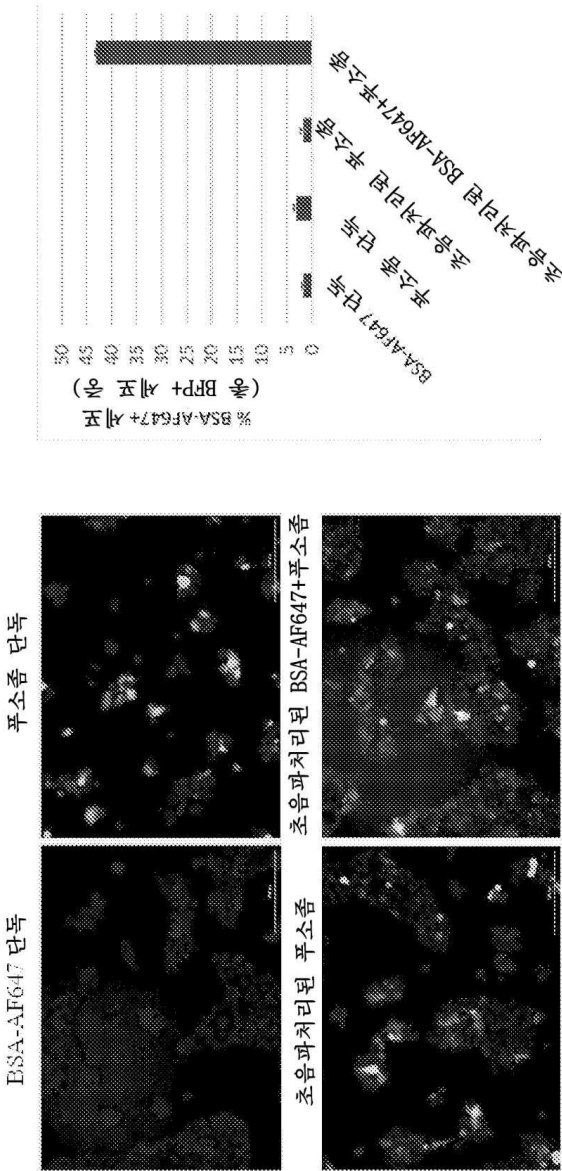
도면36b



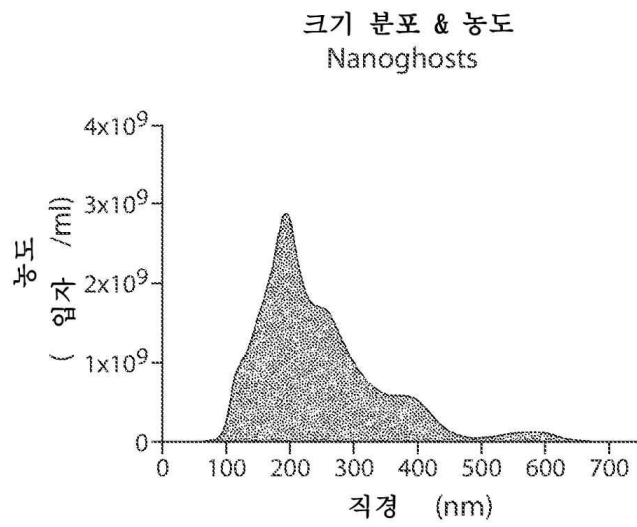
도면37



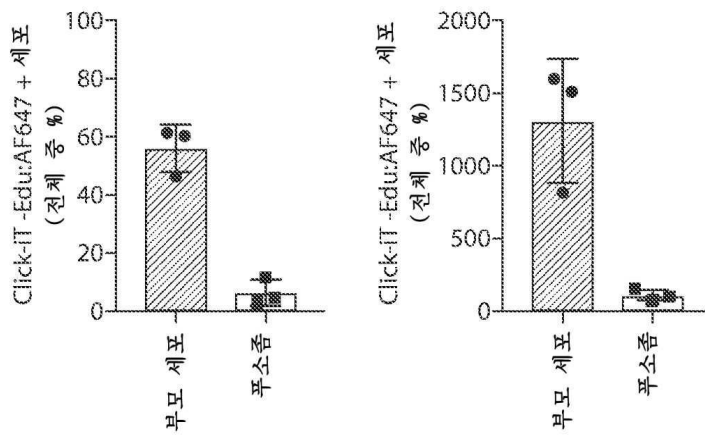
도면38



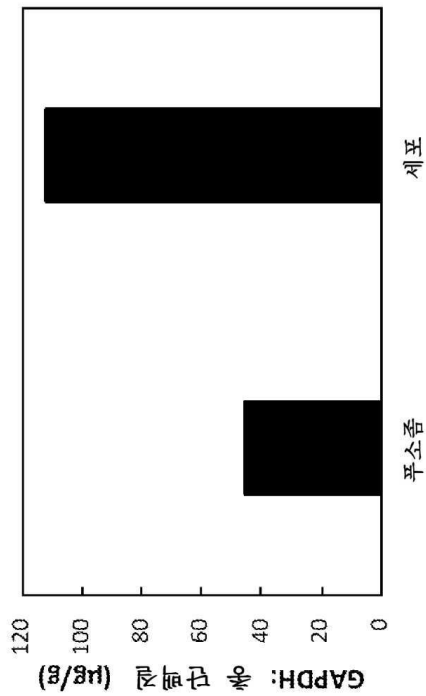
도면39



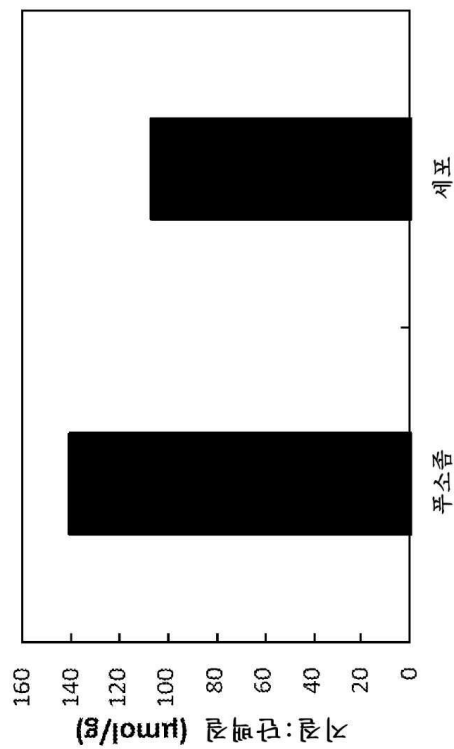
도면40



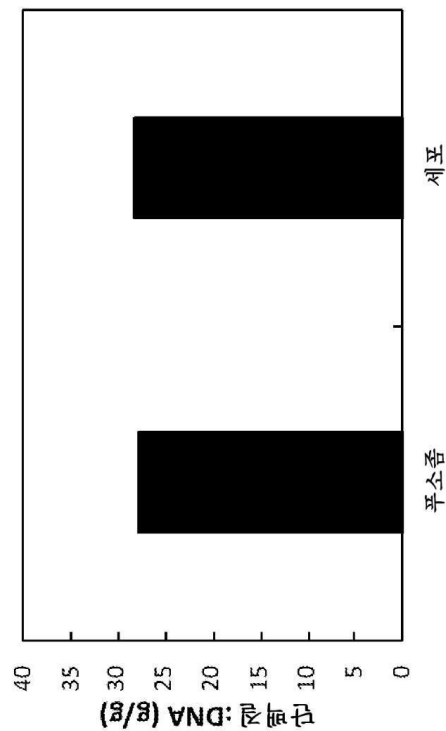
도면41



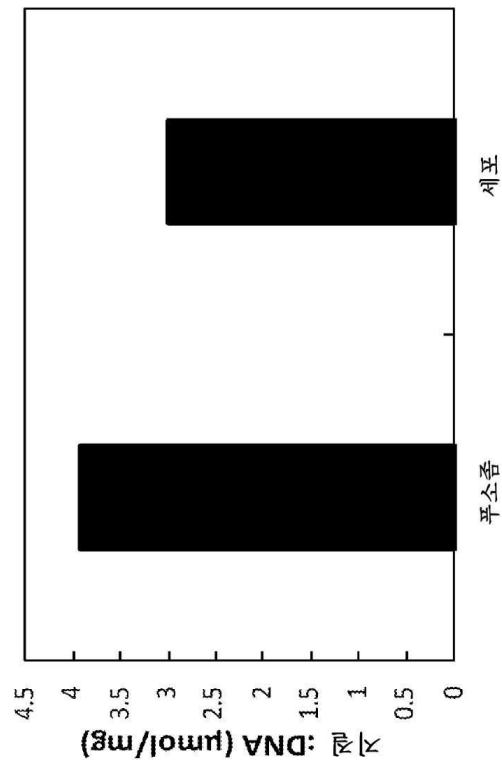
도면42



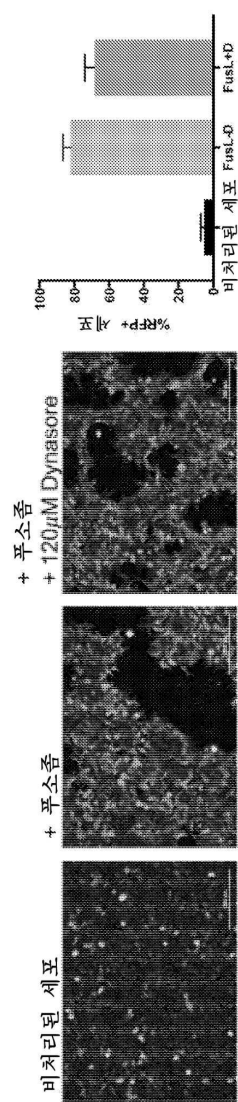
도면43



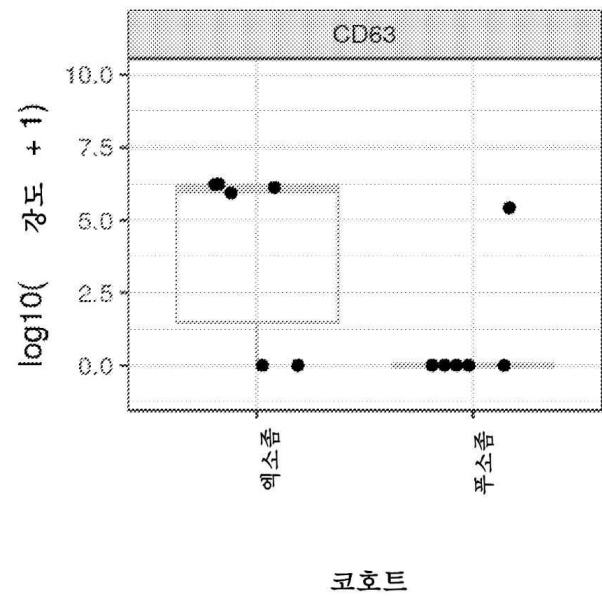
도면44



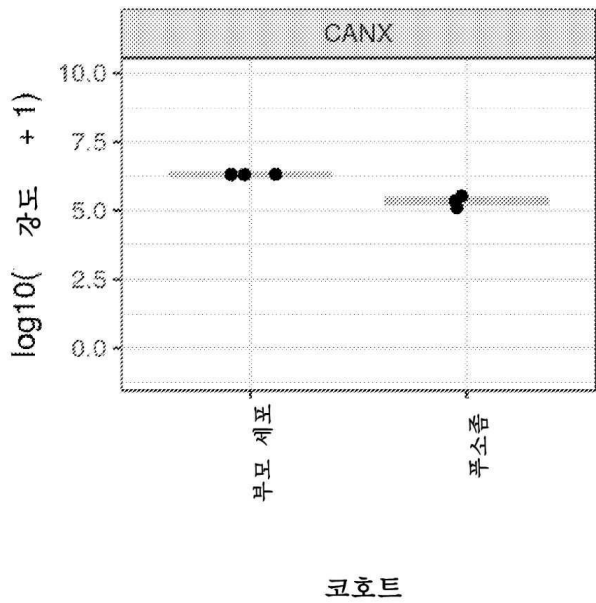
도면45



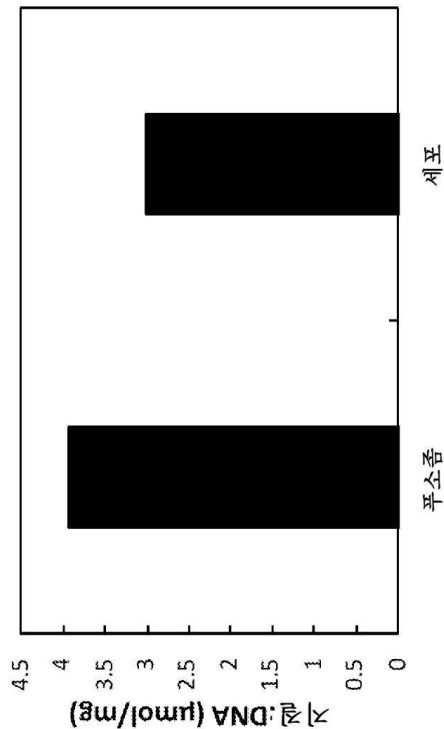
도면46



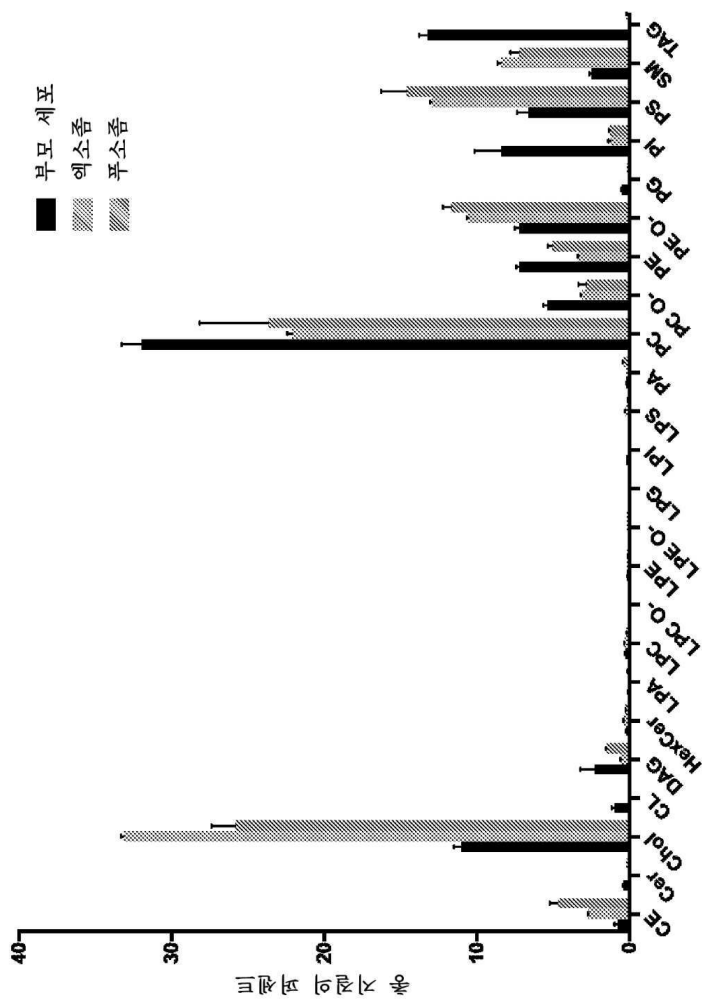
도면47



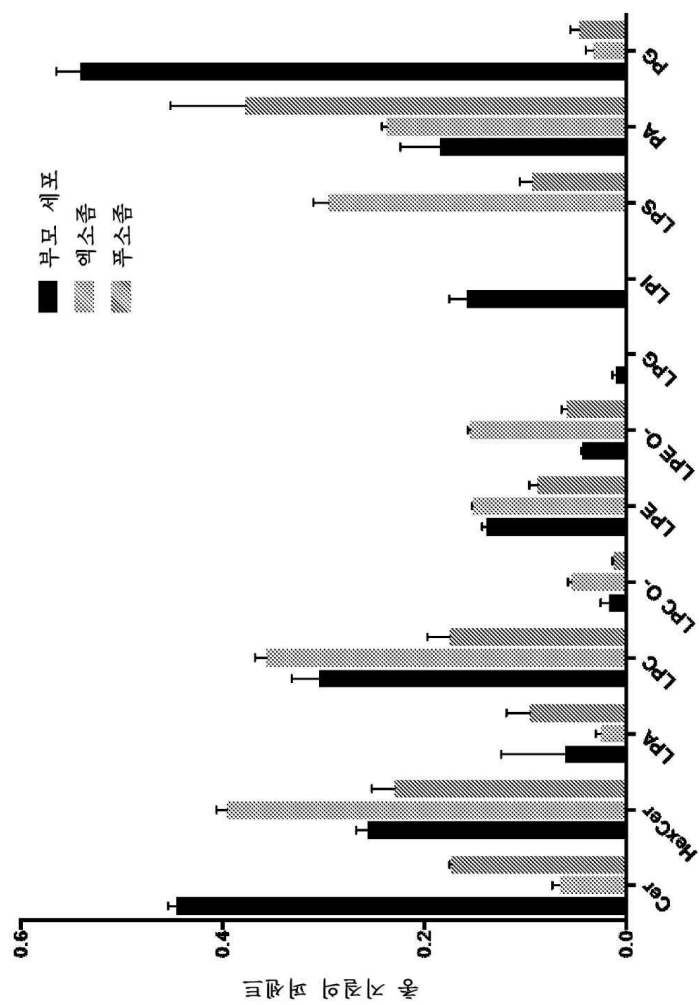
도면48



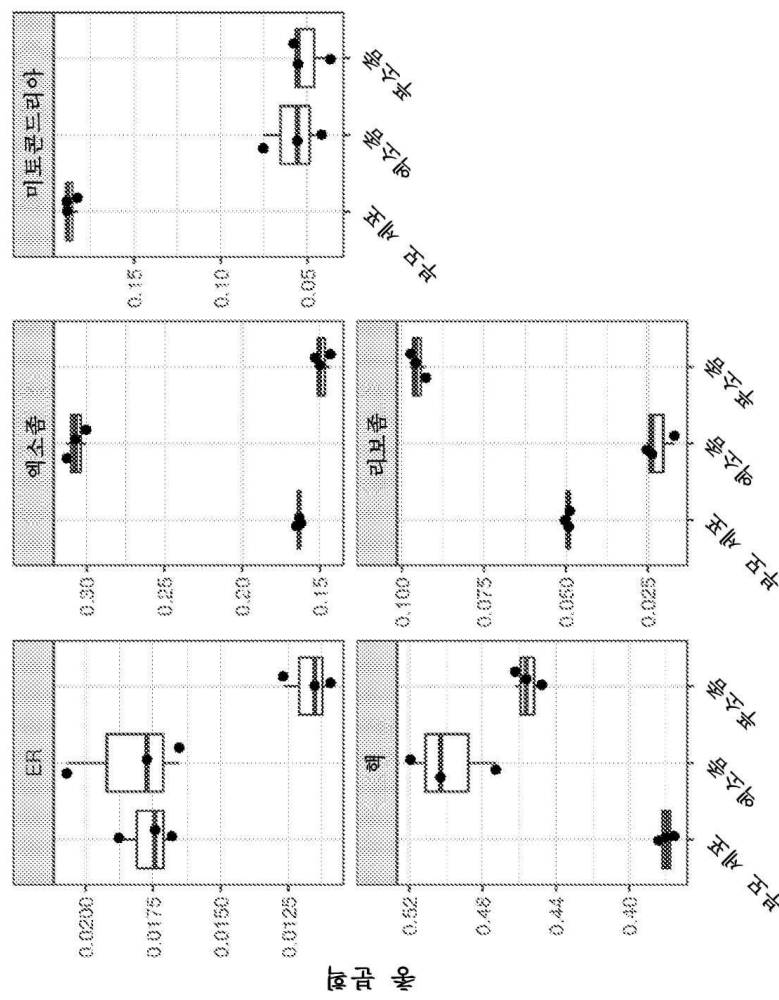
도면49a



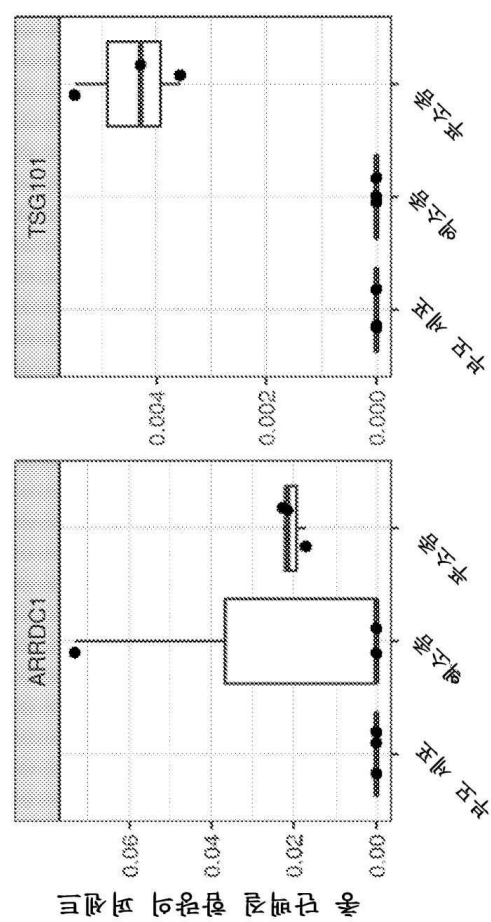
도면49b



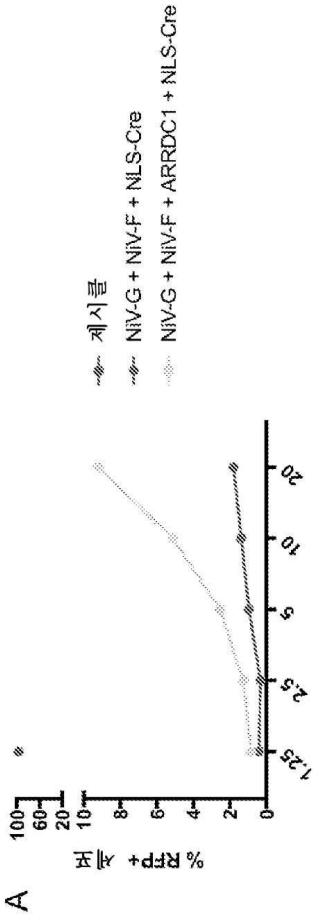
도면50



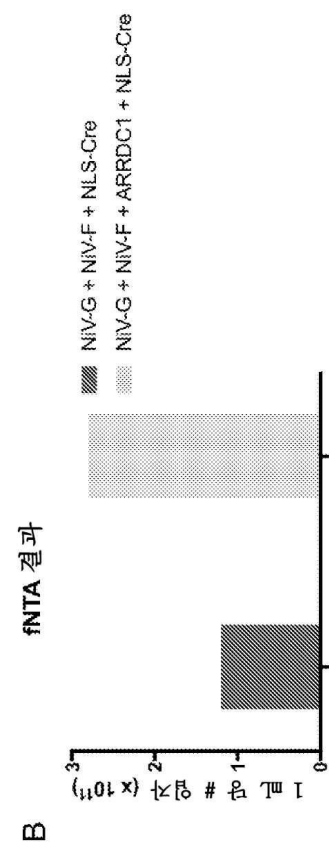
도면51



도면52a



도면52b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> FLAGSHIP PIONEERING, INC.

<120> COMPOSITIONS FOR FACILITATING MEMBRANE FUSION AND USES THEREOF

<130> V2050-7010W0

<140> PCT/US2018/031515

<141> 2018-05-08

<150> 62/595,862

<151> 2017-12-07

<150> 62/575,147

<151> 2017-10-20

<150> 62/502,998

<151> 2017-05-08

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Unknown:
 Caspase 2 sequence"
 <400> 1
 Val Asp Val Ala Asp

1 5
 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 2
 Pro Ser Ala Pro

1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 3
 Pro Thr Ala Pro

1
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 4

ggagtccact ggcgtcttca c

21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 5

gaggcattgc tgatgatctt gagg

24

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 6

atgagtaaag gagaagaact tttcac

26

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 7

gtccttttac cagacaacca ttac

24

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

gacguaaacg gccacaaguu c 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 9

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 10

gaagttcgag ggcgacaccc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

gcactaccag agctaactca 20

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 12

acuuguggcc guuuacgucg c 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 13

ucgaaguacu cagcguaagt t 21