- (43) Дата публикации заявки 2020.11.20
- (22) Дата подачи заявки 2018.12.28

(51) Int. Cl. A61K 35/28 (2015.01) C07K 16/22 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)

(54) ЭКЗОСОМЫ ДЛЯ ИММУНООНКОЛОГИЧЕСКОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

- (31) 62/611,140; 62/723,267
- (32) 2017.12.28; 2018.08.27
- (33) US
- (86) PCT/US2018/068062
- (87) WO 2019/133934 2019.07.04
- (88) 2019.08.29
- (71) Заявитель: КОДИАК БАЙОСАЙЕНСЕС, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:

Льюис Нуруддин Д., Чжоу Юй, Сатьянарайанан Срирам, Кулман Джон Д., Уилльямс Дуглас Е., Гайдуков Леонид А., Сюй Кэ, Мартин Шелли (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В., Джермакян Р.В., Парамонова К.В., Христофоров А.А., Угрюмов В.М., Глухарёва А.О., Костюшенкова М.Ю., Лыу Т.Н. (RU)

(57) В изобретении раскрыты внеклеточные везикулы, содержащие иммуномодулирующий компонент. Также представлены способы получения внеклеточных везикул, а также способы применения указанных внеклеточных везикул для лечения рака, GvHD и аутоиммунных заболеваний.

ЭКЗОСОМЫ ДЛЯ ИММУНООНКОЛОГИЧЕСКОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительным заявкам США №№ 62/723267, поданной 27 августа 2018 года; и 62/611140, поданной 28 декабря 2017 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Данное изобретение относится к композициям для взаимодействия с иммунной системой человека и ее модуляции, способам получения указанных композиций и способам применения указанных композиций для лечения рака, GvHD и аутоиммунных заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Иммунотерапия представляет собой лечения заболевания с помощью индукции, усиления или подавления иммунного ответа. Иммунотерапия может приводить к стимуляции собственной иммунной системы пациента в результате воздействия на раковые клетки. Иммунотерапия рака обычно имеет меньше побочных эффектов, чем традиционные виды терапии рака, такие как химиотерапия и лучевая терапия. Противовоспалительная иммунотерапия может приводить к подавлению иммунной системы пациента с целью лечения аутоиммунных заболеваний и болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD). Имеется потребность в усовершенствованных способах доставки иммуномодулирующих молекул к клеткам и тканям организма.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В качестве средств доставки лекарственных препаратов внеклеточные везикулы обладают преимуществами над традиционными способами доставки лекарственных препаратов, особенно в случае генной терапии. Системная доставка внеклеточных везикул приводит к распределению этих липидных наночастиц к различным тканям. Исследования показали, что внеклеточные везикулы могут взаимодействовать с различными клетками, участвующими в модуляции иммунной системы человека. Внеклеточные везикулы, которые выбирают, обогащают или разрабатывают для доставки терапевтических молекул с целью активации, подавления или влияния на иммунную систему человека, могут представлять собой эффективные лекарственные препараты для лечения рака и других заболеваний, связанных с иммунной системой.

[0005] В данном документе представлены композиции, содержащие внеклеточные везикулы, выбранные, обогащенные или разработанные с иммуномодулирующими компонентами, которые могут приводить к активации или подавлению иммунной системы человека, усилению иммунной системы пациента с целью борьбы с раком или подавлению иммунной системы пациента с целью облегчения симптомов GvHD и аутоиммунных заболеваний.

[0006] Также предложены способы получения и применения внеклеточных везикул для модуляции иммунной системы человека.

[0007] Соответственно, в первом аспекте в данном документе представлена композиция, содержащая: внеклеточную везикулу, содержащую клеточную мембрану, ограничивающую замкнутый объем, при этом указанная клеточная мембрана имеет внутреннюю поверхность и наружную поверхность; и первый имммуномодулирующий компонент, ассоциированный с клеточной мембраной, или заключенный в замкнутом объеме.

[0008] В различных вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный отрицательный регулятор контрольной точки выбирают из группы, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТІМ-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменный Ig супрессор активации Т-клеток (VISTA), аденозинового рецептора A2a (A2aR), иммуноглобулинподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.

[0009] В различных вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой члена суперсемейства рецепторов ФНО. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный член суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas-рецептора, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, peqeittopa TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой члена суперсемейства ФНО. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный член суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНОа, ФНО-С, ОХ40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD40L. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD27L. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой OX40L.

[0010] В некоторых вариантах осуществления указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанная костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28. В некоторых вариантах осуществления указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86. В определенных вариантах осуществления указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой CD80.

- [0011] В некоторых вариантах осуществления указанный первый костимулирующий компонент представляет собой цитокин или связывающий партнер цитокина. В некоторых вариантах осуществления указанный цитокин выбирают из группы, состоящей из: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-15. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-7. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-12. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-15.
- [0012] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР), Т-клеточный корецептор, главный комплекс гистосовместимости (ГКГС), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или их производное.
- [0013] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора. В определенных вариантах осуществления Т-клеточный рецептор или корецептор представляет собой активатор CD3, необязательно агонистическое антитело к CD3.
- [0014] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Тп-МUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНО-связанного апоптоз-индуцирующего лиганда. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта.
- [0015] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист выбранной мишени или активности.
- [0016] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.
- [0017] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный полинуклеотид выбирают из группы, состоящей из: мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловой РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК.
- [0018] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.
- [0019] В некоторых вариантах осуществления указанный первый иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде слитого белка, демонстрируемого на наружной поверхности указанной внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит PTGFRN или его

фрагмент или его вариант. В некоторых вариантах осуществления последовательность указанного слитого белка представляет собой SEQ ID NO: 3.

[0020] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В некоторых вариантах осуществления указанная внеклеточная везикула представляет собой нановезикулу.

[0021] В определенных вариантах осуществления указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0022] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит второй иммуномодулирующий компонент.

[0023]В различных вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный отрицательный регулятор контрольной точки выбирают из группы, состоящей из: цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТІМ-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменный Ig (VISTA), супрессор активации Т-клеток аденозинового рецептора A2a (A2aR), иммуноглобулинподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.

В различных вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент [0024]представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой члена суперсемейства рецепторов ФНО. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный член суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas-рецептора, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, peqentopa TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой члена суперсемейства ФНО. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный член суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНОа, ФНО-С, ОХ40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD40L. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD27L. В определенных вариантах осуществления указанный член суперсемейства ФНО представляет собой OX40L.

[0025] В некоторых вариантах осуществления указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанная костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет

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

[0026] В некоторых вариантах осуществления указанный второй костимулирующий компонент представляет собой цитокин или связывающий партнер цитокина. В некоторых вариантах осуществления указанный цитокин выбирают из группы, состоящей из: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-15. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-7. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-12. В определенных вариантах осуществления указанный цитокин представляет собой ИЛ-15.

[0027] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР), Т-клеточный корецептор, главный комплекс гистосовместимости (ГКГС), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или их производное.

[0028] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора. В определенных вариантах осуществления Т-клеточный рецептор или корецептор представляет собой активатор CD3, необязательно агонистическое антитело к CD3.

[0029] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Тп-МUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНО-связанного апоптоз-индуцирующего лиганда. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта.

[0030] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист выбранной мишени или активности.

[0031] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

[0032] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный полинуклеотид выбирают из группы, состоящей из: мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловой РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК.

[0033] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

[0034] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде слитого белка, демонстрируемого на наружной поверхности указанной внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит PTGFRN или его фрагмент или его вариант. В некоторых вариантах осуществления последовательность указанного слитого белка представляет собой SEQ ID NO: 3.

[0035] В некоторых вариантах осуществления указанный второй иммуномодулирующий компонент отличается от указанного первого иммуномодулирующего компонента.

[0036] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит третий иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления указанный третий иммуномодулирующий компонент отличается от указанного первого и второго иммуномодулирующих компонентов.

[0037] В другом аспекте в данном документе представлен способ получения композиции. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает модифицирование клетки-продуцента с помощью первого, второго и/или третьего иммуномодулирующих компонентов; получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента; и необязательно выделение полученных внеклеточных везикул. В некоторых других вариантах осуществления указанный способ включает получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента; выделение полученных внеклеточных везикул; и модифицирование выделенной внеклеточной везикулы с помощью первого, второго и/или третьего иммуномодулирующих компонентов. В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает составление выделенных внеклеточных везикул в фармацевтическую композицию.

[0038] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения рака у субъекта. Указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, при этом указанная композиция способна активировать иммунный ответ у субъекта, тем самым усиливая целенаправленное воздействие на опухоль иммунной системы субъекта.

[0039] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD) у субъекта. Указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, при этом указанная композиция способна подавлять иммунный ответ у субъекта, тем самым облегчая симптомы GvHD.

[0040] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта. Указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, при этом указанная композиция способна подавлять иммунный ответ у субъекта, тем самым подавляя иммунную активность субъекта.

[0041] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей опухолевый антиген, при этом указанная композиция способна потенцировать иммунный ответ на опухолевый антиген, тем самым усиливая иммунный ответ указанного субъекта к раку.

[0042] В некоторых вариантах осуществления указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНОсвязанного апоптоз-индуцирующего лиганда.

[0043] В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0044] На Фиг. 1A и 1B изображена временная динамика у мышей, инъецированных радиоизотопномечеными экзосомами. На Фиг. 1A изображен внутривенный путь введения. На Фиг. 1B изображен интраперитонеальный путь введения.

[0045] На Фиг. 2 изображена количественная оценка распределения экзосом в различных тканях мыши после внутривенного и интраперитонеального введения радиоизотопно-меченых экзосом.

[0046] На Фиг. 3A и 3B изображены эффекты В-клеточной активации в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от двух доноров-людей после инкубации с CD40L-экспрессирующими экзосомами.

[0047] На Фиг. 4A и 4B изображены эффекты В-клеточной активации очищенных В-клеток от двух доноров-людей после инкубации с CD40L-экспрессирующими экзосомами.

[0048] На Фиг. 5А изображена репортерная клеточная линия с CD40. На Фиг. 5В изображена зависимая от концентрации активация репортерной клеточной линии с CD40 анти-CD40 агонистическим антителом или рекомбинантным CD40L человека. На Фиг. 5С изображены эффекты CD40L-экспрессирующих экзосом в отношении репортерной клеточной линии с CD40.

[0049] На Фиг. 6A и 6B изображены эффекты Т-клеточной активации в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) с помощью CD80-экспрессирующих экзосом. На Фиг. 6A изображен эффект CD80-экспрессирующих экзосом в отношении числа CD8+ Т-клеток. На Фиг. 6B изображен эффект CD80-экспрессирующих экзосом в отношении числа CD4+ Т-клеток.

[0050] На **Фиг.** 7**A и** 7**B** изображены эффекты CD80-экспрессирующих экзосом в отношении экспрессии ИФНү в МКПК человека.

[0051] На Фиг. 8A и 8B изображены эффекты CD27L-экспрессирующих экзосом в отношении экспрессии ИФНу в МКПК человека от двух доноров.

[0052] На Фиг. 9A и 9B изображены эффекты CD27L-экспрессирующих экзосом в отношении экспрессии ИЛ-2 в МКПК человека от двух доноров.

- [0053] На Фиг. 10A и 10B изображены эффекты ОХ40L-экспрессирующих экзосом в отношении экспрессии ИФНү в МКПК человека от двух доноров.
- [0054] На Фиг. 11A и 11B изображены эффекты ОХ40L-экспрессирующих экзосом в отношении экспрессии ИЛ-2 в МКПК человека от двух доноров.
- [0055] На Фиг. 12A изображена репортерная клеточная линия с ОХ40. На Фиг. 12B изображена зависимая от концентрации активация репортерной клеточной линии с ОХ40 анти-ОХ40 агонистическим антителом или рекомбинантным ОХ40L человека. На Фиг. 12C изображены эффекты ОХ40L-экспрессирующих экзосом в отношении репортерной клеточной линии с ОХ40.
- [0056] На Фиг. 13A и 13B изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в комбинации с анти-CD3 антителом в отношении экспрессии ИФНу в МКПК человека.
- [0057] На Фиг. 14A изображена репортерная клеточная линия с рецептором ИЛ-7. На Фиг. 14B изображена зависимая от концентрации активация репортерной клеточной линии с рецептором ИЛ-7, обработанной рекомбинантным ИЛ-7 человека. На Фиг. 14C изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении репортерной клеточной линии с рецептором ИЛ-7.
- [0058] На Фиг. 15А и 15В изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении Т-клеточной пролиферации у мышей *in vivo*, измеряемой с помощью включения EdU. На Фиг. 15А изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении CD8+ Т-клетки. На Фиг. 15В изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении CD8+ Т-клетки памяти.
- [0059] На Фиг. 16A и 16B изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении Т-клеточной пролиферации у мышей *in vivo*, измеряемой с помощью положительной пробы CD71. На Фиг. 16A изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении CD8+ Т-клетки. На Фиг. 16B изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении CD8+ Т-клетки памяти.
- [0060] На Фиг. 17А изображена схема слитого белка PTGFRN/ИЛ-7, экспрессируемого при высокой плотности на поверхности экзосомы, а также вариантов указанного слитого белка. На Фиг. 17В изображена последовательность оптимизированного слитого белка PTGFRN/ИЛ-7.
- [0061] На Фиг. 18А изображен вестерн-блот, на котором показана относительная экспрессия различных слитых белков ИЛ-7 на поверхности очищенных экзосом. На Фиг. 18В изображены эффекты ИЛ-7-экспрессирующих экзосом в отношении подавления рецептора ИЛ-7 в качестве модели ИЛ-7-опосредованной Т-клеточной активации.
- [0062] На Фиг. 19А изображены эффекты анти-CD3 scFv экзосом в отношении Т-клеточной активации в МКПК. На Фиг. 19В изображены эффекты анти-CD3 scFv экзосом в отношении В-клеточной активации в МКПК.
- [0063] На Фиг. 20А изображены эффекты анти-CD3 scFab экзосом в отношении Т-клеточной активации в МКПК. На Фиг. 20В изображены эффекты анти-CD3 scFab экзосом в отношении В-клеточной активации в МКПК.

[0064] На Фиг. 21А изображена гистограмма, на которой показана степень Т-клеточной активации после обработки анти-CD3 scFv экзосомами. На Фиг. 21В изображена гистограмма, на которой показана степень В-клеточной активации после обработки анти-CD3 scFv экзосомами.

[0065] На Фиг. 22А изображены эффекты анти-CD3 scFab экзосом в отношении Т-клеточной активации в анализе активации с использованием планшета с покрытием по сравнению с растворенным анти-CD3 антителом или нанесенным на планшет анти-CD3 антителом. На Фиг. 22В изображена столбиковая диаграмма, на которой показана количественная оценка результатов отдельного эксперимента, осуществляемого как на Фиг. 22А.

[0066] На Фиг. 23А изображена схема полноразмерного слитого белка PTGFRN/ИЛ-12. На Фиг. 23В изображена схема укороченного слитого белка PTGFRN/ИЛ-12.

[0067] На Фиг. 24А изображены эффекты рекомбинантного ИЛ-12 человека или экзосом, экспрессирующих короткий или полноразмерный РТGFRN-ИЛ-12, индуцирующих ИФН γ в МКПК человека. На Фиг. 24В изображена таблица, в которой представлена активность рекомбинантного ИЛ-12 и экзосом, содержащих ИЛ-12.

[0068] На Фиг. 25 изображены эффекты рекомбинантного ИЛ-12 и экзосом с ИЛ-12-РТGFRN в отношении снижения опухолевого роста в мышиной модели меланомы.

[0069] На Фиг. 26A изображены кривые опухолевого роста для каждой из опухоль-несущих мышей, показанных на Фиг. 25, обработанных PBS. На Фиг. 26B изображены кривые опухолевого роста для каждой из опухоль-несущих мышей, показанных на Фиг. 25, обработанных рекомбинантным ИЛ-12. На Фиг. 26C изображены кривые опухолевого роста для каждой из опухоль-несущих мышей, показанных на Фиг. 25, обработанных экзосомами с ИЛ-12-PTGFRN.

[0070] На Фиг. 27 изображены изображения всех мышей, несущих опухоль B16F10, в исследовании эффективности, показанном на Фиг. 25.

[0071] На Фиг. 28 изображены кривые выживаемости мышей, несущих опухоль В16F10, показанных на Фиг. 25.

[0072] На Фиг. 29А изображены уровни экспрессии гена ИФН γ в опухолях мышей, обработанных PBS, гИЛ-12 или экзосомами с ИЛ-12-РТGFRN. На Фиг. 29В изображены уровни экспрессии гена СХСL9 в опухолях мышей, обработанных PBS, гИЛ-12 или экзосомами с ИЛ-12-РТGFRN. На Фиг. 29С изображены уровни экспрессии гена СХСL10 в опухолях мышей, обработанных PBS, гИЛ-12 или экзосомами с ИЛ-12-РТGFRN. На Фиг. 29D изображены уровни экспрессии гена ТGF β в опухолях мышей, обработанных PBS, гИЛ-12 или экзосомами с ИЛ-12-РТGFRN.

[0073] На Фиг. 30 изображен процент ИФНу-положительных CD8+ Т-клеток селезенки у опухольнесущих мышей, обработанных PBS, гИЛ-12 или экзосомами с ИЛ-12-РТGFRN.

[0074] На Фиг. 31A изображена схема полноразмерного PTGFRN, слитого с мономером ИФНу. На Фиг. 31B изображена схема полноразмерного PTGFRN, слитого с тандемным димером ИФНу.

[0075] На **Фиг. 32** изображены результаты анализа PAGE очищенных экзосом с человеческим и мышиным мономером (m) и тандемным димером (td) PTGFRN ИФНу.

- [0076] На Фиг. 33 изображена экспрессия PD-L1 в моноците после добавления нативных экзосом (ДТ), экзосом с мономером ИФНү PTGFRN (m-ИФНү-PTGFRN) и экзосом с тандемным димером ИФНү PTGFRN (td-ИФНу-PTGFRN) соответственно. Индуцированную LPS активацию PD-L1 использовали в качестве положительного контроля.
- [0077] На **Фиг. 34** изображены схемы слитых белков 15/ИЛ-15Ra, слитых с трансмембранным доменом PDGFR.
- [0078] На Фиг. 35 изображена NK-клеточная активация, измеряемая с помощью процента CD69-положительных NK-клеток после добавления экзосом с pDisplay ИЛ-15.
- [0079] На Фиг. 36A изображены схемы ИЛ-15, слитого с полноразмерным PTGFRN, и ИЛ-15 N72D, слитого с полноразмерным PTGFRN. На Фиг. 36B изображен вестерн-блот ИЛ-15, слитого с полноразмерным PTGFRN, и ИЛ-15 N72D, слитого с полноразмерным PTGFRN.
- [0080] На Фиг. 37 изображена NK-клеточная активация, измеряемая с помощью процента CD69-положительных NK-клеток после добавления ИЛ-15, слитого с полноразмерным PTGFRN, и ИЛ-15 N72D, слитого с полноразмерным PTGFRN.
- [0081] На Фиг. 38 изображены схемы фрагмента анти-CD3 антитела, слитого с трансмембранным участком PDGFR (exoCD3-PD), полноразмерным PTGFRN (exoCD3-long) и фрагментом PTGFRN (exoCD3-short) соответственно.
- [0082] На Фиг. 39 изображены результаты биослойной интерферометрии (BLI) после добавления нативных экзосом (ДТ), экзосом с фрагментом анти-CD3 антитела, слитым с трансмембранным участком PDGFR (pDisplay), экзосом с фрагментом анти-CD3 антитела , слитым с полноразмерным PTGFRN (FL PTGFRN), и экзосом с фрагментом анти-CD3 антитела, слитым с фрагментом PTGFRN (Short PTGFRN) соответственно.
- [0083] На Фиг. 40A изображена CD4+ Т-клеточная активация, измеряемая с помощью процента CD69-положительных CD4+ Т-клеток после добавления фрагмента анти-CD3 антитела. На Фиг. 40B изображена CD4+ Т-клеточная активация, измеряемая с помощью процента CD69-положительных CD4+ Т-клеток после добавления нативных экзосом (exoNative) и экзосом с фрагментом анти-CD3 антитела, слитого с фрагментом PTGFRN (exoCD3-Short) соответственно.
- [0084] На Φ иг. 41 изображены схемы слитых белков CD40L-GFP PTGFRN, а также EC₅₀ для каждой конструкции в анализе В-клеточной активации, измеряемой с помощью положительной пробы CD69 в отношении В-клеток.
- [0085] На Фиг. 42А изображена В-клеточная активация, измеряемая с помощью процента СD69-положительных В-клеток после добавления нативных экзосом, экзосом с тримерными конструкциями CD40L-PTGFRN pCB-527 и экзосом с тримерными конструкциями CD40L-PTGFRN pCB-766 соответственно. На Фиг. 42В изображена В-клеточная активация, измеряемая с помощью процента CD69-положительных В-клеток после добавления экзосом с тримерными конструкциями CD40L-PTGFRN pCB-527 и pCB-766 соответственно по сравнению с сопоставимым по концентрации CD40L.
- [0086] На Фиг. 43A изображена В-клеточная активация у донора 1, измеряемая с помощью процента CD69-положительных В-клеток после добавления экзосом с тримерными конструкциями CD40L-

РТGFRN pCB-527. На **Фиг. 43В** изображена В-клеточная активация у донора 2, измеряемая с помощью процента CD69-положительных В-клеток после добавления экзосом с тримерными конструкциями CD40L-PTGFRN pCB-527.

[0087] На Фиг. 44А изображен анализ FACS нативных экзосом, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L. На Фиг. 44В изображен анализ FACS нативных экзосом, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против CD81 и CD40L.

[0088] На Фиг. 45А изображен анализ FACS двойных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против CD81. На Фиг. 45В изображен анализ FACS двойных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L.

[0089] На Фиг. 46А изображен анализ FACS двойных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12, выделенных с помощью гранул, несущих анти-ИЛ-12, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L. На Фиг. 46В изображен анализ FACS двойных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12, выделенных с помощью гранул, несущих анти-ИЛ-12, и меченых флуоресцентными антителами против CD81.

[0090] На Фиг. 47А изображен ответ ИФНу в МКПК человека донора 1 после добавления рекомбинантного ИЛ-12, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-ИЛ-12, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-ИЛ-12 и экзосом PTGFRN-CD40L соответственно. На Фиг. 47В изображен ответ ИФНу в МКПК человека донора 2 после добавления рекомбинантного ИЛ-12, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-ИЛ-12, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-ИЛ-12 и экзосом PTGFRN-CD40L соответственно.

[0091] На Фиг. 48 изображено значение EC₅₀ ответа ИФНγ в МКПК человека донора 1 и донора 2 после добавления рекомбинантного ИЛ-12, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-ИЛ-12, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-ИЛ-12 и экзосом PTGFRN-СD40L соответственно.

[0092] На Фиг. 49А изображена В-клеточная активация в МКПК человека донора 1 после добавления рекомбинантного CD40L, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-CD40L, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-ИЛ-12 и экзосом PTGFRN-CD40L соответственно. На Фиг. 49В изображена В-клеточная активация в МКПК человека донора 2 после добавления рекомбинантного CD40L, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-CD40L, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-CD40L соответственно.

[0093] На Фиг. 50 изображено значение EC₅₀ ответа ИФН γ в МКПК человека донора 1 и донора 2 после добавления рекомбинантного CD40L, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом PTGFRN-CD40L, двойных положительных экзосом PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 и смеси экзосом PTGFRN-ИЛ-12 и экзосом PTGFRN-CD40L соответственно.

[0094] На Фиг. 51А изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-ИЛ-12, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L. На Фиг. 51В изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-ИЛ-12, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и FLT3L. На Фиг. 51С изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-ИЛ-12, и меченых флуоресцентными антителами против CD40L и FLT3L.

[0095] На Фиг. 52A изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L. На Фиг. 52B изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и FLT3L. На Фиг. 52C изображен анализ FACS тройных разработанных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12/FLT3L, выделенных с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и меченых флуоресцентными антителами против CD40L и FLT3L.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0096] В данном документе раскрыты внеклеточные везикулы, способные модулировать иммунную систему человека. Также представлены способы получения внеклеточных везикул, а также способы применения указанных внеклеточных везикул для лечения рака и других заболеваний, связанных с иммунной системой.

[0097] Перед тем, как данное изобретение будет описано более подробно, необходимо понять, что данное изобретение не ограничено определенными описанными вариантами осуществления, поскольку, они, безусловно, могут варьировать. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь с целью описания определенных вариантов осуществления, и не предполагает носить ограничительный характер, поскольку область данного изобретения будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения.

[0098] В случае, когда представлен диапазон значений, необходимо понимать, что каждое промежуточное значение, до десятой единицы измерения нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхними и нижними пределами этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в указанном диапазоне, охвачено в данном изобретении. Верхние и нижние пределы указанных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также быть охвачены в данном изобретении, за исключением любого особым образом исключенного предела в указанном диапазоне. В случае, когда указанный диапазон включает один или оба из указанных пределов, диапазоны, исключающие один или оба из указанных включенных пределов, также включены в данное изобретение.

[0099] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, можно использовать при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, иллюстративные способы и материалы описаны ниже.

[00100] Все публикации и патенты, цитируемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были особо и отдельно указаны для включения посредством ссылки и включены в данный документ посредством ссылки с целью раскрытия и описания способов и/или материалов в связи с которыми указанные публикации цитируются.

[00101] Необходимо отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы существительного единственного числа включают формы множественного числа, если контекст четко не определяет иное. Дополнительно необходимо отметить, что формула изобретения может быть сформулирована таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, данное заявление предполагает выполнять функцию предварительной основы для применения такой исключительной терминологии как «исключительно», «только» и т.п. в связи с цитированием элементов формулы изобретения, или применения отрицательного ограничения.

[00102] Как будет понятно специалистам в данной области техники при чтении данного раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанный и проиллюстрированный в данном документе, имеет отдельные компоненты и свойства, которые могут быть легко отделены от свойств или комбинированы со свойствами любого из других нескольких вариантов осуществления, не выходя за пределы объема и сущности данного изобретения. Любой цитируемый способ может быть выполнен в порядке цитируемых событий или в любом другом порядке, который является логически возможным.

[00103] В дополнительном описании данного изобретения данные системы для применения при практическом осуществлении данных способов будут обсуждены более подробно, после обзора соответствующих способов.

[00104] Используемый в данном документе термин «внеклеточная везикула» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая ограничивает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы включат в себя все окруженные мембранами везикулы, которые имеют меньший диаметр, чем клетка, из которой они происходят. Как правило, внеклеточные везикулы варьируют в диаметре от 20 нм до 1000 нм, и могут содержать различный макромолекулярный груз, как/либо во внутреннем пространстве, отображенном на наружной поверхности внеклеточной везикулы, так/либо расположенном вдоль мембраны. Указанный груз может включать в себя нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В качестве примера и, не ограничиваясь ими, внеклеточные везикулы включают в себя апоптические тельца, фрагменты клеток, везикулы, происходящие из клеток в результате прямой или косвенной манипуляции (например, в результате последовательной экструзии или обработки щелочными растворами), везикулированные органеллы и везикулы, образуемые живыми клетками (например, в результате прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или погибшего организма, эксплантированных тканей или органов и/или культивируемых клеток.

[00105] Используемый в данном документе термин «экзосома» относится к малой (от 20 до 300 нм в диаметре, более предпочтительно от 40 до 200 нм в диаметре) везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая ограничивает внутреннее пространство, и которая образуется из клетки в

результате прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или в результате слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. Экзосома представляет собой разновидность внеклеточной везикулы. Экзосома содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (например, терапевтический агент), приемник (например, целенаправленно воздействующий фрагмент), полинуклеотид (например, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (например, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основании своего размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «нановезикула» относится к малой (от 20 до 250 [00106]нм в диаметре, более предпочтительно от 30 до 150 нм в диаметре) везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая ограничивает внутреннее пространство, и которая образуется из клетки в результате прямой или косвенной манипуляции таким образом, что указанная нановезикула не образовалась бы клеткой-продуцентом без указанной манипуляции. Соответствующие манипуляции на клетку-продуцент включают в себя, но не ограничиваясь ими, последовательную экструзию, обработку щелочными растворами, соникацию или их комбинации. Образование нановезикул в некоторых случаях может приводить к разрушению клетки-продуцента. Предпочтительно популяции нановезикул по сути не содержат везикул, которые происходят из клеток-продуцентов в результате прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. Нановезикула представляет собой разновидность внеклеточной везикулы. Нановезикула содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (например, терапевтический агент), приемник (например, целенаправленно воздействующий полинуклеотид (например, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (например, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Нановезикула после получения из клетки-продуцента в соответствии с указанной манипуляцией, может быть выделена из клетки-продуцента на основании своего размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[00107] Термин «доставка внеклеточной везикуль» или «доставка внеклеточных везикул» относится к введению и локализации внеклеточных везикул в направлении целевых тканей, клеток и/или органов субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть доставлен в цитоплазму целевой клетки. В других вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент доставляется в мембрану целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления мембрана внеклеточной везикулы сливается с мембраной целевой клетки.

[00108] Используемый в данном документе термин «клетка-продуцент» относится к любой клетке, из которой внеклеточная везикула может быть выделена. Клетка-продуцент представляет собой клетку, которая выступает в качестве источника для внеклеточной везикулы. Клетка-продуцент может разделять компонент белка, липида, сахара или нуклеиновой кислоты с внеклеточной везикулой. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-продуцент представляет собой модифицированную или синтетическую клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-продуцент представляет собой культивируемую или выделенную клетку. В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой клеточную линию. В определенных других вариантах осуществления

клетка-продуцент представляет собой первичную клетку. В некоторых определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой иммунную клетку.

[00109] Термин «мембрана», используемый в данном документе, представляет собой граничный слой, который отделяет внутреннее пространство от наружного пространства, содержащий одно или несколько биологических соединений, в типичном случае липиды и необязательно полипептиды и/или углеводы. В некоторых вариантах осуществления мембрана содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления мембрана содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины. В некоторых из этих вариантов осуществления мембрана дополнительно содержит один или несколько полипептидов и/или один или несколько полисахаридов, таких как гликан. Внеклеточная везикула содержит мембрану, как определено в данном документе.

[00110] Используемый в данном документе термин «иммуномодулирующий компонент» относится к терапевтическому агенту, который действует на мишень (например, целевую клетку), которую приводят в контакт с внеклеточной везикулой, и регулирует иммунную систему. Указанный иммуномодулирующий компонент, который может быть введен во внеклеточную везикулу и/или клетку-продуцента, включает в себя терапевтические агенты, такие как модуляторы ингибиторов контрольных точек или лиганды контрольных точек, поверхностные антигены и их производные, цитокины и их производные. Указанный иммуномодулирующий компонент может также включать в себя агонист, антагонист, антитело и антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотид, такой как миРНК, микроРНК, днкРНК и ДНК.

[00111] Термин «приемник» относится к молекуле, которая направляет внеклеточную везикулу к мишени и/или активирует взаимодействие внеклеточной везикулы с мишенью субъекта. В некоторых вариантах осуществления приемник представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления приемник способен приводить к повышению концентрации иммуномодулирующего компонента в ткани субъекта. Примеры приемников включают в себя, но не ограничиваясь ими, примеры, приведенные в Табл. 3.

[00112] Термин «мишень» относится к клетке, патогену, метаболиту, полипептидному комплексу или любой молекуле или структуре, которая находится в ткани или циркулирует в кровеносной системе или лимфатической системе субъекта, такой как иммунная клетка или раковая клетка. Примеры мишеней включают в себя, но не ограничиваясь ими, примеры, приведенные в Табл. 4.

[00113] Термин «терапевтический агент» или «терапевтическая молекула» включает в себя соединение или молекулу, которые при присутствии в эффективном количестве приводят к оказанию необходимого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического эффекта в отношении субъекта, нуждающегося в этом. Он включает в себя любое соединение, например, лекарственный препарат на основе малой молекулы или биологический препарат (например, лекарственный препарат на основе полипептида или лекарственный препарат на основе нуклеиновой кислоты), который при введении субъекту, оказывает измеримый или передаваемый эффект в отношении субъекта, например, он облегчает или снижает симптом заболевания, нарушения или патологического состояния.

[00114] Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью полученный синтетически, и его фрагменты. Указанный термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, который является гомологичным связывающему домену иммуноглобулина. Термин «антитело» дополнительно включает в себя полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывается и распознает антиген. Применение термина «антитело» подразумевает включение целых антител, поликлональных, моноклональных и рекомбинантных антител, их фрагментов и дополнительно включает в себя одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышиные антитела, химерные, моноклональные антитела типа мышь-человек, мышь-примат, примат-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, scFv, (scFv)2, Fab, Fab' и F(ab')2, F(ab1)2, Fv, dAb, и Fd-фрагменты, диатела и полипептиды, связанные с антителами. Антитело включает в себя биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, до тех пор, пока они проявляют необходимую биологическую активность или функцию.

[00115] Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в данном документе, относится к иммуноглобулина, фрагментам интактного И любой части полипептида, содержащего антигенсвязывающие участки, имеющие способность специфически связываться с антигеном. Например, антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой F(ab')2-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fabфрагмент, Fv-фрагмент или scFv-фрагмент, но не ограничиваясь ими. Fab-фрагмент имеет один антигенсвязывающий сайт и содержит вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную СН1-область тяжелой цепи. Fab'-фрагмент отличается от Fabфрагмента тем, что Fab'-фрагмент дополнительно содержит шарнирную область тяжелой цепи, в том числе, по меньшей мере, один остаток цистеина на С-конце СН1-области тяжелой цепи. F(ab')2-фрагмент образуется, когда остатки цистеина Fab'-фрагмента соединяются с помощью дисульфидной связи в шарнирной области. Fv-фрагмент представляет собой минимальный фрагмент антитела, имеющий только вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи, а рекомбинантная методика получения Fv-фрагмента хорошо известна в данной области техники. Двухцепочечные Fv-фрагменты могут иметь структуру, в которой вариабельные области тяжелой цепи связаны с вариабельными областями легкой цепи с помощью нековалентной связи. Одноцепочечные Fv- (scFv)-фрагменты, как правило, могут иметь димерную структуру, как в двухцепочечных Fv-фрагментах, в которых вариабельные области тяжелых цепей ковалентно связаны с вариабельными областями легких цепей с помощью пептидного линкера, или вариабельные области тяжелых и легких цепей непосредственно связаны друг с другу на своем С-конце. Антигенсвязывающий фрагмент может быть получен с использованием протеазы (например, целое антитело расщепляется папаином с получением Fabфрагментов и расщепляется пепсином с получением F(ab')2-фрагментов) и может быть получено с помощью генетической рекомбинантной методики. dAb-Фрагмент состоит из VH-домена. Молекулы одноцепочечных антител могут представлять собой полимер с рядом отдельных молекул, например димер, тример или другие полимеры.

[00116] Фраза «молекула нуклеиновой кислоты» относится к одноцепочечному или двухцепочечному полимеру дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований. Она включает в себя хромосомную ДНК и самореплицирующиеся плазмиды, векторы, мРНК, тРНК, миРНК, микроРНК

и т.д. Молекула нуклеиновой кислоты может быть рекомбинантной, а экзогенные полипептиды могут экспрессироваться, когда нуклеиновая кислота вводится в клетку.

[00117] Термин «агонист» относится к молекуле, которая связывается с рецептором и активирует указанный рецептор для получения биологического ответа. Рецепторы могут быть активированы либо эндогенным, либо экзогенным агонистом. Неограничивающие примеры эндогенного агониста включают в себя гормоны и нейромедиаторы. Неограничивающие примеры экзогенного агониста включают в себя лекарственные препараты. Агонист может представлять собой полный, частичный или обратный агонист.

[00118] Термин «антагонист» относится к молекуле, которая блокирует или ослабляет опосредованный агонистом ответ, а не вызывает сам биологический ответ при связывании с рецептором. Многие антагонисты достигают своей активности, конкурируя с эндогенными лигандами или субстратами в структурно определенных сайтах связывания на рецепторах. Неограничивающие примеры антагонистов включают в себя альфа-блокаторы, бета-блокаторы и блокаторы кальциевых каналов. Антагонист может быть конкурентным, неконкурентным или внеконкурентным антагонистом.

[00119] Используемый в данном документе термин «фрагмент» белка относится к белку, который имеет делецию на N- и/или C-конце по сравнению с встречающимся в природе белком. Предпочтительно фрагмент переносчика PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или ATФ сохраняет Такой способность специфически направляться в экзосомы. фрагмент также называют «функциональным фрагментом». Является ли фрагмент функциональным фрагментом в данном смысле, можно оценить любыми известными в данной области техники способами определения содержания белка в экзосомах, в том числе с помощью вестерн-блотов, анализа FACS и слияний фрагментов с аутофлуоресцентными белками, такими как, например, GFP. В предпочтительном варианте осуществления фрагмент переносчика PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, АТР сохраняет, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% способность встречающегося в природе переносчика PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или АТФ специфически направляться в экзосомы.

Используемый в данном документе термин «вариант» белка относится к белку, который [00120]разделяет идентичность определенной аминокислотной последовательности с другим белком при выравнивании с помощью способа, известного в данной области техники. Вариант белка может включать в себя замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или реаранжировку в другом белке. В определенном варианте осуществления указанный вариант представляет собой вариант, имеющий, по меньшей мере, 70% идентичность с переносчиком PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, АТФ или фрагментом переносчика PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или АТФ. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов PTGFRN разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с PTGFRN в соответствии с SEQ ID NO: 1 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов BSG разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с BSG в соответствии с SEQ ID NO: 9 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов IGSF2 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF2 в соответствии с SEQ ID NO: 34 или его функциональным фрагментом. В

некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов IGSF3 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF3 в соответствии с SEQ ID NO: 20 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов IGSF8 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с IGSF8 в соответствии с SEQ ID NO: 14 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов ITGB1 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ITGB1 в соответствии с SEQ ID NO: 21 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов ІТСА4 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ITGA4 в соответствии с SEQ ID NO: 22 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов SLC3A2 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SLC3A2 в соответствии с SEQ ID NO: 23 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР1А1 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР1А1 в соответствии с SEQ ID NO: 24 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР1А2 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1A2 в соответствии с SEQ ID NO: 25 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР1А3 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1A3 в соответствии с SEQ ID NO: 26 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР1А4 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР1А4 в соответствии с SEQ ID NO: 27 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР1В3 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP1B3 в соответствии с SEQ ID NO: 28 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР2В1 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP2B1 в соответствии с SEQ ID NO: 29 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР2В2 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с АТР2В2 в соответствии с SEQ ID NO: 30 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР2В3 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP2B3 в соответствии с SEQ ID NO: 31 или его функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления варианты или фрагменты вариантов АТР2В4 разделяют, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ATP2B4 в соответствии с SEQ ID NO: 32 или его функциональным фрагментом. В каждом из указанных выше случаев предпочтительно, чтобы вариант или вариант фрагмента сохранял способность специфически направляться в экзосомы.

[00121] Способы выравнивания последовательностей для проведения сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith and

Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48: 443 (1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31 (1988); Higgins and Sharp, Gene 73: 15 237-44 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-3 (1989) Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16: 10881-90 (1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8: 155-65 (1992); и Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24: 307-31 (1994). Средство поиска основного локального выравнивания (BLAST) NCBI [Altschul 20 et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990)] доступно из нескольких источников, в том числе Национального центра биологической информации (NBCl, Бетесда, Мериленд), и в интернете, для применения в связи с программами анализа последовательности Blastp, Blasm, Blastx, Tblastn и Tblastx. BLAST и описание того, как определить идентичность последовательностей с помощью указанной программы, могут быть доступны на официальном сайте NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) под эгидой NIH (Национальный институт здоровья).

[00122] Цитирование любого белка, представленного в данном документе, охватывает функциональный вариант белка. Термин «функциональный вариант» белка относится к варианту белка, который сохраняет способность специфически направляться в экзосомы.

[00123]Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к одному или нескольким соединениям, описанным в данном документе, таким как, например, внеклеточная везикула, смешанная или перемешанная или суспендированная в одном или нескольких других химических компонентах, таких как фармацевтически приемлемые носители и наполнители. Одной из целей фармацевтической композиции является облегчение введения препаратов внеклеточных везикул субъекту. Термин «фармацевтически приемлемый» и его грамматические вариации относится к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, которые можно вводить субъекту или на него, не вызывая нежелательных физиологических эффектов до той степени, в которой запрещается введение композиции. Термин «наполнитель» или «носитель» относится к инертному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый наполнитель» охватывает любые агенты, одобренные регулирующим органом федерального правительства США или перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, в том числе людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не устраняет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены наполнители и носители, которые пригодны при приготовлении фармацевтической композиции и, как правило, безопасны, нетоксичны и предпочтительны.

[00124] Используемые в данном документе термины «выделять», «выделенный» и «выделение» или «очищать», «очищенный» и «очищение», а также «экстрагировать» и «экстрагированный» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию получения (например, множеству известного или неизвестного количества и/или концентрации) необходимых внеклеточных везикул, которые прошли один или несколько процессов очистки, например, отбор или обогащение необходимого препарата внеклеточных везикул. В некоторых вариантах осуществления выделение или очистка, используемые в данном документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) внеклеточных везикул из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления выделенная композиция внеклеточных везикул не имеет обнаруживаемой нежелательной

активности или в качестве альтернативы уровень или количество нежелательной активности находится на или ниже приемлемого уровня или количества. В других вариантах осуществления выделенная композиция внеклеточных везикул имеет количество и/или концентрацию необходимых внеклеточных везикул в приемлемом количестве и/или концентрации или выше. В других вариантах осуществления выделенная композиция внеклеточных везикул обогащена по сравнению с исходным материалом (например, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты внеклеточных везикул по сути не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых вариантах осуществления выделенные препараты внеклеточных везикул на 100% не содержат, на 99% не содержат, на 98% не содержат, на 97% не содержат, на 96% не содержат или на 95% не содержат любого загрязняющего биологического вещества. Остаточные биологические продукты могут включать в себя абиотические материалы (в том числе химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. По сути не содержащий остаточных биологических продуктов может также означать, что композиция внеклеточных везикул не содержит детектируемых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только внеклеточные везикулы.

[00125] Термины «введение», «вводимый» и их варианты относятся к введению композиции, такой как внеклеточная везикула или агент, субъекту и включают в себя одновременное и последовательное введение композиции или агента. Введение композиции или агента субъекту осуществляется с помощью любого подходящего пути, в том числе перорально, легочно, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, интраперитонеально или подкожно), ректально, внутрилимфатически, интратекально, внутриопухолево, периокулярно или местно. Введение включает в себя самовведение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту выполнять свою предполагаемую функцию. Например, если подходящий путь является внутривенным, композицию вводят с помощью введения композиции или агента в вену субъекта.

[00126] Используемый в данном документе термин «модулировать», «модулирование», «модулировать» и/или «модулитор» обычно относится к способности изменять, увеличивая или уменьшая, например, прямо или косвенно способствуя/стимулируя/активируя или нарушая/ингибируя/подавляя определенную концентрацию, уровень, экспрессию, функцию или поведение, такое как, например, для осуществления функции антагониста или агониста. В некоторых случаях модулятор может приводить к увеличению и/или уменьшению определенной концентрации, уровня, активности или функции по отношению к контролю или по отношению к среднему уровню активности, который обычно ожидается, или по отношению к контрольному уровню активности.

[00127] Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для достижения необходимого эффекта, например, количество, достаточное для модуляции патологического состояния у субъекта.

[00128] Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое эффективно для ослабления симптома заболевания. Терапевтически эффективное количество

может представлять собой «профилактически эффективное количество», так как профилактика может рассматриваться в качестве терапии.

[00129] Используемый в данном документе термин «по сути» или «существенный» относится, например, к присутствию, уровню или концентрации объекта в конкретном пространстве, влиянию одного объекта на другой объект или эффекту лечения. Например, активность, уровень или концентрация объекта существенно увеличиваются, если увеличение является 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 10-кратным, 50-кратным, 100-кратным или 1000-кратным по отношению к исходному уровню. Активность, уровень или концентрация объекта также существенно увеличиваются, если увеличение составляет 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% или 500% по отношению к исходному уровню.

[00130] Термин «in vivo» относится к процессам, которые происходят в живом организме.

[00131] Используемый в данном документе термин «млекопитающее» включает а себя как людей, так и не относящихся к человеку млекопитающих.

[00132] Сокращения, используемые в данной заявке, включают следующее: «мРНК» относится к матричной РНК, «микроРНК» относится к микроРНК, «миРНК» относится к малой интерферирующей РНК, «антисмысловая РНК» относится к одноцепочечной РНК, которая комплементарна мРНК, «кшРНК» относится к малой или короткой шпилечной РНК, «днкРНК» относится к длинной некодирующей РНК, а «диДНК» относится к двухцепочечной ДНК.

Композиции

[00133] Аспекты данного раскрытия включают в себя композицию, способную к регуляции иммунной системы. Композиция содержит внеклеточную везикулу, содержащую клеточную мембрану, и иммуномодулирующий компонент, ассоциированный с клеточной мембраной или заключенный в замкнутый объем, ограниченный мембраной.

Внеклеточная везикула

[00134] В различных вариантах осуществления композиция содержит внеклеточную везикулу. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу клеточного происхождения, содержащую мембрану, которая ограничивает внутреннее пространство.

[00135] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула может представлять собой окруженную мембраной везикулу, которая имеет меньший диаметр, чем клетка, из которой она происходит. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 20-1000 нм, такой как, приблизительно 20-100 нм, 20-200 нм, 20-300 нм, 20-400 нм, 20-500 нм, 20-600 нм, 20-700 нм, 20-800 нм, 20-900 нм, 30-100 нм, 30-200 нм, 30-300 нм, 30-400 нм, 30-500 нм, 30-600 нм, 30-700 нм, 30-800 нм, 30-900 нм, 40-100 нм, 40-200 нм, 40-300 нм, 40-400 нм, 40-600 нм, 40-700 нм, 40-800 нм, 40-900 нм, 50-150 нм, 50-500 нм, 50-750 нм, 100-200 нм, 100-500 нм или 500-1000 нм.

[00136] В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой

нановезикулу. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой апоптическое тельце. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой фрагмент клетки. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу, происходящую из клетки путем прямой или косвенной манипуляции. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулированную органеллу. В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу, образуемую живыми клетками.

[00137] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула происходит из живого организма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула происходит из погибшего организма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула происходит эксплантированной ткани. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула происходит из эксплантированного органа. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула происходит из культивируемых клеток. В некоторых из этих вариантов осуществления, когда внеклеточная везикула образуется в системе культивирования клеток, внеклеточная везикула дополнительно выделяется (например, путем отделения внеклеточной везикулы от культивируемых клеток). Разделение может быть достигнуто с помощью осаждения. Например, внеклеточная везикула может иметь удельную плотность 0.5-2.0, 0.6-1.0, 0.7-1.0, 0.8-1.0, 0.9-1.0, 1.0-1.1, 1.1-1.2, 1.2-1.3, 1.4-1.5, 1.0-1.5, 1.5-2.0 и 1.0-2.0 кг/м³. Разделение также может быть достигнуто с помощью аффинной очистки. Например, внеклеточная везикула может быть очищена путем связывания популяции, содержащей внеклеточные везикулы, со смолой, при этом указанная смола содержит множество лигандов, которые обладают специфической аффинностью к одному или нескольким целевым белкам на поверхности внеклеточной везикулы. Целевые белки могут представлять собой тетраспанин (например, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков EWI/иммуноглобулинов (например, PTGFRN, IGSF8, IGSF3), интегрин (например, ITGB1, ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc. Целевой белок может дополнительно представлять собой иммуномодулирующий компонент, который отображается на поверхности экзосом.

[00138] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула содержит липиды или жирные кислоты и полипептиды. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит сахар. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит полинуклеотид.

[00139] В различных вариантах осуществления мембрана внеклеточной везикулы содержит внутреннюю поверхность и наружную поверхность и ограничивает внутреннее пространство. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный везикула дополнительно содержит полезную нагрузку. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка заключена во внутреннее пространство. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка отображается на наружной поверхности внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка располагается вдоль мембраны внеклеточной везикулы. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка содержит нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их

комбинации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит приемник.

Экзосома

[00140] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В определенных вариантах осуществления экзосома представляет собой небольшую везикулу, ограниченную мембраной, секретируемую клетками-продуцентами.

В некоторых вариантах осуществления экзосома из клетки-продуцента имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 20-300 нм, такой как, приблизительно 20-290 нм, 20-280 нм, 20-270 нм, 20-260 нм, 20-250 нм, 20-240 нм, 20-230 нм, 20-220 нм, 20-210 нм, 20-200 нм, 20-190 нм, 20-180 нм, 20-170 нм, 20-160 нм, 20-150 нм, 20-140 нм, 20-130 нм, 20-120 нм, 20-110 нм, 20-100 нм, 20-90 нм, 20-80 нм, 20-70 нм, 20-60 нм, 20-50 нм, 20-40 нм, 20-30 нм, 30-300 нм, 30-290 нм, 30-280 нм, 30-270 нм, 30-260 нм, 30-250 нм, 30-240 нм, 30-230 нм, 30-220 нм, 30-210 нм, 30-200 нм, 30-190 нм, 30-180 нм, 30-170 нм, 30-160 нм, 30-150 нм, 30-140 нм, 30-130 нм, 30-120 нм, 30-110 нм, 30-100 нм, 30-90 нм, 30-80 нм, 30-70 нм, 30-60 нм, 30-50 нм, 30-40 нм, 40-300 нм, 40-290 нм, 40-280 нм, 40-270 нм, 40-260 нм, 40-250 нм, 40-240 нм, 40-230 нм, 40-220 нм, 40-210 нм, 40-200 нм, 40-190 нм, 40-180 нм, 40-170 нм, 40-160 нм, 40-150 нм, 40-140 нм, 40-130 нм, 40-120 нм, 40-110 нм, 40-100 нм, 40-90 нм, 40-80 нм, 40-70 нм, 40-60 нм, 40-50 нм, 50-300 нм, 50-290 нм, 50-280 нм, 50-270 нм, 50-260 нм, 50-250 нм, 50-240 нм, 50-230 нм, 50-220 нм, 50-210 нм, 50-200 нм, 50-190 нм, 50-180 нм, 50-170 нм, 50-160 нм, 50-150 нм, 50-140 нм, 50-130 нм, 50-120 нм, 50-110 нм, 50-100 нм, 50-90 нм, 50-80 нм, 50-70 нм, 50-60 нм, 60-300 нм, 60-290 нм, 60-280 нм, 60-270 нм, 60-260 нм, 60-250 нм, 60-240 нм, 60-230 нм, 60-220 нм, 60-210 нм, 60-200 нм, 60-190 нм, 60-180 нм, 60-170 нм, 60-160 нм, 60-150 нм, 60-140 нм, 60-130 нм, 60-120 нм, 60-110 нм, 60-100 нм, 60-90 нм, 60-80 нм, 60-70 нм, 70-300 нм, 70-290 нм, 70-280 нм, 70-270 нм, 70-260 нм, 70-250 нм, 70-240 нм, 70-230 нм, 70-220 нм, 70-210 нм, 70-200 нм, 70-190 нм, 70-180 нм, 70-170 нм, 70-160 нм, 70-150 нм, 70-140 нм, 70-130 нм, 70-120 нм, 70-110 нм, 70-100 нм, 70-90 нм, 70-80 нм, 80-300 нм, 80-290 нм, 80-280 нм, 80-270 нм, 80-260 нм, 80-250 нм, 80-240 нм, 80-230 нм, 80-220 нм, 80-210 нм, 80-200 нм, 80-190 нм, 80-180 нм, 80-170 нм, 80-160 нм, 80-150 нм, 80-140 нм, 80-130 нм, 80-120 нм, 80-110 нм, 80-100 нм, 80-90 нм, 90-300 нм, 90-290 нм, 90-280 нм, 90-270 нм, 90-260 нм, 90-250 нм, 90-240 нм, 90-230 нм, 90-220 нм, 90-210 нм, 90-200 нм, 90-190 нм, 90-180 нм, 90-170 нм, 90-160 нм, 90-150 нм, 90-140 нм, 90-130 нм, 90-120 нм, 90-110 нм, 90-100 нм, 100-300 нм, 110-290 нм, 120-280 нм, 130-270 нм, 140-260 нм, 150-250 нм, 160-240 нм, 170-230 нм, 180-220 нм или 190-210 нм.

[00142] В особо предпочтительных вариантах осуществления экзосома из клетки-продуцента, описанная в данном документе, имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 30-100 нм. В другом предпочтительном варианте осуществления экзосома из клетки-продуцента имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 20-300 нм. В другом предпочтительном варианте осуществления экзосома из клетки-продуцента имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 40-200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 90% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 20-300 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 95% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 20-300 нм. В другом

варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 99% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 20-300 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 90% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 40-200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 95% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 40-200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанных в данном документе, включает в себя популяцию, в которой 99% экзосом имеют наиболее длинный размер, составляющий 40-200 нм. В других предпочтительных вариантах осуществления размер экзосомы или популяции экзосом, описанных в данном документе, измеряют в соответствии со способами, описанными ниже.

[00143] В некоторых вариантах осуществления экзосома образуется клеткой-продуцентом. В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит одну или несколько молекул, происходящих из клетки-продуцента. В некоторых вариантах осуществления экзосома образуется в системе культивирования клеток и выделяется (например, с помощью отделения экзосомы от клеткипродуцента). Разделение может быть достигнуто с помощью осаждения. Например, экзосома может иметь удельную плотность 0,5-2,0, 0,6-1,0, 0,7-1,0, 0,8-1,0, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,4-1,5, 1,0-1,5, 1,5-2,0 и 1,0-2,0 кг/м3. Разделение также может быть достигнуто с помощью аффинной очистки. Например, внеклеточная везикула может быть очищена путем связывания популяции, содержащей внеклеточные везикулы, со смолой, при этом указанная смола содержит множество лигандов, которые обладают специфической аффинностью к одному или нескольким целевым белкам на поверхности внеклеточной везикулы. Один или несколько целевых белков могут представлять собой тетраспанин (например, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков EWI/иммуноглобулинов (например, РТGFRN, IGSF8 и/или IGSF3), интегрин (например, ITGB1 и/или ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 и/или ATP2B4), BSG или CD98hc. Целевой белок может SLC3A2. дополнительно представлять собой иммуномодулирующий компонент, который отображается на поверхности экзосом.

[00144] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит внутреннюю поверхность и наружную поверхность. В определенных вариантах осуществления внутренняя поверхность обращена к внутреннему кору экзосомы. В некоторых вариантах осуществления наружная поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или целевой клетки.

[00145] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины. В некоторых вариантах осуществления липид и жирная кислота могут представлять собой одно или несколько из приведенного в Табл. 1.

[00146] В определенных вариантах осуществления экзосома содержит липидный бислой, состоящий из внутреннего листка и внешнего листка. Состав внутреннего и внешнего листка может быть определен с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники, см., например, Kuypers *et al.* Biohim Biophys Acta 1985 819:170. В некоторых вариантах осуществления состав внешнего

листка представляет собой примерно 70-90% холинфосфолипидов, примерно 0-15% кислых фосфолипидов и примерно 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых вариантах осуществления состав внутреннего листка представляет собой примерно 15-40% холинфосфолипидов, примерно 10-50% кислых фосфолипидов и примерно 30-60% фосфатидилэтаноламина.

[00147] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы дополнительно содержит один или несколько полипептидов. В определенных вариантах осуществления экзосома содержит один или несколько полипептидов, выбранных из следующего перечня, в том числе, но не ограничиваясь ими, спектрин, миозиноподобный полипептид, белок полосы 3, SLC4A1, актин, актиноподобный полипептид, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (G3PD), тетраспанины (например, CD63, CD81 и/или CD9), Alix и TSG101, интегрины (например, ITGB1 и/или ITGA4), селектины, CR1, TNFRI, протеолитические ферменты, белки или гистоны, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI), члены суперсемейства белков EWI/иммуноглобулинов (например, PTGFRN, IGSF8 и/или IGSF3), белки-переносчики АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 и/или ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc. В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит, по меньшей мере, один полипептид, выбранный из Табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит полипептиды на своей поверхности. В некоторых вариантах осуществления экзосома модифицирована так, чтобы содержать один или несколько полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицирована так, чтобы содержать один или несколько полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клеткапродущент в природе содержит один или несколько полипептидов, и полученные из них экзосомы также содержат полипептиды. Уровни любого необходимого поверхностного маркера могут быть изменены непосредственно на экзосоме (например, путем приведения в контакт комплекса с полипептидами, полученными рекомбинантным способом, чтобы вызвать вставку или конъюгирование с мембраной комплекса). В качестве альтернативы или в качестве дополнения уровни любого необходимого поверхностного маркера могут быть изменены непосредственно на клетке-продуценте (например, путем приведения в контакт комплекса с полипептидами, полученными рекомбинантным способом, чтобы вызвать вставку или конъюгирование с мембраной клетки). В качестве альтернативы клетка-продуцент может быть модифицирована путем трансдукции экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку-продуцент для экспрессии необходимого поверхностного маркера. Поверхностный маркер может уже естественным образом присутствовать на клетке-продуценте, в случае чего экзогенная конструкция может приводить к сверхэкспрессии маркера и увеличению концентрации маркера в или на клетке-продуценте. В качестве альтернативы экспрессируемый в природе поверхностный маркер может быть удален из клеткипродуцента (например, путем индуцирования сайленсинга генов в клетке-продуценте). Полипептиды могут придавать экзосоме различные функциональные возможности (например, специфические направляющие способности, функции доставки (например, молекулы слияния), ферментативные функции, увеличение или уменьшение периода полужизни in vivo и т.д.). В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают в себя, но не ограничиваются ими, CD47, CD55, CD49, CD40, CD133, CD59, глипикан-1, CD9, CD63, CD81, интегрины, селектины, лектины и кадгерины.

[00149] В конкретных вариантах осуществления экзосомы содержат один или несколько полипептидов на своей поверхности, при этом указанные полипептиды выбирают из группы белков, которая была

недавно идентифицирована как обогащенная на поверхности экзосом (подробно описано в заявке на патент США 62/550543, которой включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Эта группа полипептидов включает в себя отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN); базигин (BSG); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (IGSF8); интегрин бета-1 (ITGB1); интегрин альфа-4 (ITGA4); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2); и класс белков-переносчиков АТФ (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4)).

[00150] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы дополнительно содержит один или несколько полисахаридов, таких как гликан.

[00151] В некоторых вариантах осуществления экзосома доставляет полезную нагрузку (терапевтический агент) к мишени. Полезная нагрузка представляет собой терапевтический агент, который воздействует на мишень (например, целевую клетку), которую приводят в контакт с экзосомой. Приведение в контакт может происходить *in vitro* или в организме субъекта. Полезные нагрузки, которые могут быть введены в экзосому и/или клетку-продуцент, включают в себя терапевтические агенты, такие как нуклеотиды (например, нуклеотиды, содержащие детектируемый фрагмент или токсин, который нарушает транскрипцию), нуклеиновые кислоты (например, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые имеют регуляторную функцию, такие как микроРНК, дцДНК, днкРНК или миРНК), аминокислоты (например, аминокислоты, содержащие детектируемый фрагмент, или токсин, который нарушает трансляцию), полипептиды (например, ферменты) липиды, углеводы и малые молекулы (например, лекарственные препараты на основе малых молекул и токсины).

[00152] Экзосома может взаимодействовать с целевой клеткой посредством слияния мембран и доставлять полезные нагрузки (например, терапевтические агенты) в экзосомной композиции на поверхность или в цитоплазму целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления происходит слияние мембран между экзосомой и цитоплазматической мембраной целевой клетки. В других вариантах осуществления происходит слияние мембран между экзосомой и эндосомальной мембраной целевой клетки.

[00153] В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит полипептид-приемник. Полипептид-приемник может быть синтетическим. В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник вводится в клетку-продуцент (например, экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид-приемник, вводится в клетку-продуцент) или рекомбинантный полипептид-приемник, который образуется за пределами клетки-продуцента (например, синтезируется с помощью системы экспрессии белка). В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник (например, полипептид, полученный рекомбинантным путем) вводится в экзосому непосредственно (например, после выделения экзосомы из клетки-продуцента). В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник может находиться на поверхности экзосом. В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник способен направлять экзосому к определенной мишени (например, мишени, такой как патоген, метаболит, полипептидный комплекс или клетка, такая как нефункциональная клетка или раковая клетка), которая циркулирует в кровеносной системе субъекта, такой как кровь, или мишени, которая находится в ткани (такой как пораженная ткань).

В некоторых вариантах осуществления экзосома является синтетической. Например, экзосома может содержать полезную нагрузку, такую как, например, терапевтический полипептид, нуклеиновая кислота (такая как ДНК или РНК) или другой полинуклеотид, полисахарид или гликан, липид или жирная кислота, крупный биологический препарат, малая молекула или токсин, таким образом, что указанная экзосома не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления экзосому модифицируют (например, с помощью введения полезной нагрузки или иным образом модифицирования содержимого комплекса, такого как изменение содержания белка, липидов или гликанов в мембране). Например, экзосомы сначала выделяют из клетки-продуцента, а затем модифицируют, при необходимости, тем самым образуются синтетические экзосомы. В некоторых вариантах осуществления указанную клеткупродуцент модифицируют. Например, в клетку-продуцент могут быть введены экзогенная нуклеиновая кислота, экзогенный полипептид или малая молекула или токсин. В качестве альтернативы или в качестве дополнения клетка-продуцент может быть модифицирована иным образом (например, путем модификации клеточного или мембранного содержания, например, путем изменения содержания липидов или гликанов в клеточной мембране). Экзосомы, полученные из модифицированных клеток-продуцентов, содержат одну или несколько модификаций клетки-продуцента. Указанный способ приводит к образованию синтетических экзосом. В некоторых вариантах осуществления как клетку-продуцент, так и экзосому, выделенную из клетки-продуцента, модифицируют, как описано в данном документе.

Нановезикула

[00155] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой нановезикулу. В определенных вариантах осуществления нановезикула представляет собой малую везикулу клеточного происхождения, содержащую мембрану, которая ограничивает внутреннее пространство, и которая образуется из клетки в результате прямой или косвенной манипуляции таким образом, что указанная нановезикула не образовалась бы клеткой без указанной манипуляции. Соответствующие манипуляции с клеткой включают, но не ограничиваются ими, последовательную экструзию, обработку щелочными растворами, соникацию или их комбинации, и в некоторых случаях могут привести к разрушению клетки-продуцента.

[00156] В различных вариантах осуществления нановезикула имеет наибольший размер, составляющий приблизительно 20-250 нм, такой как, приблизительно 20-100 нм, 20-150 нм, 20-200 нм, 30-100 нм, 30-150 нм, 30-200 нм. 30-250 нм, 40-100 нм, 40-150 нм, 40-200 нм, 40-250 нм, 50-100 нм, 50-150 нм, 50-200 нм, 50-250 нм, 100-200 нм или 150-250 нм.

[00157] В различных вариантах осуществления нановезикула происходит из клетки-продуцента. В некоторых вариантах осуществления нановезикула образуется из клетки-продуцента путем прямой или косвенной манипуляции. Соответствующие манипуляции включают в себя, но не ограничиваясь ими, последовательную экструзию, обработку щелочными растворами, соникацию или их комбинации. В некоторых из этих вариантов осуществления манипуляция может привести к разрушению клетки-продуцента. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления популяция нановезикул по сути не содержит везикул, которые происходят из клеток-продуцентов в результате прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной.

[00158] В некоторых вариантах осуществления нановезикулу выделяют из клетки-продуцента на основании своего размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В определенных вариантах осуществления, выделение может быть достигнуто путем осаждения. Например, нановезикула может иметь удельную плотность 0,5-2,0, 0,6-1,0, 0,7-1,0, 0,8-1,0, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,4-1,5, 1,0-1,5, 1,5-2,0 и 1,0-2,0 кг/м³.

[00159] В различных вариантах осуществления нановезикула содержит липиды или жирные кислоты и полипептиды. В определенных вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит приемник. В некоторых вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит приемник. В некоторых вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит полезную нагрузку. В некоторых из указанных вариантов осуществления полезная нагрузка содержит нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации.

Иммуномодулирующий компонент

[00160] В различных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит иммуномодулирующий компонент.

[00161] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой белок, который экспрессируется в виде трансляционного белка слияния с поверхностным белком экзосомы таким образом, что указанный белок остается на поверхности экзосомы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой мембранный белок. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой растворенный белок. В некоторых вариантах осуществления поверхностный белок экзосомы представляет собой тетраспанин (например, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков ЕWI/иммуноглобулинов (например, PTGFRN, IGSF8, IGSF3), интегрин (например, ITGB1, ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc, или их фрагмент или их вариант.

[00162] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой растворенный белок, который экспрессируется в виде трансляционного белка слияния с поверхностным белком экзосомы таким образом, что указанный растворенный белок остается на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления поверхностный белок экзосомы представляет собой тетраспанин (например, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков EWI/иммуноглобулинов (например, PTGFRN, IGSF8, IGSF3), интегрин (например, ITGB1, ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc, или их фрагмент или их вариант.

[00163] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент обладает противоопухолевой активностью. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент регулирует врожденный иммунный ответ. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент направлен на естественные клетки-киллеры. В некоторых других вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент регулирует адаптивный

иммунный ответ. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент направлен на цитотоксические Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент экспрессируется в клетке-продуценте в своей полноразмерной форме. В других вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде трансляционного слитого белка с поверхностным белком экзосомы, что приводит к более высокому уровню экспрессии биологически активной части иммуномодулирующего соединения на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой растворенный белок, который экспрессируется в виде трансляционного белка слияния с поверхностным белком экзосомы таким образом, что указанный растворенный белок остается на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления поверхностный белок экзосомы представляет собой тетраспанин (например, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков EWI/иммуноглобулинов (например, PTGFRN, IGSF8, IGSF3), интегрин (например, ITGB1, ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc, или их фрагмент или их вариант.

[00165] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки.

[00166] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4). В некоторых из указанных вариантов осуществления ингибитор СТLА-4 представляет собой моноклональное антитело к СТLА-4. В определенных вариантах осуществления указанный ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к СТLА-4. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)2, Fab, Fab' и F(ab')2, F(ab1)2, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к СТLА-4. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против СТLА-4. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой ипилимумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой тремелимумаб.

[00167] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор белка программируемой клеточной гибели 1 (PD-1). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор лиганда белка программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор лиганда белка программируемой клеточной гибели 2 (PD-L2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой моноклональное антитело к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое

антитело или мультиспецифическое антитело против PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой ниволумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой пембролизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой пидилизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой атезолизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой авелумаб.

[00168] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор активированного лимфоцитами гена 3 (LAG3). В некоторых из указанных вариантов осуществления ингибитор LAG3 представляет собой моноклональное антитело к LAG3.

[00169] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТІМ-3). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (ВТLА). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ід и ІТІМ (ТІБІТ). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор V-доменный Ід супрессора активации Т-клеток (VISTA). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор аденозинового рецептора А2а (А2аR). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (КІR). В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор СD20, CD39 или CD73.

[00170] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы.

[00171] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор члена суперсемейства рецепторов ФНО. В определенных вариантах осуществления член суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas-рецептора, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора ВАFF, ATAR, CD271, CD269, GITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой член суперсемейства ФНО. В определенных вариантах осуществления член суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНОα, ФНО-С, ОХ40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2.

[00172] В некоторых вариантах осуществления активатор члена суперсемейства рецепторов ФНО экспрессируется в виде мономерного белка. В некоторых вариантах осуществления активатор члена

суперсемейства рецепторов ФНО экспрессируется в виде тримерных белков. В некоторых вариантах осуществления член суперсемейства рецепторов ФНО экспрессируется в виде мономерного белка. В некоторых вариантах осуществления член суперсемейства рецепторов ФНО экспрессируется в виде тримерных белков.

[00173] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор члена 4 суперсемейства рецепторов TNF (ОХ40). В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор ОХ40 представляет собой агонистическое антитело к ОХ40. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор ОХ40 представляет собой лиганд ОХ40 (ОХ40L).

[00174] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD27. В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор CD27 представляет собой агонистическое антитело к CD27. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор CD27 представляет собой лиганд CD27 (CD27L).

[00175] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD40. В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор CD40 представляет собой агонистическое антитело к CD40. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор CD40 представляет собой лиганд CD40 (CD40L). В некоторых вариантах осуществления CD40L представляет собой мономерный CD40L. В некоторых вариантах осуществления CD40L представляет собой тримерный CD40L.

[00176] В некоторых вариантах осуществления тримерный CD40L сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления тримерный CD40L сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления тримерный CD40L экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

[00177] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор индуцированного глюкокортикоидами белка, связанного с TNFR (GITR). В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор GITR представляет собой агонистическое антитело к GITR. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор GITR представляет собой природный лиганд GITR.

[00178] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор 4-1ВВ. В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор 4-1ВВ представляет собой агонистическое антитело к 4-1ВВ. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор 4-1ВВ представляет собой природный лиганд 4-1ВВ.

[00179] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой Fas-рецептор (Fas). В некоторых из указанных вариантов осуществления Fas-рецептор отображается на поверхности внеклеточной везикулы. В некоторых других вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой лиганд Fas (FasL). В некоторых из указанных вариантов осуществления лиганд Fas отображается на поверхности внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело

к FAS-рецептору. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело к лиганду FAS.

[00180] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор костимулирующей молекулы суперсемейства CD28. В определенных вариантах осуществления указанная костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.

[00181] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор индуцируемого Т-клеточного костимулятора (ICOS). В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор ICOS представляет собой агонистическое антитело к ICOS. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор ICOS представляет собой лиганд ICOS (ICOSL).

[00182] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD28. В некоторых из указанных вариантов осуществления активатор CD28 представляет собой агонистическое антитело к CD28. В некоторых других из указанных вариантов осуществления активатор CD28 представляет собой природный лиганд CD28. В определенных вариантах осуществления лиганд CD28 представляет собой CD80.

[00183] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки и активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы.

[00184] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой растворенный цитокин, который был трансляционно слит с поверхностным белком экзосомы или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин 2 (ИЛ-2). В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин 7 (ИЛ-7). В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин 12 (ИЛ-12). В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин 15 (ИЛ-15).

[00185] В определенных вариантах осуществления цитокин сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-7 сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-7 сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-7 экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

[00186] В определенных вариантах осуществления цитокин сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-12 сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-12 сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-12 экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

[00187] В определенных вариантах осуществления цитокин сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

[00188] В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерферон (ИФН). В определенных вариантах осуществления цитокин сливают с PTGFRN или его фрагментом. В определенных вариантах осуществления интерферон представляет собой интерферон γ (ИФН γ). В некоторых вариантах осуществления ИФН γ сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ИФН γ сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления ИФН γ экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

[00189] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР) или его производное. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой α-цепь ТКР или ее производное. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой β-цепь ТКР или ее производное. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой корецептор Т-клетки или ее производное.

[00190] В некоторых вариантах осуществления указанный иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Тп-МUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раковотестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНО-связанного апоптоз-индуцирующего лиганда.

[00191] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой раковоэмбриональный антиген (CEA). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой эпителиальный опухолевый антиген (ETA).

[00192] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин. В некоторых из указанных вариантов осуществления муцин представляет собой секретируемый муцин. В некоторых других из указанных вариантов осуществления муцин представляет собой трансмембранный муцин. В конкретных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин 1 (MUC1). В конкретных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой Tn-MUC1. В конкретных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин 16 (MUC16).

[00193] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой меланомаассоциированный антиген (MAGE). В некоторых из указанных вариантов осуществления MAGE представляет собой MAGE I типа. В некоторых других из указанных вариантов осуществления MAGE представляет собой MAGE II типа. В конкретных вариантах осуществления MAGE I типа представляет собой MAGE-A2. В конкретных вариантах осуществления MAGE I типа представляет собой MAGE-A4.

[00194] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой альфафетопротеин (AFP). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой опухолевый белок р53 (р53). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой тирозиназу. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой тирозиназа-зависимый белок (TRP). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой лиганд 1 программируемого белка клеточной смерти (PD-L1) или лиганд 2 программируемого белка клеточной смерти (PD-L2). В различных вариантах осуществления опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из CD4, CD8, CD45, CD80 и CD86.

[00195] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или его производное. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с одним или нескольким из альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНО-связанного апоптоз-индуцирующего лиганда.

[00196] В некоторых вариантах осуществления указанный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD3. В определенных вариантах осуществления указанный активатор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CD3. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)2, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела против CD3. В определенных вариантах осуществления активатор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против CD3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент анти-CD3 антитела сливают с PTGFRN или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент анти-CD3 антитела сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления фрагмент анти-CD3 антитела экспрессируется в виде слитого белка с PTGFRN, при этом полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD28. В определенных вариантах осуществления указанный ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CD28. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)2, Fab, Fab' и F(ab¹)₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CD28. В определенных вариантах осуществления ингибитор собой биспецифическое представляет нанотело. антитело или мультиспецифическое антитело против CD28.

[00197] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой главный комплекс гистосовместимости (МНС) или его производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса I или его

производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса II или его производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса III или его производное.

[00198] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или его производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C или их производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-E, HLA-F, HLA-G или их производное. В некоторых из указанных вариантов осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR или их производное.

[00199] В различных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может представлять собой полипептид, полинуклеотид, полисахарид, липид, малую молекулу или токсин.

[00200] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может представлять собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист. В некоторых из указанных вариантов осуществления агонист представляет собой эндогенный агонист, такой как гормон или нейромедиатор. В некоторых других из указанных вариантов осуществления агонист представляет собой экзогенный агонист, такой как лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой физический агонист, который может создавать агонистический ответ без связывания с рецептором. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой суперагонист, который может вызывать больший максимальный ответ, чем эндогенный агонист. В определенных вариантах осуществления агонист представляет собой полный агонист с полной эффективностью в отношении рецептора. В определенных других вариантах осуществления агонист представляет собой частичный агонист, имеющий только частичную эффективность в отношении рецептора по сравнению с полным агонистом. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой обратный агонист, который может ингибировать конститутивную активность рецептора. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой коагонист, который функционирует с другими коагонистами с тем, чтобы оказывать влияние на рецептор. В определенных вариантах осуществления агонист представляет собой необратимый агонист, который перманентно связывается с рецептором посредством образования ковалентной связи. В определенных вариантах осуществления агонист представляет собой селективный агонист для определенного типа рецептора.

[00202] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой антагонист. В некоторых из указанных вариантов осуществления антагонист представляет собой конкурентный антагонист, который обратимо связывается с рецептором в том же сайте связывания, что и эндогенный лиганд или агонист, без активации рецептора. Конкурентный антагонист может влиять на количество агониста, необходимого для достижения максимального ответа. В некоторых других из указанных вариантов осуществления антагонист представляет собой неконкурентный антагонист,

который связывается с активным сайтом рецептора или аллостерическим сайтом рецептора. Неконкурентный антагонист может уменьшить величину максимального ответа, который может быть достигнут с помощью любого количества агониста. В некоторых других вариантах осуществления антагонист представляет собой неконкурентный антагонист, который требует активации рецептора агонистом перед его связыванием с отдельным аллостерическим сайтом связывания.

[00203] В различных вариантах осуществления указанный иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Иммуномодулирующий компонент может представлять собой полноразмерный белок или его фрагмент. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут происходить из природных источников или частично или полностью получены синтетически. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых других вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбирают из фрагментов Fab, Fab' и F(ab')2, F(ab1)2, Fv, dAb и Fd. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент scFv или (scFv)2. В определенных других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело.

[00204] В различных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными. В некоторых из указанных вариантов осуществления химерное антитело имеет домены V-области, отличные от человеческих, и домены Собласти человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются отличными от человеческих, такими как мышиные или ветеринарные.

[00205] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид. В некоторых из указанных вариантов осуществления указанный полинуклеотид включает в себя, но не ограничиваясь ими, мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловую РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК. В некоторых вариантах осуществления указанный полинуклеотид представляет собой РНК (например, мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловую РНК, кшРНК или днкРНК). В некоторых из указанных вариантов осуществления, когда полинуклеотид представляет собой мРНК, он может транслироваться в необходимый полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой молекулу микроРНК (микроРНК) или молекулу пре-микроРНК. В некоторых из указанных вариантов осуществления микроРНК доставляется в цитоплазму целевой клетки таким образом, что молекула микроРНК может приводить к сайленсингу нативной мРНК в целевой клетке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой малую интерферирующую РНК (миРНК) или короткую шпилечную РНК (кшРНК), способные влиять на экспрессию онкогена или других дисрегуляторных полипептидов. В некоторых из указанных вариантов осуществления миРНК

доставляется в цитоплазму целевой клетки таким образом, что молекула миРНК может приводить к сайленсингу нативной мРНК в целевой клетке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой антисмысловую РНК, которая комплементарна мРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой длинную некодирующую РНК (днкРНК), способную регулировать экспрессию генов и модулировать заболевания. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой ДНК, которая может быть транскрибирована в РНК. В некоторых из указанных вариантов осуществления транскрибированная РНК может транслироваться в необходимый полипептид.

[00206] В некоторых вариантах осуществления указанный иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

[00207] В различных вариантах осуществления композиция содержит два или более упомянутых выше иммуномодулирующих компонентов, в том числе смеси, слияния, комбинации и конъюгаты атомов, молекул и т.д. В некоторых вариантах осуществления композиция включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать различных иммуномодулирующих компонентов, ассоциированных с мембраной или заключенных в закрытом объеме указанной внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту, объединенную с полипептидом. В определенных вариантах осуществления композиция содержит два или более полипептида, конъюгированных друг с другом. В определенных вариантах осуществления композиция содержит белок, конъюгированный с биологически активной молекулой. В некоторых из указанных вариантов осуществления биологически активная молекула представляет собой пролекарственное средство.

[00208] B некоторых вариантах осуществления композиция содержит два различных иммуномодулирующих компонента, ассоциированных с мембраной или заключенных в закрытом объеме указанной внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления два различных иммуномодулирующих компонента представляют собой ИЛ-12 и CD40L. В некоторых вариантах осуществления CD40L и ИЛ-12 сливают с PTGFRN или его фрагментом соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD40L и ИЛ-12 сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD40L и ИЛ-12 экспрессируются в виде белков слияния с PTGFRN, при этом полипептиды имеют последовательности SEO ID NO: 20 и SEO ID NO: 3 соответственно.

[00209] B некоторых вариантах осуществления композиция содержит три различных иммуномодулирующих компонента, ассоциированных с мембраной или заключенных в закрытом объеме указанной внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления два различных иммуномодулирующих компонента представляют собой ИЛ-12, CD40L и лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L). В некоторых вариантах осуществления CD40L, ИЛ-12 и FLT3L сливают с PTGFRN или его фрагментом соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD40L, ИЛ-12 и FLT3L сливают с N-концом PTGFRN или его фрагмента соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD40L, ИЛ-12 и FLT3L экспрессируются в виде белков слияния с PTGFRN, при этом полипептиды имеют последовательности SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 22 соответственно.

[00210] Фармацевтические композиции, как правило, содержат множество внеклеточных везикул и фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители или носители определяют отчасти в зависимости от определенной композиции, подлежащей введению, а также с помощью определенного способа, используемого для введения композиции. Соответственно имеется широкое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество внеклеточных везикул (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005)). Фармацевтические композиции, как правило, составляют стерильными и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

[00211] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько терапевтических агентов и внеклеточную везикулу, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы вводят совместно с одним или несколькими отдельными терапевтическими агентами, при этом совместное введение включает в себя введение отдельного терапевтического агента до, после или одновременно с введением внеклеточных везикул.

[00212] Фармацевтически приемлемые наполнители включают в себя наполнители, которые, как правило, безопасны, нетоксичны и предпочтительны, в том числе наполнители, которые приемлемы для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека.

Примеры носителей или разбавителей включают в себя, но не ограничиваясь ими, воду, [00213]физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумина человека. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных субстанций хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или соединения несовместимы с внеклеточными везикулами, описанными в данном документе, рассматривается их использование в композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в композиции. В типичном случае фармацевтическая композиция составлена так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Внеклеточные везикулы могут быть введены парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, интраперитонеальным, интраназальным, внутриопухолевым, внутримышечным путем или в виде ингаляционных средств. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят внутривенно, например, путем инъекции. Внеклеточные везикулы необязательно можно вводить в сочетании с другими терапевтическими агентами, которые, по меньшей мере, частично эффективны при лечении заболевания, расстройства или патологического состояния, для которых предназначены внеклеточные везикулы.

[00214] Растворы или суспензии могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликол, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфат натрия; хелатирующие

соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение рН можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократного применения, изготовленные из стекла или пластмассы.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы (если они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки. В случае внутривенного введения подходящие носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Парсиппени, Нью-Джерси) или фосфатнобуферный солевой раствор (PBS). Композиция, как правило, является стерильной и жидкой до такой степени, что существует возможность легкого введения через шприц. Носитель может представлять собой раствор или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, с помощью поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может достигаться с помощью различных антибактериальных и противогрибковых соединений, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.д. При необходимости, в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто с помощью включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, например, алюминия моностеарата и желатина.

[00216] Стерильные растворы для инъекций могут быть получены с помощью включения внеклеточных везикул в эффективном количестве и в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в данном документе, при необходимости. Как правило, дисперсии готовят с помощью включения внеклеточных везикул в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и любые другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к образованию порошка активного компонента совместно с любым дополнительным необходимыми компонентом из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора. Внеклеточные везикулы могут вводиться в форме депо-инъекции или имплантируемого препарата, которые могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить замедленное или пульсирующее высвобождение внеклеточных везикул.

[00217] Системное введение композиций, содержащих внеклеточные везикулы, также может осуществляться трансмукозальным путем. В случае трансмукозального введения в составе используют проникающие вещества, подходящие для проникновения через мембрану. Такие проникающие вещества, как правило, известны в данной области техники и включают в себя, например, в случае трансмукозального введения детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено с помощью, например, назальных спреев.

[00218] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят внутривенно субъекту, который получит положительный результат от фармацевтической композиции. В определенных других вариантах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, например, пуетм внутрилимфатической инъекции или внутриузловой инъекции (см., например, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)) или путем внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем внутриопухолевой инъекцией, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[00219] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят в виде жидкой суспензии. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде состава, который способен образовывать депо после введения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления депо медленно высвобождает внеклеточные везикулы в кровоток или остается в форме депо.

[00220] В типичном случае фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, чтобы не содержать контаминантов, являются биосовместимыми и нетоксичными и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, то вода является высокоочищенной и обработанной для того, чтобы не содержать контаминантов, например, эндотоксинов.

[00221] Фармацевтически приемлемым носителем может быть лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмал, аравийская камедь, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, целлюлоза, вода, сироп, метилцеллюлоза, метилгидроксибензоат пропилгидроксибензоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное масло, но не ограничиваясь ими. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать смазывающее вещество, смачивающий агент, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент, суспендирующий агент и/или консервант.

[00222] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, и необязательно фармацевтически активный или терапевтический агент. Терапевтический агент может представлять собой биологический агент, агент в виде малой молекулы или агент в виде нуклеиновой кислоты.

[00223] Представлены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутриопухолевой инъекции.

[00224] В определенных вариантах осуществления препарат внеклеточных везикул подвергается облучению, например, рентгеновским лучам, гамма-лучам, бета-частицам, альфа-частицам, нейтронам, протонам, элементарным ядрам, УФ-излучению, с тем, чтобы повредить остаточные способные к репликации нуклеиновые кислоты.

[00225] В некоторых вариантах осуществления препарат внеклеточных везикул подвергается гаммаоблучению с использованием дозы облучения более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 кГр. [00226] В определенных вариантах осуществления препарат внеклеточных везикул подвергается рентгеновскому облучению с использованием дозы облучения более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более 10000 мЗв.

Способы

[00227] Аспекты данного изобретения также включают в себя способы получения композиции, содержащей внеклеточную везикулу и иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления способ включает: получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента, при этом клетка-продуцент в природе содержит иммуномодулирующий компонент; и необязательно выделение полученной внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает модифицирование клетки-продуцента с помощью иммуномодулирующего компонента; получение внеклеточной везикулы из модифицированной клетки-продуцента; и необязательно выделение полученных внеклеточных везикул. В некоторых других вариантах осуществления указанный способ включает получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента; выделение полученных внеклеточных везикул; и модифицирование выделенной внеклеточной везикулы с помощью иммуномодулирующего компонента. В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает составление выделенных внеклеточных везикул в фармацевтическую композицию.

Способы получения внеклеточных везикул

Способы модификации клетки-продуцента иммуномодулирующим компонентом

[00228] В различных вариантах осуществления способ включает модификацию клетки-продуцента иммуномодулирующим компонентом.

[00229] Клетка-продуцент может представлять собой клеточную линию млекопитающих, клеточную линию растений, клеточную линию насекомых, клеточную линию грибов или прокариотическую клеточную линию. В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой клеточную линию млекопитающих. Клеточные линии млекопитающих включают в себя, но не ограничиваясь ими, клеточную линию почки эмбриона человека (НЕК), клеточную линию яичника китайского хомячка (СНО), клеточную линию НТ-1080, клеточную линию НеLa, клеточную линию PERC-6, клеточную линию CEVEC, клеточную линию фибробластов, клеточную линию амниоцитов, клеточную линию эпителиальных клеток и клеточную линию мезенхимальных стволовых клеток (MSC). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клеточная линия млекопитающих может представлять собой клетки НЕК-293, клетки фибробластов крайней плоти человека ВЈ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN®, клетки амниоцитов CAP®, мезенхимальные стволовые адипоциты или клетки RPTEC/TERT1. Клетка-продуцент также может представлять собой первичную клетку. В различных вариантах осуществления первичная клетка может представлять собой первичную клетку млекопитающего, первичную растительную клетку, первичную клетку насекомого, первичную клетку гриба или первичную прокариотическую клетку.

[00230] В определенных предпочтительных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой иммунную клетку, такую как дендритная клетка, Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер

(NK-клетка), антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (Treg-клетка).

[00231] В различных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может экспрессироваться в клетке-продуценте из трансгена или мРНК, введенных в клетку-продуцент, путем трансфекции, вирусной трансдукции, электропорации, экструзии, соникации, слияния клеток или других способов, которые известны специалисту в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть введен в подходящие клетки-продуценты с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Papapetrou et al., Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В некоторых вариантах осуществления катионные липиды образуют комплексы с иммуномодулирующим компонентом посредством зарядовых взаимодействий. В некоторых из указанных вариантов осуществления положительно заряженные комплексы связываются с отрицательно заряженной поверхностью клетки и поглощаются клеткой посредством эндоцитоза. В некоторых других вариантах осуществления катионный полимер может быть использован для трансфекции клетокпродуцентов. В некоторых из указанных вариантов осуществления катионный полимер представляет собой полиэтиленимин (РЕІ). В определенных вариантах осуществления химические вещества, такие как кальция, циклодекстрин или полибрен, могут быть использованы для введения иммуномодулирующего компонента в клетки-продуценты. Иммуномодулирующий компонент также может быть введен в клетку-продуцент с использованием физического способа, такого как трансфекция, опосредованная частицами, «генная пушка», биолистика или технология бомбардировки частицами (Papapetrou et al., Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). Репортерный ген, такой как, например, бетагалактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок, можно использовать для оценки эффективности трансфекции клетки-продуцента.

[00233] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем вирусной трансдукции. В качестве носителей для переноса генов можно использовать ряд вирусов, в том числе вирус мышиного лейкоза (MMLV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус простого герпеса (HSV), лентивирусы и спумавирусы. Опосредованные вирусами носители для переноса генов включают в себя векторы на основе ДНК-вирусов, таких как аденовирус, аденоассоциированный вирус и вирус герпеса, а также векторы на основе ретровирусов.

[00234] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем электропорации. Электропорация приводит к созданию временных пор в клеточной мембране, позволяя вводить различные молекулы в клетку. В некоторых вариантах осуществления ДНК и РНК, а также полипептиды и не полипептидные терапевтические агенты могут быть введены в клетку-продуцент путем электропорации.

[00235] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления стеклянную

микропипетку можно использовать для введения иммуномодулирующего компонента в клетку-продуцент на микроскопическом уровне.

[00236] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем экструзии.

[00237] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем соникации. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент подвергается воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение клеточной мембраны, позволяющее загружать иммуномодулирующий компонент.

[00238] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент путем слияния клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится путем электрического слияния клеток. В некоторых других вариантах осуществления полиэтиленгликоль (ПЭГ) используется для слияния клеток-продуцентов. В некоторых других вариантах осуществления вирус Сендай используется для слияния клеток-продуцентов.

[00239] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клеткупродуцент путем гипотонического лизиса. В некоторых из указанных вариантов осуществления клеткапродуцент подвергается воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к их разрыву,
позволяя загружать иммуномодулирующий компонент. В некоторых альтернативных вариантах
осуществления контролируемый диализ против гипотонического раствора используется для набухания
клетки-продуцента и для создания пор в мембране клетки-продуцента. Клетка-продуцент впоследствии
подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно закупорить мембрану.

[00240] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент с помощью обработки детергентами. В определенных вариантах осуществления клетку-продуцент обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану клетки-продуцента, создавая поры, позволяющие загружать иммуномодулирующий компонент. После загрузки клеток-продуцентов детергент вымывается, тем самым происходит закупорка мембраны.

[00241] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клетку-продуцент посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором. В определенных вариантах осуществления клетки-продуценты имеют поверхностный рецептор, который при связывании иммуномодулирующего компонента вызывает интернализацию рецептора и ассоциированного иммуномодулирующего компонента.

[00242] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится в клеткупродуцент с помощью фильтрации. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты и иммуномодулирующий компонент могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у клетки-продуцента, что вызывает временное разрушение мембраны клетки-продуцента и позволяет иммуномодулирующему компоненту проникать в клетку-продуцент.

[00243] В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент подвергается нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению клеточной мембраны, позволяя загружать иммуномодулирующий компонент.

Способы модификации внеклеточной везикулы иммуномодулирующим компонентом

[00244] В различных альтернативных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится непосредственно во внеклеточные везикулы после выделения внеклеточных везикул.

[00245] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть введен во внеклеточные везикулы с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Papapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В определенных вариантах осуществления химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен, могут быть использованы для введения иммуномодулирующего компонента во внеклеточные везикулы.

[00246] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергаются воздействию электрического поля, которое вызывает создание временных отверстий в мембране внеклеточной везикулы, позволяя загружать иммуномодулирующий компонент.

[00247] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления стеклянную микропипетку можно использовать для введения иммуномодулирующего компонента непосредственно во внеклеточную везикулу на микроскопическом уровне.

[00248] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем экструзии.

[00249] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем соникации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергаются воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение мембраны внеклеточной везикулы, позволяя загружать иммуномодулирующий компонент.

[00250] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть конъюгирован с поверхностью внеклеточной везикулы. Конъюгация может быть достигнута химически или ферментативно с помощью способов, известных в данной области техники.

[00251] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула содержит иммуномодулирующий компонент, который химически конъюгирован. Химическая конъюгация может быть осуществлено путем ковалентного связывания иммуномодулирующего компонента с другой молекулой с использованием или без использования линкера. Образование таких конъюгатов известно специалистам в данной области техники, и известны различные способы осуществления конъюгации, причем выбор конкретной методики зависит от материалов, которые должны быть конъюгированы. В определенных вариантах осуществления полипептиды конъюгируют с внеклеточной везикулой. В определенных других вариантах осуществления не относящиеся к полипептидам соединения, такие как липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и малые молекулы, конъюгируют с внеклеточной везикулой.

[00252] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем гипотонического лизиса. В некоторых из указанных вариантов

осуществления внеклеточные везикулы подвергаются воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к их разрыву, позволяя загружать иммуномодулирующий компонент. В некоторых альтернативных вариантах осуществления контролируемый диализ против гипотонического раствора используется для набухания внеклеточной везикулы и для создания пор в мембране внеклеточной везикулы. Внеклеточная везикула впоследствии подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно закупорить мембрану.

[00253] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу с помощью обработки детергентами. В определенных вариантах осуществления внеклеточные везикулы обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану внеклеточной везикулы, создавая поры, позволяющие загружать иммуномодулирующий компонент. После загрузки внеклеточных везикул детергент вымывается, тем самым происходит закупорка мембраны.

[00254] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором. В определенных вариантах осуществления внеклеточные везикулы имеют поверхностный рецептор, который при связывании иммуномодулирующего компонента вызывает интернализацию рецептора и ассоциированного иммуномодулирующего компонента.

[00255] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу с помощью механического обстрела. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы могут бомбардироваться иммуномодулирующим компонентом, прикрепленным к тяжелой или заряженной частице, такой как золотые микроносители. В некоторых из указанных вариантов осуществления частица может быть механически или электрически ускорена таким образом, что она проходит через мембрану внеклеточной везикулы.

[00256] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводится во внеклеточную везикулу путем фильтрации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы и иммуномодулирующий компонент могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у внеклеточной везикулы, что вызывает временное разрушение мембраны внеклеточной везикулы и позволяет иммуномодулирующему компоненту проникать во внеклеточную везикулу.

[00257] В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергаются нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению мембраны внеклеточных везикул, позволяя загружать иммуномодулирующий компонент.

Способы выделения внеклеточных везикул

[00258] Внеклеточные везикулы могут быть выделены из клеток-продуцентов. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула высвобождается клеткой-продуцентом в среду для культивирования клеток. Предполагается, что все известные способы выделения внеклеточных везикул считаются подходящими для применения в данном документе. Например, физические свойства внеклеточных везикул могут быть использованы для отделения их от среды или другого исходного материала, в том числе разделения на основе электрического заряда (например, электрофоретическое

разделение), размера (например, фильтрация, молекулярное просеивание и т.д.), плотности (например, регулярное центрифугирование или центрифугирование в градиенте плотности), константы Сведберга (например, седиментация с внешней силой или без нее и т.д.). В качестве альтернативы или в качестве дополнения выделение может основываться на одном или нескольких биологических свойствах и включать в себя способы, которые могут использовать поверхностные маркеры (например, для осаждения, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания лиганда, неспецифического связывания лиганда, аффинной очистки и т.д.).

[00259] Выделение и обогащение могут быть выполнены обычным и неизбирательным способом, в типичном случае включая последовательное центрифугирование. В качестве альтернативы выделение и обогащение могут быть выполнены более специфичным и селективным способом, таким как использование поверхностных маркеров, специфичных для внеклеточных везикул или клеток-продуцентов. Например, специфические поверхностные маркеры могут быть использованы в иммунопреципитации, сортировке FACS, аффинной очистке и магнитном разделении с лигандами, связанными с гранулами.

[00260] В некоторых вариантах осуществления для выделения внеклеточных везикул можно использовать эксклюзионную хроматографию. Методики эксклюзионной хроматографии известны в данной области техники. Иллюстративные неограничивающие методики представлены в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделяют долю свободного объема и она содержит внеклеточные везикулы, представляющие интерес. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения с помощью методик центрифугирования (одной или нескольких хроматографических фракций), как обычно известно в данной области техники. В некоторых вариантах, например, центрифугирование в градиенте плотности можно использовать для дополнительного выделения внеклеточных везикул. В определенных вариантах осуществления может быть предпочтительным дополнительное отделение внеклеточных везикул, происходящих из клеток-продуцентов, от внеклеточных везикул другого происхождения. Например, внеклеточные везикулы, происходящие из клеток-продуцентов, путем иммуносорбентного захвата с использованием комплекса антиген-антитела, специфичного для клетки-продуцента.

[00261] В некоторых вариантах осуществления выделение внеклеточных везикул может включать в себя комбинации способов, которые включают, но не ограничиваясь ими, дифференциальное центрифугирование, мембранную фильтрацию на основе размеров, иммунопреципитацию, сортировку FACS и магнитное разделение.

Способы измерения размера внеклеточных везикул

[00262] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают измерение размера внеклеточных везикул и/или популяций внеклеточных везикул. Как правило, размер внеклеточной везикулы измеряется как наибольший измеряемый размер. Как правило, наибольший измеряемый размер внеклеточной везикулы также называется ее диаметром.

[00263] Размер внеклеточных везикул можно измерить с помощью динамического светорассеяния (DLS) и/или многоугольного светорассеяния (MALS). Способы применения DLS и/или MALS для измерения размера внеклеточных везикул известны специалистам в данной области техники и включают анализ отслеживания наночастиц (NTA, например, с использованием устройства отслеживания наночастиц Malvern NanoSight NS300). В конкретном варианте осуществления размер внеклеточной везикулы определяют с использованием Malvern NanoSight NS300. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью NTA (например, с использованием Malvern NanoSight NS300).

[00264] Размер внеклеточных везикул можно измерить с помощью настраиваемого резистивного считывания импульсов (TRPS). В конкретном варианте осуществления размер внеклеточных везикул, измеряемый с помощью TRPS, определяют с использованием iZON qNANO Gold. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию внеклеточных везикул, описанные в данном документе.

документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold). В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью TRPS (например, с использованием iZON qNano Gold).

[00265] Размер внеклеточных везикул можно измерить с помощью электронной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления способ электронной микроскопии, используемый для измерения размера внеклеточных везикул, представляет собой трансмиссионную электронную микроскопию. В конкретном варианте осуществления трансмиссионный электронный микроскоп, используемый для измерения размера внеклеточных везикул, представляет собой $Tecnai^{TM}$ G^2 Spirit BioTWIN. Способы измерения размера внеклеточных везикул с использованием электронного микроскопа хорошо известны специалистам в данной области техники, и любой такой способ может быть подходящим для измерения размера внеклеточных везикул. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе внеклеточные везикулы имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления описанные в данном документе внеклеточные везикулы имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа $Tecnai^{TM}$ G^2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспа $^{\text{ITM}}$ G^2 Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 20-300 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN). В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, представляют собой популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер приблизительно 40-200 нм, измеряемый с помощью сканирующего электронного микроскопа Теспаі^{тм} G² Spirit BioTWIN).

Способы лечения рака, GvHD и аутоиммунного заболевания

[00266] Кроме того, в данном документе представлены способы лечения рака, заболевания «трансплантат против хозяина» (GvHD) и аутоиммунного заболевания у субъекта.

[00267] В различных вариантах осуществления композицию вводят субъекту, больному раком. В некоторых из указанных вариантов осуществления композиция может усиливать иммунный ответ и усиливать целенаправленной воздействие на опухоль иммунной системы субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, поделжащий лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или так называемые «горячие опухоли» или «воспалительные опухоли». В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, характеризуется низкими уровнями или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли или так называемыми «холодными опухолями» или «невоспалительными опухолями». В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в количестве и в течение времени, достаточных для превращения «холодной опухоли» в «горячую опухоль», т.е., указанное введение приводит к инфильтрации лейкоцитов (таких как Т-клетки) в микроокружение опухоли.

[00268] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую внеклеточную везикулу и иммуномодулирующий компонент, вводят субъекту в качестве противораковой вакцины. В некоторых из указанных вариантов осуществления композицию вводят субъекту в виде персонализированной противораковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген или пептид, происходящий из опухолевого антигена. Примеры подходящих опухолевых антигенов включают в себя: альфа-фетопротеин (AFP), раково-эмбриональный антиген (CEA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), муцин 1 (MUC1), Тп-MUC1, муцин 16 (MUC16), тирозиназу, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), опухолевый белок р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганд 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганд 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелин, VEGFR, альфа-фолатный рецептор, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярный антиген, MART-1 gp100 и ФНО-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд. В определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности. В

определенных вариантах осуществления указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта, получающего композицию.

[00269] Виды рака, которые можно лечить с помощью композиции, включают в себя, но не ограничиваясь ими, виды рака, приведенные в Табл. 5.

[00270] В определенных вариантах осуществления композицию вводят субъекту с болезнью «трансплантат против хозяина» (GvHD). В некоторых из указанных вариантов осуществления композиция может подавлять иммунный ответ и ослаблять симптомы GvHD. В некоторых конкретных вариантах осуществления композиция облегчает симптомы GvHD посредством активации апоптотической передачи сигналов. В определенных вариантах осуществления композиция для лечения GvHD содержит лиганд Fas (FasL). В некоторых из указанных вариантов осуществления FasL экспрессируется на поверхности внеклеточной везикулы.

[00271] В различных вариантах осуществления композицию вводят субъекту с аутоиммунным заболеванием. В некоторых из указанных вариантов осуществления композиция может подавлять иммунный ответ и подавлять иммунную активность субъекта.

[00272] Аутоиммунные заболевания включают в себя, но не ограничиваясь ими, рассеянный склероз, периферический неврит, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, алопецию, аутоиммунный панкреатит, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, целиакию, болезнь Девика (оптиконевромиелит), гломерулонефрит, IgA-нефропатии, различные васкулиты, склеродермию, сахарный диабет, артериит, витилиго, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, псориаз, увеит и системную красную волчанку.

[00273] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в подходящую жидкость и вводят в вену субъекта.

[00274] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в подходящую жидкость и вводят в артерию субъекта.

[00275] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем интратекального введения. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят посредством инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство для того, чтобы она достигла спинномозговой жидкости (CSF).

[00276] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутриопухолево в одну или несколько опухолей субъекта.

[00277] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем интраназального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть инсуфлирована через нос либо в форме местного введения, либо в форме системного введения. В определенных вариантах осуществления композицию вводят в виде назального спрея.

[00278] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем интраперитонеального введения. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в

подходящую жидкость и вводят в брюшную полость субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанное интраперитонеальное введение приводит к распределению композиции (например, внеклеточных везикул в композиции) в лимфатические сосуды. В некоторых вариантах осуществления указанное интраперитонеальное введение приводит к распределению композиции (например, внеклеточных везикул в композиции) в тимус, селезенку и/или костный мозг. В некоторых вариантах осуществления указанное интраперитонеальное введение приводит к распределению композиции (например, внеклеточных везикул в композиции) в один или несколько лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления указанное интраперитонеальное введение приводит к распределению композиции (например, внеклеточных везикул в композиции) в один или несколько из шейного лимфатического узла, пахового лимфатического узла, медиастинального лимфатического узла или стернального лимфатического узла. В некоторых вариантах осуществления указанное интраперитонеальное введение приводит к распределению композиции (например, внеклеточных везикул в композиции (например, внеклеточных везикул в композиции) в поджелудочную железу.

[00279] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем периокулярного введения. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственных средств включает в себя пути субконъюнктивального, переднего суб-тенонового, заднего суб-тенонового и ретробульбарного введения.

[00280] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят одному и тому же субъекту с помощью нескольких путей введения. В некоторых вариантах осуществления указанные несколько путей введения включают в себя внутривенное введение, внутриартериальное введение, интратекальное введение, интраназальное введение, внутриопухолевое введение, интраперитонеальное введение и/или периокулярное введение. В предпочтительном варианте осуществления указанные несколько путей введения включают в себя внутривенное введение и интраперитонеальное введение.

[00281] В некоторых вариантах осуществления дозировка внеклеточных везикул составляет от 1 нг до 10 нг, от 10 нг до 100 нг, от 100 нг до 1 мкг, от 1 мкг до 5 мкг, от 5 мкг до 10 мкг, от 10 мкг до 50 мкг, от 50 мкг до 75 мкг, от 75 мкг до 100 мкг, от 100 мкг, от 100 мкг, от 150 мкг, от 150 мкг до 200 мкг, от 200 мкг до 300 мкг, от 300 мкг, от 500 мкг, от 500 мкг до 100 мкг до 100 мг.

[00282] Композиции могут быть введены субъекту однократно. В качестве альтернативы многократные введения могут быть выполнены в течение определенного периода времени. Например, субъекту могут быть выполнены два, три, четыре, пять или более введений. В некоторых вариантах осуществления введения могут выполняться, при необходимости, например, до тех пор, пока сохраняются симптомы, ассоциированные с заболеванием, нарушением или патологическим состоянием. В некоторых вариантах осуществления повторные введения могут быть показаны для оставшейся части жизни субъекта. Периоды лечения могут варьироваться и могут составлять, например, не более года, шести месяцев, трех месяцев, двух месяцев, одного месяца, двух недель, одной недели, трех дней, двух дней или не более одного дня.

[00283] В некоторых вариантах осуществления дозы внеклеточных везикул вводят с такими интервалами, как один раз в день, через день, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в месяц или два раза в месяц.

[00284] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят с частотой, достаточной для эффективного увеличения концентрации иммуномодулирующего компонента в целевой клетке или ткани выше уровня, который ассоциирован с симптомом заболевания, нарушения или патологического состояния.

[00285] В некоторых вариантах осуществления композиции вводят, по меньшей мере, дважды в течение периода лечения, таким образом, чтобы нормализовать заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят, по меньшей мере, дважды в течение периода лечения, таким образом, чтобы предупредить заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз в течение периода лечения, таким образом, чтобы доставить достаточное количество иммуномодулирующего компонента в целевую клетку или ткань в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз в течение периода лечения, таким образом, чтобы доставить достаточное количество иммуномодулирующего компонента в целевую клетку или ткань в течение периода лечения, таким образом, чтобы предупредить, снизить, нормализовать или замедлить один или несколько симптомов заболевания, нарушения или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления увеличение концентрации иммуномодулирующего компонента в целевой клетке или ткани включает в себя увеличение пиковой концентрации, в то время как в других вариантах осуществления это включает в себя увеличение средней концентрации. В некоторых вариантах осуществления существенное увеличение в течение периода лечения может быть определено путем сравнения периода до или после лечения у субъекта или путем сравнения измерений, выполненных в популяции, получающей лечение, с сопоставимой, не получающей лечение контрольной популяцией.

[00286] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз за период лечения, таким образом, что концентрация иммуномодулирующего компонента в целевой клетке или ткани увеличивается, по меньшей мере, приблизительно на одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз за период лечения, таким образом, что концентрация иммуномодулирующего компонента в целевой клетке или ткани увеличивается в течение определенного периода времени, по меньшей мере, такого же периода, как период лечения.

[00287] В некоторых вариантах осуществления временной интервал между повторными введениями в течение периода лечения не превышает период, в течение которого количество внеклеточных везикул в кровотоке уменьшается до менее чем приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% количества внеклеточных везикул, присутствующих во вводимой фармацевтической композиции.

[00288] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают одну или несколько доз нетерапевтических внеклеточных везикул перед инъекцией подходящей терапевтической дозы внеклеточных везикул, содержащих терапевтический агент. В определенных вариантах осуществления нетерапевтическая внеклеточная везикула вводится отдельно и в другой дозе, чем терапевтические внеклеточные везикулы. В определенных вариантах осуществления доза нетерапевтической

внеклеточной везикулы больше, чем доза терапевтической внеклеточной везикулы. В определенных других вариантах осуществления доза нетерапевтической внеклеточной везикулы меньше, чем доза терапевтической внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления доза нетерапевтической внеклеточной везикулы такая же самая, как и доза терапевтической внеклеточной везикулы. В различных вариантах осуществления способы с применением нетерапевтических внеклеточных везикул перед инъекцией подходящей дозы терапевтических внеклеточных везикул приводят к снижению пересмотра терапевтических внеклеточных везикул в печени, легких и/или селезенке.

[00289] Эффективное количество композиции представлено на основе, по меньшей мере, частично, целевой ткани, целевого типа клеток, способа введения, физических характеристик внеклеточных везикул (например, размера и в некоторых случаях количества молекул, подлежащих доставке) и других показателей. Как правило, эффективное количество композиции обеспечивает эффективный клеточный ответ целевой клетки. Повышение эффективности может быть продемонстрировано увеличением клеточной трансфекции (т.е., процентом клеток, трансфицированных компонентами внеклеточных везикул), усилением клеточного ответа или снижением врожденного иммунного ответа субъекта-хозяина.

[00290] Доза и частота введения внеклеточных везикул и их фармацевтических композиций могут быть определены, например, лечащим врачом на основании различных факторов, таких как тяжесть заболевания, возраст пациента, пол и диета, тяжесть любого воспаления, время введения и другие клинические факторы. В одном примере внутривенное введение начинают с дозы, которая является минимально эффективной, и указанную дозу увеличивают в течение предварительно выбранного периода времени до тех пор, пока не наблюдается положительный эффект. Впоследствии постепенное увеличение дозы ограничивается уровнями, которые приводят к соответствующему увеличению эффекта, принимая во внимание любые возможные побочные эффекты, которые могут возникнуть.

примеры

[00291] Следующие примеры изложены для того, чтобы представить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получить и применить данное изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением, а также они не предназначены для представления того, что приведенные ниже эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному. Можно использовать стандартные сокращения, например, п.о., пара (пары) оснований; кб, килобаза (килобазы); пл, пиколитр (пиколитры); с или сек, секунда (секунды); мин, минута (минуты); ч или час, час (часы); аа, аминокислота (аминокислоты); нт, нуклеотид (нуклеотиды); и т.п.

[00292] Практическое применение данного изобретения будет осуществляться, если не указано иное, с помощью стандартных способов химии, биохимии, методик рекомбинантной ДНК и фармакологии, в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Такие методики в полном объеме

объясняются в литературе. См., например, Т.Е. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Способы

Очистка экзосом

[00293] Кондиционированные питательные среды собирали и центрифугировали при $300-800 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и крупных остатков. Затем в супернатант среды добавляли $1000~\rm EД/л$ Вепzonase® и инкубировали при $37~\rm ^{\circ}C$ в течение 1 часа на водяной бане. Супернатант собирали и центрифугировали при $16000 \times g$ в течение $30~\rm M$ инут при $4~\rm ^{\circ}C$ для удаления остаточного клеточного дебриса и других крупных контаминантов. Затем супернатант ультрацентрифугировали при $133900 \times g$ в течение $3~\rm ^{\circ}C$ для осаждения экзосом. Супернатант отбрасывали, а любые остаточные среды аспирировали со дна пробирки. Осадок ресуспендировали в $200-1000~\rm M$ кл PBS (-Ca -Mg).

[00294] Для дополнительного обогащения популяций экзосом осадок обрабатывали путем очистки в градиенте плотности (сахароза или Ортіргер^{ТМ}). Для очистки в градиенте сахарозы слой осадка с экзосомами помещали поверх градиента сахарозы, как определено в Табл. 6 ниже:

Таблица 6, Градиент плотности сахарозы:

Рабочий процент	65% основной	Об. Milli-Q (мл)
(%)	об. (мл)	
50	3,85	1,15
40	3,08	1,92
25	1,92	3,08
10	0,46	2,54

[00295] Градиент центрифугировали при $200000 \times g$ в течение 16 часов при 4 °C в пробирке Ultra-Clear (344059) объемом 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti, для отделения фракции экзосом.

[00296] Слой экзосом осторожно удаляли с верхнего слоя и разводили в $\sim 32,5$ мл PBS в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл и повторно ультрацентрифугировали при 133900 \times g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме PBS (~ 200 мкл) и хранили при 4 °C.

[00297] В случае градиента Ортіргер TM готовили 3-х уровневый стерильный градиент с равными объемами 10%, 30% и 45% Ортіргер в пробирке Ultra-Clear (344059) объемом 12 мл для ротора SW 41 Ті. Осадок добавляли к градиенту Ортіргер TM и ультрацентрифугировали при 200000 \times g в течение 16 часов при 4 °C для отделения фракции экзосом. Слой экзосом затем осторожно собирали из верхней части, составляющей \sim 3 мл, пробирки.

[00298] Фракцию экзосом разводили в \sim 32 мл PBS в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл и ультрацентрифугировали при 133900 \times g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Затем осажденные экзосомы ресуспендировали в минимальном объеме PBS (\sim 200 мкл) и хранили при 4 °C.

<u>Пример 1: Разработка экзосом для отображения антитела к регулятору иммунных контрольных точек</u>

[00299] Клеточную линию почки эмбриона человека (НЕК) выращивали до высокой плотности и полученные экзосомы выделяли из культуральной среды в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники (например, способами, описанными в данном документе). Экзосомы, разработанные с использованием антитела к цитотоксическому Т-лимфоцитассоциированному белку 4 (СТLА-4), получали путем химической конъюгации в соответствии с методиками, известными в данной области техники. Экзосомы, модифицированные антителом к СТLА4, отбирали с помощью проточной цитометрии. В то же время немодифицированные экзосомы выделяли в соответствии с теми же стандартными способами.

[00300] Две популяции экзосом метили радиоактивным индикатором, и 150 мкг каждого препарата инъецировали в организм живых мышей (например, в мышиной модели меланомы). Мышей, получающих либо экзосомы, отображающие антитело к СТLА-4, либо немодифицированные экзосомы, непрерывно контролировали в течение 30 минут и повторно с четырехчасовыми интервалами с помощью ПЭТ/КТ всего животного. Визуализация всего животного позволяла в реальном времени отслеживать перемещение в высоком разрешении меченых экзосом в различные ткани.

[00301] 150 мкг каждой популяции экзосом внутривенно инъецировали в организм двух когорт мышей без предварительного мечения радиоактивным индикатором. Мышей умерщвляли через пять недель после введения. Образцы опухоли собирали и анализировали с помощью иммуногистохимического анализа и ПЦР в реальном времени.

Пример 2: Разработка экзосом для отображения лиганда Fas

[00302] Антигенпрезентирующие клетки человека трансфицировали плазмидой, кодирующей устойчивый к пуромицину селектируемый маркер и лиганд Fas. Трансфицированные клетки обрабатывали пуромицином и устойчивые колонии отбирали и анализировали в отношении поверхностной экспрессии лиганда Fas с помощью проточной цитометрии. Клетки, стабильно экспрессирующие лиганд Fas, выращивали до высокой концентрации и полученные экзосомы выделяли из культуральной среды в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники (например, способами, описанными в данном документе). В то же время нетрансфицированные клетки-продуценты культивировали и полученные экзосомы выделяли в соответствии с теми же стандартными способами.

[00303] Две популяции экзосом метили радиоактивным индикатором, и 150 мкг каждого препарата инъецировали в организм живых мышей (например, в мышиной модели GvHD). Мышей, получающих либо экзосомы, происходящие из немодифицированных клеток, либо экзосомы, происходящие из клеток, экспрессирующих лиганд Fas, непрерывно контролировали в течение 30 минут и повторно с

четырехчасовыми интервалами с помощью ПЭТ/КТ всего животного. Визуализация всего животного позволяла в реальном времени отслеживать перемещение в высоком разрешении меченых экзосом в различные ткани.

[00304] Очищенные популяции экзосом из немодифицированных клеток-продуцентов и клеток-продуцентов, разработанных для экспрессии лиганда Fas, очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе. 150 мкг каждой популяции экзосом инъецировали в организм двух когорт мышей без предварительного мечения радиоактивным индикатором. Животных обеих когорт умерщвляли через три-пять недель после введения для иммуногистохимического анализа и ПЦР в реальном времени.

Пример 3: Лимфатический захват экзосом после интраперитонеального введения

[00305] Для определения биораспределения очищенных экзосом *in vivo* проводили следующий эксперимент.

[00306] Кондиционированные питательные среды из клеток 293Т собирали и центрифугировали при $300-800 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и крупного дебриса. Затем в супернатант среды добавляли $1000 \, \mathrm{EД./л}$ Вепzonase® и инкубировали при $37 \, ^{\circ}\mathrm{C}$ в течение 1 часа на водяной бане. Супернатант собирали и центрифугировали при $16000 \times g$ в течение $30 \, \mathrm{M}$ минут при $4 \, ^{\circ}\mathrm{C}$ для удаления остаточного клеточного дебриса и других крупных контаминантов. Затем супернатант ультрацентрифугировали при $133900 \times g$ в течение $3 \, \mathrm{vacob}$ при $4 \, ^{\circ}\mathrm{C}$ для осаждения экзосом. Супернатант отбрасывали, а остаточные среды аспирировали со дна пробирки. Затем осадок ресуспендировали в $200-1000 \, \mathrm{mkn}$ PBS (-Ca -Mg).

[00307] Для дополнительного обогащения популяций экзосом осадок обрабатывали путем очистки в градиенте плотности сахарозы, как определено в Табл. 6.

[00308] Градиент центрифугировали при $200000 \times g$ в течение 16 часов при 4 °C в пробирке Ultra-Clear (344059) объемом 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti, для отделения фракции экзосом.

[00309] Слой экзосом осторожно удаляли с верхнего слоя и разводили в $\sim 32,5$ мл PBS в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл и повторно ультрацентрифугировали при 133900 \times g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме PBS (~ 200 мкл) и хранили при 4 °C.

[00310] Для радиоактивной маркировки очищенных экзосом для визуализации *in vivo* $1x10^{11}$ очищенных экзосом в 100 мкл разбавляли HEPES (200 мкл, 0,1 M, pH 8,5) и конъюгировали с p-SCN-Bn-DFO (5 мкг) в течение одного часа при 37 °C с последующей инкубацией отдельно в течение ночи при 4 °C. DFO-экзосомы инкубировали с 89Zr (7,5 мКи), разведенным в HEPES (100 мкл, 1 M, pH 7,3), в течение одного часа при 37 °C и очищали на колонке qEv. Это приводило к общему выходу (0,4 мКи 89Zr-DFO-экзосом в 0,8 мл PBS) при 100 мкКи/ $1x10^{10}$ экзосом. Контроль качества (ВЭЖХ) проводили перед выпуском для обеспечения> 95% RCP.

Стабильность in vitro

[00311] Экзосомы (20 мкКи/ $2x10^{10}$) инкубировали при комнатной температуре в:

а. буферной смеси

b. мышиной сыворотке (10% oб./oб. раствор экзосом в сыворотке, при необходимости)

[00312] Через 2 часа после начала инкубации растворы вводили в систему ВЭЖХ для определения стабильности индикатора.

Визуализация in vivo

[00313] Мышей (SKH-1, n=8, в возрасте 5-8 недель) рандомизировали на две группы, взвешивали и инъецировали (при этом вторую группу инъецировали сразу после окончания динамического сканирования первой группы) 1×10^{10} /г экзосом с получением минимальной радиоактивной дозы 100 мкКи/мышь. Группу 1 инъецировали внутривенно (IV), в то время как группу 2 инъецировали интраперитонеально (IP).

[00314] Мышам выполняли визуализацию с помощью ПЭТ/КТ всего тела в камере на 4 мыши в соответствии со следующим графиком: 1 час динамической (5×60 , 5×180 , 8×300 секунд) и статической визуализации через 4 часа (20 минут), 24 часа (четверг, 20 минут) и 48 часов (пятница, 30 минут). После каждой временной точки визуализации следовала КТ для анатомического референтного значения.

[00315] После последней временной точки визуализации мышей умерщвляли, отбирали, взвешивали и в гамма-счетчике количественно определяли следующие органы: кровь, легкое (одно), печень (доля), селезенка, поджелудочная железа, почка (одна), печень, толстая кишка и дополнительные органы с высоким захватом.

[00316] Органы оставляли разлагаться в течение 2-3 дней, если их количественные показатели было чрезвычайно высокими, а затем определяли количественно повторно.

Таблица 7

Группа (№ и	Индикатор	Путь инъекции	Визуализация	Временные
тип мышей)				точки
				визуализации
				1 ч динамическая
1 (n = 4, SKH-	⁸⁹ Zr-DFO-		ПЭТ/КТ всего тела с	с последующей
1)	экзосомы (100	IV	использованием	статической через
1)	мкКи, <200 мкл)		камеры на 4 мыши	4 ч и 24 ч (20 мин)
				и 48 ч (30 мин)
				1 ч динамическая
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	⁸⁹ Zr-DFO-		ПЭТ/КТ всего тела с	с последующей
·	экзосомы (100	IP	использованием	статической через
1)	мкКи, <200 мкл)		камеры на 4 мыши	4 ч и 24 ч (20 мин)
				и 48 ч (30 мин)

Результаты

[00317] Две когорты обработанных мышей визуализировали через 4 часа, 24 часа и 48 часов после обработки. Визуализация ПЭТ/КТ всего тела показала устойчивую доставку к печени всех мышей в группе 1, обработанных IV (Фиг. 1А), и отчетливое неперекрывающееся распределение для мышей в группе 2, обработанной IP (Фиг. 1В). Органы вскрывали и анализировали с помощью рентгеновского

гамма-счетчика, который выявил значительный захват печенью и селезенкой у мышей, обработанных IV (Фиг. 2). В отличие от этого, у мышей, обработанных IP, захват в основном наблюдали в поджелудочной железе, селезенке, тимусе и лимфатических узлах, при этом дополнительный захват имел место в печени и яичниках. Эти результаты демонстрируют, что разные пути введения приводят к существенно различным профилям биораспределения. Важно отметить, что IP введение приводило к значительному захвату в лимфатических узлах, указывая на то, что IP введение может быть подходящим путем введения для достижения иммунных клеток.

Пример 4: В-клеточная активация с помощью разработанных экзосом с CD40L

[00318] CD40L представляет собой член суперсемейства факторов некроза опухоли (ФНО), в основном экспрессируемых на Т-клетках. Рецептор CD40L, CD40, экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках, в том числе макрофагах, дендритных клетках и В-клетках. Передача сигналов через CD40 приводит к активации В-клеток и вызывает антигенспецифический ответ. Следовательно, активация пути с участием CD40 имеет значение для развития противоопухолевого иммунитета при широком спектре типов опухолей. Чтобы определить, можно ли получать разработанные экзосомы для индукции иммунологического эффекта, экзосомы получали из клеток HEK293SF, трансфицированных плазмидой, содержащей полноразмерный СD40L человека. Трансфицированные клетки подвергали селекции пуромицином и устойчивые клеточные популяции выращивали до высокой плотности. Полученные экзосомы собирали из кондиционированной культуральной среды и очищали над градиентом OptiprepTM, как описано выше. Экзосомы из немодифицированных клеток HEK293SF также выделяли для использования в качестве контроля. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) высевали по 150000 клеток на лунку 96-луночного планшета и инкубировали с очищенными экзосомами с CD40L или нативными экзосомами в течение ночи при 37 °C. Один образец МКПК инкубировали с 1 мкг/мл растворенного рекомбинантного CD40L-Fc в качестве положительного контроля. Как изображено на Фиг. 3А и 3В, экзосомы с CD40L активировали В-клетки дозозависимым образом, как измеряли с помощью экспрессии СD69 в двух различных донорских образцах. Нативные экзосомы не могли приводить к индукции активации В-клеток. Важно отметить, что уровень активации В-клеток экзосомами с CD40L был сопоставим с активацией, вызванной CD40L-Fc.

[00319] Чтобы определить, была ли наблюдаемая опосредованная экзосомами активация В-клеток вызвана прямой активацией В-клеток или посредством транс-действующих иммунных клеток, аналогичный эксперимент проводили с использованием очищенных В-клеток человека. 50000 очищенных В-клеток человека высевали в 96-луночный планшет и инкубировали либо с экзосомами с СD40L, нативными экзосомами, либо с CD40L-Fc. Один образец экзосом с высокой концентрацией CD40L подвергали циклу замораживания-оттаивания (CD40L-EV [F/T]) и также исследовали в отношении активации В-клеток. Как изображено на Фиг.4А и 4В, экзосомы с CD40L активировали очищенные В-клетки от двух доноров в той же самой степени, что и CD40L-Fc. Нативные экзосомы не могли активировать В-клетки, в то время как образцы экзосом с CD40L после замораживания-оттаивания успешно активировали В-клетки, что указывало на то, что действие экзосом с CD40L опосредовано непосредственно через В-клетки и что присутствие CD40L было достаточным для В-клеточной активации. Кроме того, разработанных экзосомы остаются стабильными и активными в течение, по меньшей мере, одного цикла замораживания-оттаивания.

[00320] Для дополнительной проверки экзосом с CD40L использовали репортерную систему для измерения активности разработанных экзосом. Активация пути с участием CD40 приводило к активации NF-кВ. С помощью модифицированной клеточной линии U2OS, разработанной для сверхэкспрессии CD40 на ее поверхности и содержащей репортер люциферазы ниже промотора NF-кВ (Promega Corporation), активацию CD40 подтверждали инкубацией клеток в присутствии агонистического анти-CD40 антитела (BioLegend, Inc.), перекрестно связанного с анти-Fc антителом (Jackson ImmunoResearch, Inc.) или рекомбинантным CD40L человека (ACROBiosystems), перекрестно сшитым с анти-IgG антителом (Jackson ImmunoResearch, Inc.) (Фиг. 5А и 5В). Разработанные экзосомы с CD40L инкубировали с разработанными клетками и это приводило к значительному увеличению активности люциферазы, сопоставимой с эффектами анти-CD40 + анти-Fc. Важно отметить, что сконструированные экзосомы не нуждались в сшивающем антителе, демонстрируя, что CD40L на поверхности экзосом может образовывать функциональные тримеры CD40L, достаточные для активации CD40.

Пример 5: Т-клеточная активация с помощью разработанных экзосом с СD80

[00321] СD80 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках и связывается с CD28 и CTLA-4 на поверхности Т-клеток. Стимуляция CD80 (и CD86) через CD28 и CTLA-4 приводит к активации Т-клеток во время инициации иммунного ответа. Чтобы определить, можно ли разработать экзосомы для активации Т-клеток, CD80-содержащие экзосомы получали путем трансфекции и отбора клеток НЕК293SF, как описано в Примере 4. Для подтверждения активности экзосом с CD80 МКПК человека высевали по 150000 клеток на лунку 96-луночного планшета и инкубировали с (і) очищенными экзосомами с CD80 и анти-CD3 антителом, (іі) нативными экзосомами и анти-CD3 антителом, (ііі) только анти-CD3 антителом или (іv) комбинацией анти-CD28 и анти-CD3 антител. Образцы инкубировали при 37 °C в течение трех дней и анализировали в отношении количества Т-клеток как для CD4⁺ Т-клеток (Фиг. 6A), так и для CD8⁺ Т-клеток (Фиг. 6B). Экзосомы с CD80 активировали Т-клетки дозозависимым образом и в степени, сопоставимой с положительным контролем антител к CD3 и CD28. В отличие от этого, нативные экзосомы не оказывали влияния на пролиферацию Т-клеток.

[00322] Для подтверждения того, что экзосомы с CD80 индуцируют функциональную активацию Т-клеток, уровни ИФНү измеряли с помощью AlphaLISA в МКПК, инкубированных с нативными экзосомами и экзосомами с CD80 с дополнительным анти-CD3-антителом. Как изображено на Фиг. 7А, наблюдали имело место дозозависимое повышение уровней ИФНү в случае экзосом с CD80, но не в случае нативных экзосом. Как изображено на Фиг. 7В, наибольшие концентрации экзосом с CD80 приводили к более высоким уровням ИФНү, чем любое другое условие, в том числе положительный контроль (анти-CD28/анти-CD3). Данные результаты демонстрируют, что экзосомы могут быть разработаны со специфической активностью, которая приводит к активации иммунных клеток.

<u>Пример 6: Продуцирование провоспалительных цитокинов разработанными экзосомами с</u> <u>CD27L и OX40L</u>

[00323] CD27L (CD70) и ОХ40L представляют собой члены суперсемейства ФНО и связываются с родственными рецепторами (CD27 и ОХ40 соответственно) на Т-клетках. CD27L экспрессируется определенными популяциями Т- и В-клеток, в то время как ОХ40L экспрессируется определенными популяциями антигенпрезентирующих клеток. Следовательно, передача сигналов с участием CD27 или ОХ40 имеет значение для иммуноонкологии, в частности, в качестве способа активации анергических Т-

клеток. Чтобы определить, можно ли разработать экзосомы для индукции продуцирования провоспалительных цитокинов в МКПК, CD27L- и OX40L-содержащие экзосомы получали путем трансфекции и отбора клеток HEK293SF, как описано в Примере 4. Для подтверждения активности экзосом с CD27L МКПК человека высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с очищенными экзосомами с CD27L и анти-CD3 антителом, нативными экзосомами и анти-CD3 антителом, только анти-CD3 антителом или комбинацией анти-CD28 и анти-CD3 антител. Образцы инкубировали при 37 С в течение двух дней и анализировали в отношении продуцирования интерферона-гамма (ИФНу) (Фиг. 8А и 8В) и продуцирования ИЛ-2 (Фиг. 9А и 9В) у двух разных доноров. Экзосомы с CD27L индуцировали продукцию ИФНу и ИЛ-2 дозозависимым образом и в степени, сопоставимой с (донор 1) или значительно более высокой, чем (донор 2) положительный контроль антител к CD3 и CD28. В отличие от этого, нативные экзосомы не оказывали влияния на продуцирование ИФНу или ИЛ-2. Аналогично, экзосомы с ОХ40L были достаточными для индукции продуцирования ИФНу и ИЛ-2 у двух различных доноров в аналогичной или большей степени (Фиг. 10А и 10В, а также Фиг. 11А и 11В).

[00324] Для дополнительной проверки экзосом с ОХ40L использовали репортерную систему для измерения активности разработанных экзосом. Активация пути с участием ОХ40 приводило к активации NF-кВ. С помощью модифицированной линии Т-клеток Jurkat, разработанной для сверхэкспрессии ОХ40 на ее поверхности и содержащей репортер люциферазы ниже промотора NF-кВ (Promega Corporation), активацию ОХ40 подтверждали инкубацией клеток в присутствии агонистического анти-ОХ40 антитела (BioLegend), перекрестно связанного с анти-Fc антителом (Jackson ImmunoResearch) или рекомбинантным ОХ40L человека (ACROBiosystems), перекрестно сшитым с анти-IgG антителом (Jackson ImmunoResearch) (Фиг. 12A и 12B). Анти-ОХ40L антитело, перекрестно сшитое с анти-IgG, не приводило к активации репортерных клеток, в то время как рекомбинантный ОХ40L, перекрестно сшитый с анти-Fc, приводил к устойчивой активации репортерного гена (Фиг. 12B). Неожиданным образом разработанные экзосомы с ОХ40L индуцировали экспрессию репортерного гена в большей степени, чем анти-ОХ40-антитело или рекомбинантный ОХ40L (Фиг. 12C). Важно отметить, что сконструированные экзосомы не нуждались в сшивающем антителе, демонстрируя, что ОХ40L на поверхности экзосом может образовывать функциональные тримеры ОХ40L, достаточные для активации ОХ40.

Пример 7: Т-клеточная активация с помощью разработанных экзосом с ИЛ-7

[00325] ИЛ-7 представляет собой цитокин, участвующий в пролиферации В-клеток и Т-клеток, и имеет значение в иммунотерапии. В частности, ИЛ-7 может активировать Т-клетки и индуцировать ответ опухолевого антигена в опухолях, которые слабо инфильтрированы лейкоцитами, или в микроокружении опухоли, которое вызывает анергию Т-клеток. Передача сигналов с участием ИЛ-7 через гетеродимерный рецептор ИЛ-7 индуцирует передачу сигналов с участием интерферона гамма (ИФНү), которая может усиливать ответ опухольспецифического антигена Т-клетками. Чтобы определить, можно ли разработать экзосомы для индукции Т-клеточной активации, экзосомы, содержащие ИЛ-7, получали путем трансфекции и отбора клеток НЕК293SF с использованием плазмиды pDisplay^{тм} (ThermoFisher), кодирующей слияние ИЛ-7 и рецептора PDGF. Разработанные экзосомы очищали, как описано в разделе Способы. Для подтверждения активности экзосом с ИЛ-7 МКПК человека высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с очищенными экзосомами с ИЛ-7 и анти-CD3 антителом, нативными

экзосомами и анти-CD3 антителом, только анти-CD3 антителом или комбинацией анти-CD28 и анти-CD3 антител. Образцы инкубировали при 37 °C в течение двух дней и анализировали в отношении ИФНү (Фиг. 13A и 13B). Экзосомы с ИЛ-7 в комбинации с анти-CD3 антителом индуцировали пиковое продуцирование ИФНү в большей степени, чем только анти-CD3 (Фиг. 13A). Кроме того, экзосомы с ИЛ-7 индуцировали ИФНү дозозависимым образом и в степени, сопоставимой с положительным контролем антител к CD3 и CD28. В отличие от этого, нативные экзосомы не оказывали влияния на продуцирование ИФНү (Фиг. 13B).

[00326] Рецептор ИЛ-7 представляет собой гетеродимерный комплекс, состоящий из ИЛ-7R и ИЛ-2RG, которые образуют тройной комплекс в присутствии ИЛ-7 и индуцируют нисходящую передачу сигналов через путь с участием ЈАК/STAT, что приводит к пролиферации клеток. Синтетический анализ на основе клеток использовали для измерения передачи сигналов с участием ИЛ-7 через рецептор ИЛ-7 для оценки функциональной активности сконструированных экзосом с ИЛ-7 (DiscoverX Corporation) (Фиг. 14A). Рекомбинантный ИЛ-7 человека (рчИЛ-7) был достаточным для усиления передачи сигнала с участием рецептора ИЛ-7 (Фиг. 14B), а разработанные экзосомы с ИЛ-7 были способны индуцировать передачу сигнала с участием рецептора ИЛ-7, в то время как нативные экзосомы не были способны к этому (Фиг. 14C). Указанные данные демонстрируют, что экзосомы, экспрессирующие ИЛ-7, достаточны для индукции передачи сигнала через рецептор ИЛ-7 *in vitro*.

[00327] Для определения того, можно ли воспроизвести эффекты экзосом с ИЛ-7, наблюдаемые in vitro, на модели *in vivo*, экзосомы с ИЛ-7 вводили мышам С57BL/6. Когорту из 20 мышей разделяли на следующие группы: (1) PBS, (2) рекомбинантный ИЛ-7 человека (рчИЛ-7), (3) разработанные экзосомы с ИЛ-7 и (4) немодифицированные нативные экзосомы. Пяти мышам в каждой группе интраперитонеально (IP) вводили 1 мг EdU и либо экзосомы с PBS, $1x10^{11}$ нативных экзосом или экзосомы с ИЛ-7, либо 10мкг рчИЛ-7 один раз в день в течение трех дней. Мышей умерщвляли, селезенки выделяли и измеряли уровни EdU в клетках селезенки с помощью проточной цитометрии. Как изображено на Фиг. 15A, процент положительных CD8+ Т-клеток был значительно увеличен у мышей с экзосомами с ИЛ-7 и мышей с рчИЛ-7 по сравнению с контрольными когортами. Несмотря на то, что количество Т-клеток у мышей с экзосомами с ИЛ-7 было ниже, чем в когорте с рчИЛ-7, по оценкам, количество молекул ИЛ-7, введенных в когорту ИЛ-7, было в пять раз меньше (данные не показаны). Аналогичная тенденция наблюдалась для CD8+ Т-клеток памяти путем измерения уровней маркера памяти CD45RO (Фиг. 15В). [00328] В качестве ортогонального подхода уровни CD71 (рецептор трансферрина) измеряли в клетках селезенки, выделенных от мышей, обработанных экзосомами. СD71 требуется для пролиферации, а уровни CD71 коррелируют с числом Т-клеток. Как изображено на Фиг. 15А и 15В, количества CD8+ Тклеток и CD8+ Т-клеток памяти соответствовали той же тенденции, что и на Фиг. 16А и 16В. В совокупности эти данные демонстрируют, что разработанные экзосомы могут индуцировать специфический эффект иммунных клеток in vivo и что эта активация может быть более сильной в расчете на молекулу по сравнению с рекомбинантными агонистами.

<u>Пример 8: Слияние ИЛ-7 с запатентованными каркасами приводит к усилению</u> специфической активности

[00329] Для усиления активности разработанных экзосом с ИЛ-7 последовательность ИЛ-7 сливали с усеченной частью PTGFRN, нового трансмембранного белка экзосом, который значительно

экспрессируется на поверхности экзосом с HEK293SF. ИЛ-7 экспрессировался в виде трансляционного слияния выше короткого фрагмента PTGFRN, охватывающего область перед самым C-концевым IgVдоменом, трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом PTGFRN, а также меткой FLAG. Серию экспрессионных конструкций получали путем введения серии из четырех аминокислотных делеций между ИЛ-7 и PTGFRN (Фиг. 17A). Полученные конструкции нумеровали от pX-1 до pX-4 (полная последовательность рХ-4 изображена на Фиг. 17В). Как показано с помощью вестерн-блоттинга с использованием анти-ИЛ-7 антитела, конструкции рХ-3 и рХ-4 демонстрировали самые высокие уровни экспрессии. Уровень экспрессии ИЛ-7 в каркасе PTGFRN был значительно выше, чем pDisplay-ИЛ-7, который использовали в Примере 7 (Фиг. 18А). Повышенная экспрессия ИЛ-7 предполагала, что эти новые слитые белки могли индуцировать гораздо более высокий уровень ИЛ-7-опосредованной активации Т-клеток. С целью определения активности слияний PTGFRN-ИЛ-7, осуществляли модель активации Т-клеток in vitro. При ИЛ-7-опосредованной активации Т-клеток уровни рецептора ИЛ-7 (ИЛ-7R) снижаются дозозависимым образом в течение 24 часов (Ghawazi et al., Immunol Cell Biol. 2013 Feb;91(2):149-58). Таким образом, уровни ИЛ-7R отслеживали после инкубации МКПК с различными разработанными экзосомами с ИЛ-7. Как изображено на Фиг. 18В, нативные экзосомы не могли приводить к снижению уровней ИЛ-7R, в то время как экзосомы с pDisplay-ИЛ-7 (ИЛ-7-pD) приводили к снижению уровней ИЛ-7R только при высоких дозах. В отличие от этого, экзосомы PTGFRN-ИЛ-7 (ИЛ-7-рХ3-рХ4) приводили к полному снижению уровней ИЛ-7R при значительно более низких дозах, демонстрируя повышенную активность этих разработанных экзосом. В качестве показателя ІС50, экзосомы с PTGFRN-ИЛ-7 были в 20-76 раз более активными, чем экзосомы с ИЛ-7-рD (Табл. 2), демонстрируя, что увеличение плотности лиганда является достаточным для увеличения биологической активности. Кроме того, эти результаты демонстрируют, что специфические усечения PTGFRN могут представлять собой идеальные каркасы для применения в разработке терапевтических экзосом.

Таблица 8

Экзосомы	pX1	pX2	pX3	pX4	pD
IC50 (п/мл)	4,2E+09	5,4E+09	1,4E+09	1,5E+09	1,1E+11
Кратность					
повышения	25,6	19,8	76,5	71,0	H.o.
активности					

Пример 9: Экзосомы, разработанные с фрагментами анти-СD3 антитела

[00330] Как показано в предыдущих примерах, экзосомы могут быть разработаны для сверхэкспрессии функциональных эндогенных последовательностей иммуномодулирующих белков. С целью определить того, можно ли разрабатывать синтетические агонисты на поверхности экзосом, анти-CD-3-антитела экспрессировали в виде слияний либо с pDisplay, как описано в Примере 4, либо с трансмембранным доменом CD80. МКПК человека высевали в 96-луночный планшет по 100000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи с экзосомами, разработанными для экспрессии анти-CD3 одноцепочечного Fv (scFv) (Фиг. 19А и 19В) или одноцепочечного Fab (scFab) (Фиг. 20А и 20В). В качестве положительного контроля МКПК инкубировали с активатором CD3/CD28 ImmunoCult™ (Stem Cell Тесhnologies) в соответствии с протоколом производителя. В присутствии анти-CD28 костимуляции все разработанные экзосомы индуцировали активацию Т-клеток (Фиг. 19А и 20А) и В-клеток (Фиг. 19В и

20В), сопоставимую с положительным контролем, в то время как контроль с использованием неразработанных экзосомы не приводил к этому. Для измерения эффектов экзосом с анти-CD3 антителами на популяции иммунных клеток, Т-клетки и В-клетки анализировали в отношении положительной пробы в отношении CD69 с помощью проточной цитометрии. Как изображено на Фиг. 21А, МКПК, инкубированные с экзосомами, экспрессирующими анти-CD3 scFv, слитые с трансмембранным доменом CD80, приводили к активации ~40% Т-клеток. Аналогичные эффекты наблюдали в случае активации В-клеток (Фиг. 21В).

[00331] Для определения того, была ли активация Т-клеток, опосредованная экзосомами с анти-CD-3 антителами, вызвана прямой активацией Т-клеток или посредством транс-действующих иммунных клеток, измеряли активацию очищенных Т-клеток. 100000 очищенных Т-клеток человека высевали в 96луночном формате в лунки, которые предварительно покрывали нецелевым антителом или экзосомами с анти-CD3 антителами в присутствии или в отсутствие анти-CD28 антитела, или в лунки, которые инкубировали с экзосомами с растворенными анти-CD3 антителами в присутствии или в отсутствие анти-СD28-антитела. Как изображено на Фиг. 22А, экзосомы как с растворенными, так и нанесенными на планшеты анти-CD3 scFv активировали Т-клетки в присутствии анти-CD28 антитела, как измеряли с помощью экспрессии СD69. Как изображено на Фиг. 22В, анти-CD3-антитело, нанесенное на планшет в присутствии анти-CD28-антитела, активировало Т-клетки в той же степени, что и анти-CD3-scFv, нанесенный на планшет в присутствии анти-CD28-антитела. Неожиданным образом было обнаружено, что несмотря на то, что растворенного анти-CD3-антитела в присутствии анти-CD28-антитела было достаточно для активации ~30% Т-клеток, экзосомы с растворенным анти-CD3-scFv в присутствии анти-СD28-антитела активировали значительно более высокую долю Т-клеток, демонстрируя, что экзосомы, разработанные для сверхэкспрессии фрагмента антитела, могут индуцировать более высокие уровни активации Т-клеток по сравнению с растворенными антителами. В совокупности эти результаты демонстрируют, что экзосомы могут быть разработаны для сверхэкспрессии фрагментов антител с функциональной активностью против определенных типов клеток.

<u>Пример 10: Экзосомы с ИЛ-12-PTGFRN имеют высокую иммуномодулирующую активность in vitro и in vivo.</u>

[00332] ИЛ-12 является высокоэффективным иммуностимулирующим цитокином, продуцируемым антигенпрезентирующими клетками в ответ на инфекцию и другую антигенную стимуляцию. Продуцирование ИЛ-12 активированными дендритными клетками, макрофагами и нейтрофилами индуцирует продуцирование ИФНү как CD8+, так и CD4+ Т-клетками и индуцирует цитотоксические эффекты естественных клеток-киллеров (NK). Комбинированное воздействие секреции ИЛ-12 в микроокружении опухоли приводит к секреции цитокинов Th1, в том числе ИФНү, что приводит к гибели опухолевых клеток, перепрограммированию клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSC) и антиангиогенным эффектам. ИЛ-12-опосредованные противоопухолевые эффекты приводят к длительному Т-клеточному ответу и противоопухолевому иммунитету в многочисленных животных моделях. Ранее ИЛ-12 исследовали в качестве иммунотерапевтического агента у людей, но он вызывал значительную токсичность у пациентов с почечно-клеточной карциномой, несмотря на обнаруживаемую индукцию устойчивого ответа со стороны ИФНү (Leonard *et al.*, Blood. 1997 Oct 1;90(7):2541-8). Таким образом, экзосомы могут представлять собой идеальный способ доставки ИЛ-12 вследствие высокой

локальной концентрации цитокина и предполагаемого сохраненного противоопухолевого фармакологического действия.

[00333] ИЛ-12 состоит из двух доменов, р35 и р40. Димер ИЛ-12 человека кодировали в виде слитого белка либо с полноразмерным PTGFRN (Фиг. 23A, конструкция 871, SEQ ID NO: 3), либо с укороченным фрагментом PTGFRN, который обеспечивает поверхностное отображение с высокой плотностью (Фиг. 23B, конструкция 873, SEQ ID NO: 5), и указанные конструкции стабильно экспрессировали в клетках НЕК293SF. Стабильные клеточные линии выращивали в химически определенных средах, а экзосомы из культурального супернатанта очищали над градиентом $Optiprep^{TM}$, как описано в разделе Способы. Количество белка ИЛ-12 на поверхности экзосом измеряли с помощью ИФА и сопоставляли концентрацию с гИЛ-12 для всех функциональных исследований. Очищенные экзосомы с полноразмерным и коротким hИЛ-12-PTGFRN или рекомбинантный hИЛ-12 (рчИЛ-12; BioLegend, № по каталогу 573004) титровали в МКПК человека в присутствии субоптимальной концентрации анти-CD3антитела для индукции экспрессии ИФНу. рчИЛ-12 приводил к устойчивой экспрессии ИФНу при ЕС50 0.029 нг/мл, что было сопоставимо с полноразмерным ИЛ12-PTGFRN, оба из которых были в $\sim \! 10^{-5}$ более эффективными, чем ИЛ12-short-PTGFRN (Фиг. 24A-В). Эти результаты предполагают, что ИЛ-12, отображаемый на каркасе полноразмерного PTGFRN, может быть более иммуномодулирующим реагентом, чем конструкция короткого PTGFRN.

[00334] Белки ИЛ-12 мыши и человека не вступают в перекрестную реакцию, и данные *in vitro*, показанные на Фиг. 24, позволяют предположить, что тил-12, слитый с полноразмерным PTGFRN, будет более эффективным, чем использование короткого каркаса PTGFRN. Чтобы определить эффективность экзосом с тил-12-PTGFRN в модели рака *in vivo*, мышам C57BL/6 подкожно имплантировали 1 × 10⁶ клеток B16F10 меланомы мыши (n = 5 мышей на группу). В дни 5, 6 и 7 после инокуляции опухоли животным внутриопухолево вводили PBS, 0,2 мкг рекомбинантного ИЛ-12 мыши (тил-12; BioLegend, № по каталогу 577004) или 1х10¹¹ экзосом, оторбражающих полноразмерный ИЛ-12-PTGFRN (экзосомы с тил-12; SEQ ID NO: 4). Животных умершвляли, как только объем опухоли достигал 2000 мм³. Как показано на Фиг. 25-27, опухоли в группе PBS быстро росли, в то время как опухоли в группах гтил-12 и тил-12-Ехо резко уменьшались (уменьшение объема на ~ 65-80%). Важно отметить, что к дню 16 опухоли в группе тил-12-Ехо были меньше, чем опухоли в группе ттил-12, демонстрируя более высокую эффективность ИЛ-12 при отображении на поверхности экзосом по сравнению с растворенным цитокином. Также имело место преимущество в выживаемости в случае групп, обработанным ИЛ-12, по сравнению с группами, обработанными РВS (Фиг. 28).

[00335] Для понимания механистического преимущества экзосом с ИЛ-12-РТGFRN по сравнению с гтиИЛ-12, экспрессию гена Th1 профилировали в опухолях контрольной и обработанной групп. Все из ИФНү (Фиг. 29А), Т-клеточных хемоаттрактантов СХСL9 (Фиг. 29В) и СХСL10 (Фиг. 29С) и ТGFβ (Фиг. 29D) были повышены в группах, обработанных ИЛ-12, по сравнению с контрольной группой. В большинстве случаев сигналы цитокинов были выше у животных, обработанных тиИЛ-12-Ехо, по сравнению с гтиИЛ-12. Уровни ИФНү в CD8+ Т-клетках селезенки измеряли с помощью проточной цитометрии, и мыши, обработанные Ехо-тиИЛ-12, демонстрировали значительно более высокий сигнал, чем либо группа PBS, либо группа гтиИЛ-12 (Фиг. 30). В совокупности эти данные демонстрируют, что ИЛ-12, отображаемый на поверхности экзосомы, представляет собой новую и эффективную иммуномодулирующую стратегию, которая способствует устойчивой активации Т-клеток *in vitro* и может

быть использована для индукции сильных противоопухолевых эффектов в агрессивной модели меланомы мыши *in vivo*. В механистическом отношении экзосомы с ИЛ-12 демонстрируют превосходство по сравнению с гИЛ-12 и, таким образом, представляют новый, дифференцированный терапевтический способ в иммунотерапии рака.

Пример 11: Экзосомы, отображающие интерферон гамма, представляют собой эффективные активаторы иммунных клеток

[00336] Интерферон гамма (ИФНү) представляет собой цитокин, участвующий в примировании врожденных и адаптивных иммунных реакций. Он экспрессируется различными типами клеток в ответ на многочисленные сигналы, в том числе ИЛ-12, и достаточен для активации NK-клеток, запуска презентации антигена в антигенпрезентирующих клетках и стимулирования активации и инвазии лейкоцитов. ИФНу естественным образом экспрессируется как гомодимер и секретируется как растворенный фактор. Экзосомы, экспрессирующие ИФНу, получали путем стабильной трансфекции клеток HEK293SF полноразмерным PTGFRN, слитым с мономерным или димерным ИФНу человека и мыши (Фиг. 31А и 31В соответственно). Экзосомы из суспензионных клеточных культур очищали, как описано выше, и анализировали с помощью PAGE. Мономерные (m) и тандемные димерные (td) экзосомы с PTGFRN и ИФНу экспрессировали при прогнозируемых молекулярных массах (стрелки) при сопоставимых уровнях (Фиг. 32). Очищенные экзосомы анализировали с помощью ИФА и сравнивали со стандартной кривой с использованием рекомбинантного ИФНу (Biolegend, № по каталогу 570206) для расчета количества молекул ИФНу на экзосому. Результаты в Табл. 9 показывают количество молекул ИФНу в каждом из четырех типов очищенных экзосом. Примечательно, что экзосомы с тандемным димером ИФНу PTGFRN содержали по меньшей мере вдвое больше молекул ИФНу, чем экзосомы с мономером ИФНү PTGFRN, что позволяет предположить, что экзосомы с тандемными димерами соответствующим образом экспрессируют димерные конструкции ИФНу.

Таблица 9

Конструкция	Молекул ИФН γ/экзосома
h-mИФНу-PTGFRN	53
h-tdИФНү-PTGFRN	173
m-mИФНγ-PTGFRN	47
m-tdИФНү-PTGFRN	113

[00337] Экзосомы с мономерными и тандемными димерными PTGFRN-ИФНү человека инкубировали с МКПК человека в течение 24 часов при возрастающих концентрациях. Активацию моноцитов измеряли с помощью экспрессии PD-L1, нисходящего поверхностного белка, индуцированного передачей сигналов с участием ИФНү. Как изображено на Фиг. 33, нативные экзосомы с HEK293SF (ДТ) были не способны индуцировать экспрессию PD-L1, в то время как экзосомы как мономерным, так и тандемным димерным ИФНү PTGFRN индуцировали PD-L1 дозозависимым образом, с большей активацией экзосомами с тандемным димером ИФНү PTGFRN. Опосредованная экзосомами активация PD-L1 была сопоставима с индуцированной LPS активацией (Фиг. 33). Эти данные показывают, что растворенный цитокин в мономерном или димерном формате может функционально экспрессироваться на поверхности экзосомы и вызывать активацию иммунных клеток. Применение экзосом, экспрессирующих ИФНү, в

иммуноонкологии может быть пригодным для индукции ответов NK- и T-клеток против опухолевых клеток.

Пример 12: Экзосомы, экспрессирующие ИЛ-15, индуцируют активацию NK-клеток

[00338] Интерлейкин 15 (ИЛ-15) представляет собой цитокин, продуцируемый мононуклеарными клетками после патогенной инфекции. ИЛ-15 может секретироваться в виде растворенного белка или презентироваться в виде димерного заякоренного в мембрану белка, связанного с ИЛ-15Ra. ИЛ-15 активирует NK-клетки и T-клетки и используется в качестве потенциальной терапевтической молекулы в иммуноонкологии и других видах иммунного вмешательства. Экзосомы, экспрессирующие ИЛ-15, получали путем стабильной трансфекции клеток HEK293SF экспрессионными плазмидами, кодирующими трансмембранный домен PDGFR (pDisplay), слитый со слитыми белками ИЛ-15/ИЛ-15Ra (Фиг. 34). Экзосомы очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности OptiprepTM, как описано в приведенном выше разделе Способы. Очищенные экзосомы инкубировали с МКПК человека в течение 24 часов, и активацию NK-клеток измеряли в виде процента, положительного в отношении CD69, с помощью проточной цитометрии. Ни одна из экзосом с pDisplay ИЛ-15 не индуцировала активацию NKклеток в дозах до 10⁵ экзосом на клетку культуры МКПК (Фиг. 35; номер экзосомной конструкции, как на Фиг. 34). Для исследования того, необходимо ли отображение ИЛ-15 с более высокой плотностью для индукции активации NK-клеток, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали экспрессионной плазмидой, кодирующей ИЛ-15, слитый с полноразмерным PTGFRN. Кроме того, клетки HEK293SF стабильно трансфицировали экспрессионной плазмидой, кодирующей более эффективный ИЛ-15, слитый с полноразмерным PTGFRN (ИЛ-15 N72D, как описано в J Immunol. 2009 Sep 15;183(6):3598-607; Фиг. 36A). Экспрессию подтверждали с помощью вестерн-блоттинга анти-PTGFRN (Фиг. 36B). Уровни ИЛ-15 определяли количественно с помощью ИФА (R&D Systems, № по каталогу D1500), нормировали на рекомбинантный ИЛ-15 (Biolegend, № по каталогу 570302). Экзосомы с ИЛ-15 PTGFGN добавляли к двум независимым культурам МКПК в течение ночи и сравнивали с рекомбинантным ИЛ-15 в сопоставимой концентрации. Все три источника ИЛ-15 индуцировали активацию NK-клеток в МКПК дозозависимым образом, измеряемую с помощью процента NK-клеток, положительных в отношении СD69. Кроме того, все конструкции были сопоставимы друг с другом у обоих доноров, демонстрируя значительную сопоставимую эффективность (Фиг. 37; количество экзосомных конструкций, как на Фиг. 36). Эти данные демонстрируют, что ИЛ-15 может активно и эффективно отображаться на поверхности экзосом, но для этого требуются высокие уровни экспрессии, такие как те, которые обеспечиваются PTGFRN.

<u>Пример 13: Экзосомы, отображающие фрагменты анти-CD-3 антитела на каркасе PTGFRN, активируют Т-клетки</u>

[00339] Результаты в Примере 9 демонстрируют, что экзосомы, содержащие фрагменты анти-CD3-антитела, могут активировать Т-клетки. Для того, чтобы определить, поддерживает ли каркас PTGFRN эту активность, фрагменты анти-CD3 антител (варианты OKT3) сливали с трансмембранным участком PDGFR (exoCD3-PD), полноразмерным PTGFRN (exoCD3-long) или фрагментом PTGFRN (exoCD3-short) и стабильно экспрессировали в клетках HEK293SF (Фиг. 38). Связывание экзосом подтверждали с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием Octet® RED96 (Pall). Фрагмент CD3 связывали с зондом BLI (Фиг. 39, ii), промывали (Фиг. 39, iii) и добавляли экзосомные конструкции (Фиг.

39, iv). Экзосомы из клеток HEK293SF ДТ не связывали зонд BLI, в то время как все разработанные конструкции осуществляли это. Оба фрагмента PTGFRN связывались с зондом с большей аффинностью и оставались стабильно связанными (Фиг. 39, v). Экзосомы с отображением анти-CD3 исследовали в отношении активности *in vitro*. Активацию Т-клеток измеряли с помощью положительной пробы CD69 на CD4+ Т-клетках, измеряемой с помощью проточной цитометрии. В отличие от немодифицированных нативных экзосом (exoNative), экзосомы с анти-CD3, слитым с фрагментом PTGFRN (exoCD3-short), были эффективны в активации CD4+ Т-клеток *in vitro* (Фиг. 40).

<u>Пример 14: Экзосомы, отображающие CD40L, представляют собой эффективные активаторы В-клеток</u>

[00340] Лиганд СD40 (CD40L) представляет собой лиганд суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF), который связывается с костимулирующим рецептором CD40, который значительно экспрессируется на В-клетках и других антигенпрезентирующих клетках. Клеточная активация, опосредованная лигандом TNFSF, требует образования тримерных лигандных комплексов, которые образуются на поверхности клетки и связываются с когнатными рецепторами. Для изучения того, были ли экзосомы, отображающие различные конформации CD40L на своей поверхности, достаточными для активации В-клеток, разрабатывали более 40 различных экспрессионных конструкций с CD40L, которые индивидуально трансфицировали в клетки HEK293SF. CD40L экспрессировали в виде слияния с трансмембранным доменом PDGFR, полноразмерным PTGFRN и коротким однодоменным фрагментом РТGFRN (Фиг. 41A, внизу). Слияния CD40L-GFP PTGFRN выражали в виде мономера (от pCB-518 до рСВ-526) или в виде вынужденного тримера (рСВ-607 и рСВ-527) (Фиг. 41А, внизу). Чтобы способствовать тримеризации мономерного CD40L, конструировали конструкции, экспрессировали слияние с доменами мультимеризации от TRAF2 (от pCB-521 до pCB-523) или коллагена XV (от pCB-524 до pCB-526). Среди мономерных конструкций CD40L pCB-518/521/524 содержала полноразмерные N-концевые стволовые последовательности из эндогенного CD40L; рСВ-519/522/525 содержала усеченную N-концевую стволовую последовательность из эндогенного CD40L; и рСВ-520/523/526 содержала только растворенную часть СD40L. Каждую из популяций разработанных экзосом инкубировали с очищенными В-клетками, выделенными из периферической крови человека, с использованием коктейля RosetteSep[™] для обогащения В-клеток человека (Stemcell Technologies, № 15064), и активацию В-клеток измеряли по положительной пробе СD69 на В-клетках с помощью проточной цитометрии. ЕС50 для каждой из конструкций рассчитывали как функцию концентрации частиц в клеточной культуре и наносили на график, показанный на Фиг. 41, сверху. Интересно отметить, что все мономерные конструкции CD40L обладали незначительной эффективностью, в то время как тримерные конструкции были по меньшей мере в десять раз более эффективными, чем мономеры (Фиг. 41, сверху). Эти результаты демонстрируют, что мономерный CD40L представляет собой слабый активатор В-клеток, когда он представлен на поверхности экзосом, однако вынужденный тримерный CD40L может индуцировать устойчивую активацию В-клеток. Кроме того, было показано, что PTGFRN образует димерные структуры (PCT/US2018/048026), указывая на то, что на поверхности экзосомы могут образовываться мультимерные структуры более высокого порядка для дальнейшего стимулирования взаимодействия с мишенью и активации иммунных клеток.

[00341] Во всех результатах, изображенных на Фиг. 41, использовали экзосомы, содержащие люминальный GFP, слитый с C-концом PTGFRN. С целью получения экзосомы с CD40L без метки ту же самую тримерную конструкцию с CD40L-PTGFRN, что и ведущая конструкция с pCB-527, но без С-концевого GFP, стабильно экспрессировали в клетках HEK293SF (pCB-766). Абсолютную концентрацию CD40L на поверхности разработанных экзосом оценивали количественно с помощью ИФА (R&D Systems, № по каталогу, DCDL40), как показано в Табл. 10 ниже.

Таблица 10

EC50	рСВ-0766	pCB-0527	pчCD40L
Частиц/мл	6,63E+08	4,53E+08	Н.о.
нг/мл	1,68	1,89	28,51

[00342] Очищенные экзосомы с CD40L-PTGFRN исследовали в анализах активации В-клеток, как описано выше, по сравнению с рекомбинантным CD40L человека в сопоставимой концентрации (Biolegend, № по каталогу 591702). Экзосомы с CD40L, содержащие GFP и не содержащие меток, были сопоставимыми активаторами В-клеток при измерении в виде функции числа частиц или концентрации CD40L (Фиг. 42A), и оба препарата экзосом были более эффективными, чем CD40L в сопоставимой концентрации (Фиг. 42B). Нативные, не разработанные экзосомы из клеток HEK293SF не смогли активировать В-клетки, демонстрируя, что разработанные тримерные конструкции с CD40L на поверхности экзосомы были достаточными для сильной активации В-клеток.

[00343] Альтернативный способ агонизации CD40 и активации В-клеток заключается в использовании агонистического антитела, перекрестно сшитого с вторичным антителом. Для сравнения эффективности тримерных экзосом, экспрессирующих CD40L, с агонистическим антителом к CD40L, культуры МКПК инкубировали с 2 мкг/мл анти-CD40L антитела (Biolegend®; клон 5С3) с вторичным перекрестно сшитым антителом (JacksonImmuno Research, № по каталогу 115-006-071). Максимальная активация В-клеток показана пунктирной линией на Фиг. 43А и 43В. Экзосомы с рСВ-527 (РТGFRN-тримерный CD40L-GFP) индуцировали более высокую максимальную активацию В-клеток, чем перекрестно сшитое агонистическое антитело в пулах двух независимых доноров МКПК (Фиг. 43А и 43В), демонстрируя превосходство тримерных экзосом с CD40L в активации иммунных клеток.

<u>Пример 15: Одновременное отображение нескольких иммуноонкологических молекул на</u> отдельных экзосомах

[00344] Предыдущие примеры демонстрируют, что отдельные иммуномодулирующие белки могут отображаться на поверхности экзосомы и индуцировать функциональные изменения в одном или нескольких типах иммунных клеток. При определенных путях применения может потребоваться использование комбинаторно разработанных экзосом, т.е., экзосом, содержащих более одной молекулы на поверхности экзосомы, каждая из которых способна сигнализировать отдельный путь иммунных клеток. Клетки HEK293SF стабильно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей слитые белки PTGFRN-IL-12 и PTGFRN-CD40L. Экзосомы выделяли и очищали, как описано выше. Экзосомы из немодифицированных клеток HEK293SF использовали в качестве отрицательных контролей.

[00345] Для демонстрации одновременной загрузки различных лигандов, разрабатывали анализ совместного окрашивания.

РЕАГЕНТЫ:

Dynabeads (реагент для выделения /детекции с помощью стрептавидина экзосом Thermofisher, № по каталогу 10608D): 1×10^7 гранул/мл, 50% суспензия

Буфер для выделения: 0,5% BSA/PBS (1:4 из 2% BSA)

Буфер для блокирования: 2% BSA/PBS (1 гр/50 мл, фильтр)

- Промыть 0,5 мл гранул с 0,5 мл буфера для выделения и ресуспендировать в 0,5 мл буфера для выделения.
- Добавить 1 мкг биотинилированного захватывающего антитела (2,2 мкл 0,5 мкг/мкл рабочего раствора).
- 1 ч вращения, КТ.
- Промыть 500 мкл буфера для выделения.
- Ресуспендировать в 500 мкл раствора для блокирования, 10 мин вращения, КТ.
- Инкубировать в 500 мкл буфера для выделения (1×10^7 гранул/мл, 50% суспензия).
- Хранить при 4 °C.

А. Захват и прохождение экзосом

 1×10^5 гранул на образец (10 мкл гранул, 20 мкл суспензии).

50000 экзосом на гранулу; 5×10^9 экзосом на образец ($1,2 \times 10^9$ экзосом/мл рабочего раствора).

5 мкл каждого флуоресцентно меченого антитела для детекции для прохождения.

Смешать 5×10^9 экзосом + 20 мкл суспензии Dynabeads + 0,7 мл 0,1% BSA/PBS.

ПРОЦЕДУРА:

- 1. 120 мкл гранул суспензии, удалить супернатант, добавить 0,7 мл буфера для блокирования, смешать, центрифугировать 10 мин, КТ, удалить супернатант.
- 2. Суспендировать гранулы в 0,7 мл буфедра для выделения +25,2 мкл экзосом, центрифугировать при 4 °C.
- 3. Следующий день: быстро центрифугировать экзосомы и гранулы, 5 сек.
- 4. Поместить пробирку на магнит, удалить супернатант.
- 5. Блокировать в 700 мкл, центрифугировать 10 мин., КТ.
- 6. Поместить пробирку на магнит, удалить супернатант.
- 7. Ресуспендировать в 600 мкл буфера для выделения: 6×100 мкл на пробирку.
- 8. Добавить 1 мкл меченого антитела для детекции, смешать, инкубировать 30 мин. при минимум 4 °C в темноте.
- 9. Центрифугировать 2 мин. при 500 g, удалить супернатант.
- 10. Промыть 2× буфера для выделения.
- 11. Ресуспендировать в 200 мкл буфера для выделения, пропустить поток.

[00346] Нативные экзосомы выделяли с помощью гранул, несущих анти-CD40L, и метили флуоресцентными антителами против ИЛ-12 и CD40L (Фиг. 44A) или CD81, маркера экзосом, присутствующего на нативных и разработанных экзосомах, и CD40L (Фиг. 44B). Гранулы с CD40L не приводили к уменьшению ни одной из нативных экзосом, поскольку флуоресцентный сигнал не

обнаруживали для ИЛ-12, CD40L или CD81. В отличие от этого, двойные разработанные экзосомы с PTGFRN-CD40L/IL-12 инкубировали с гранулами с анти-CD40L и выделяли, как указано выше. Все из окрашивания в отношении CD81 (Фиг. 45А), ИЛ-12 или CD40L (Фиг. 45В) обнаруживали с помощью разработанных экзосом (более 97% подсчитанных гранул), что указывает на то, что опосредованное CD40L выделение также могло приводить к выделению экзосомы с ИЛ-12. Аналогичным образом, гранулы, несущие анти-ИЛ-12, инкубировали с разработанными экзосомами с ИЛ-12/CD40L и окрашивали в отношении ИЛ-12, CD40L и CD81. Более 98% всех гранул были положительными как в отношении CD40L, так и в отношении ИЛ-12 или в отношении CD81 (Фиг. 46А и 46В), демонстрируя, что экзосомы содержали как ИЛ-12, так и CD40L на своей поверхности.

[00347] Концентрацию ИЛ-12 и CD40L количественно оценивали с помощью ИФА (Abcam, № по каталогу ab119517) для исследования разработанных экзосом в отношении эффективности in vitro. Равные концентрации рекомбинантного ИЛ-12, рекомбинантного ИЛ-12, смешанного с рекомбинантным CD40L, экзосом с PTGFRN-ИЛ-12, двойных положительных экзосом с PTGFRN-CD40L/ИЛ-12 или смеси экзосом с PTGFRN-ИЛ-12 и PTGFRN-CD40L добавляли в МКПК человека при возрастающих концентрациях (рчИЛ-12, BioLegend, № по каталогу 573004; рчСD40L, Biolegend, № по каталогу 591702). Клетки костимулировали анти-CD3 антителом, и измеряли продуцирование ИФНγ (PerkinElmer, № по каталогу AL217C). Как изображено на Фиг.47A и 47B, все препараты экзосом, содержащие ИЛ-12, вызывали ответ ИФНу, сопоставимый с рекомбинантными цитокинами. Расчет ЕС50 для различных условий показал, что ИЛ-12, ассоциированный с экзосомой, был более эффективным, чем сопоставимый по концентрации ИЛ-12, независимо от того, экспрессировался он в отдельности или комбинаторно на поверхности экзосомы (Фиг. 48). Аналогичные результаты получали с использованием рекомбинантного CD40L и одно- или двухсоставных разрабоатнных экзосом с CD40L в контексте активации В-клеток (Фиг. 49A и В). Кроме того, разработанные экзосомы с CD40L были более эффективными, чем растворенный рекомбинантный цитокин, и в этом случае двухсоставные разработанные экзосомы были наиболее эффективной конструкцией, исследованной в указанном анализе (Фиг. 50).

[00348] Для дальнейшего изучения возможности использования экзосом с комбинаторным отображением поверхности клетки HEK293SF стабильно трансфицировали тремя независимыми конструкциями, экспрессирующими слитые белки PTGFRN-ИЛ-12, PTGFRN-CD40L или PTGFRN-FLT3L. Экзосомы очищали и выделяли с помощью способов с использованием аффинных гранул, как описано выше, но их также исследовали в отношении наличия поверхностного FLT3L с использованием антитела, коньюгированного с FLT3L-PE. Экзосомы, выделенные с помощью анти-IL-12 гранул, были дважды положительными в отношении ИЛ-12 и CD40L (Фиг. 51A), ИЛ-12 и FLT3L (Фиг. 51B), а также CD40L и FLT3L (Фиг. 51C). Экзосомы, выделенные с помощью анти-CD40L гранул, были дважды положительными в отношении ИЛ-12 и CD40L (Фиг. 52A), ИЛ-12 и FLT3L (Фиг. 52B), а также CD40L и FLT3L (Фиг. 52C), подтверждая, что отдельные экзосомы экспрессировали каждый из трех иммуномодулирующих лигандов. Указанные результаты демонстрируют, что многосоставные разработанные иммуномодулирующие экзосомы являются возможным терапевтическим способом, и что они сопоставимы или более эффективны, чем растворенные цитокины, в активации иммунных клеток.

[00349] Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было описано более подробно с помощью иллюстрации и примера для ясности понимания, специалистам в данной области техники очевидно, что в свете идей данного раскрытия в него могут быть внесены определенные изменения и модификации, не отклоняясь от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

Соответственно, предшествующее лишь иллюстрирует принципы данного изобретения. [00350] Необходимо понимать, что специалисты в данной области техники смогут разработать различные устройства, которые, хотя и не описаны и не показаны в данном документе явно, воплощают принципы данного изобретения и включены в его сущность и объем. Кроме того, все примеры и условные формулировки, приведенные в данном документе, в основном предназначены для того, чтобы облегчить читающему понимание принципов данного изобретения, не ограничиваясь такими конкретно перечисленными примерами и условиями. Кроме того, все утверждения данного документе, в которых приводятся принципы, аспекты и варианты осуществления данного изобретения, а также его конкретные примеры, предназначены для охвата как его структурных, так и функциональных эквивалентов. Помимо того, предполагается, что такие эквиваленты включают в себя как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, разработанные в будущем, т.е., любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию, независимо от структуры. Следовательно, объем данного изобретения не предназначен для ограничения иллюстративными вариантами осуществления, показанными и описанными в данном документе. Предпочтительно, объем и сущность данного изобретения воплощены в прилагаемой формуле изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

>SEQ ID NO: 1

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSGPIFN ASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRD WKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAF KYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRLMSMEMD

>SEQ ID NO: 2

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSAGGGGSGGGGGGFIFNASVHSDTPS VIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLER VSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGL STVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVOETRRERRLMSMEMD

>hIL-12-PTGFRN; 871 (SEQ ID NO: 3)

MCHQQLVISW FSLVFLASPL VAIWELKKDV YVVELDWYPD APGEMVVLTC
DTPEEDGITW TLDQSSEVLG SGKTLTIQVK EFGDAGQYTC HKGGEVLSHS
LLLLHKKEDG IWSTDILKDQ KEPKNKTFLR CEAKNYSGRF TCWWLTTIST
DLTFSVKSSR GSSDPQGVTC GAATLSAERV RGDNKEYEYS VECQEDSACP
AAEESLPIEV MVDAVHKLKY ENYTSSFFIR DIIKPDPPKN LQLKPLKNSR
QVEVSWEYPD TWSTPHSYFS LTFCVQVQGK SKREKKDRVF TDKTSATVIC
RKNASISVRA QDRYYSSSWS EWASVPCSGG SGGGSGGGS GGGSGGGSG
GRNLPVATPD PGMFPCLHHS QNLLRAVSNM LQKARQTLEF YPCTSEEIDH
EDITKDKTST VEACLPLELT KNESCLNSRE TSFITNGSCL ASRKTSFMMA
LCLSSIYEDL KMYQVEFKTM NAKLLMDPKR QIFLDQNMLA VIDELMQALN
FNSETVPQKS SLEEPDFYKT KIKLCILLHA FRIRAVTIDR VMSYLNASSA

GGGGGGGG RVVRVPTATL VRVVGTELVI PCNVSDYDGP SEQNFDWSFS SLGSSFVELA STWEVGFPAQ LYQERLQRGE ILLRRTANDA VELHIKNVQP SDQGHYKCST PSTDATVQGN YEDTVQVKVL ADSLHVGPSA RPPPSLSLRE GEPFELRCTA ASASPLHTHL ALLWEVHRGP ARRSVLALTH EGRFHPGLGY EQRYHSGDVR LDTVGSDAYR LSVSRALSAD QGSYRCIVSE WIAEQGNWQE IQEKAVEVAT VVIQPSVLRA AVPKNVSVAE GKELDLTCNI TTDRADDVRP EVTWSFSRMP DSTLPGSRVL ARLDRDSLVH SSPHVALSHV DARSYHLLVR DVSKENSGYY YCHVSLWAPG HNRSWHKVAE AVSSPAGVGV TWLEPDYQVY LNASKVPGFA DDPTELACRV VDTKSGEANV RFTVSWYYRM NRRSDNVVTS ELLAVMDGDW TLKYGERSKQ RAQDGDFIFS KEHTDTFNFR IQRTTEEDRG NYYCVVSAWT KORNNSWVKS KDVFSKPVNI FWALEDSVLV VKAROPKPFF AAGNTFEMTC KVSSKNIKSP RYSVLIMAEK PVGDLSSPNE TKYIISLDQD SVVKLENWTD ASRVDGVVLE KVQEDEFRYR MYQTQVSDAG LYRCMVTAWS PVRGSLWREA ATSLSNPIEI DFQTSGPIFN ASVHSDTPSV IRGDLIKLFC IITVEGAALD PDDMAFDVSW FAVHSFGLDK APVLLSSLDR KGIVTTSRRD WKSDLSLERV SVLEFLLQVH GSEDQDFGNY YCSVTPWVKS PTGSWQKEAE IHSKPVFITV KMDVLNAFKY PLLIGVGLST VIGLLSCLIG YCSSHWCCKK **EVQETRRERR RLMSMEMD***

>mIL-12-PTGFRN; 872 (SEQ ID NO: 4)

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD APGETVNLTC DTPEEDDITW TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS HLLLHKKENG IWSTEILKNF KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK FNIKSSSSSP DSRAVTCGMA SLSAEKVTLD QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNKYEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ MKPLKNSQVE VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRKKEK MKETEEGCNQ KGAFLVEKTS TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRSGGSGG GSGGGSGGG GSGGSGGRV IPVSGPARCL SOSRNLLKTT DDMVKTAREK LKHYSCTAED IDHEDITRDQ TSTLKTCLPL ELHKNESCLA TRETSSTTRG SCLPPQKTSL MMTLCLGSIY EDLKMYQTEF QAINAALQNH NHQQIILDKG MLVAIDELMQ SLNHNGETLR OKPPVGEADP YRVKMKLCIL LHAFSTRVVT INRVMGYLSS ASAGGGGGGGGGRVVRVPT ATLVRVVGTE LVIPCNVSDY DGPSEONFDW SFSSLGSSFV ELASTWEVGF PAQLYQERLQ RGEILLRRTA NDAVELHIKN VQPSDQGHYK CSTPSTDATV QGNYEDTVQV KVLADSLHVG PSARPPPSLS LREGEPFELR CTAASASPLH THLALLWEVH RGPARRSVLA LTHEGRFHPG LGYEQRYHSG DVRLDTVGSD AYRLSVSRAL SADQGSYRCI VSEWIAEQGN WQEIQEKAVE VATVVIQPSV LRAAVPKNVS VAEGKELDLT CNITTDRADD VRPEVTWSFS RMPDSTLPGS RVLARLDRDS LVHSSPHVAL SHVDARSYHL LVRDVSKENS GYYYCHVSLW APGHNRSWHK VAEAVSSPAG VGVTWLEPDY OVYLNASKVP GFADDPTELA CRVVDTKSGE ANVRFTVSWY YRMNRRSDNV VTSELLAVMD GDWTLKYGER SKQRAQDGDF IFSKEHTDTF NFRIQRTTEE

DRGNYYCVVS AWTKQRNNSW VKSKDVFSKP VNIFWALEDS VLVVKARQPK
PFFAAGNTFE MTCKVSSKNI KSPRYSVLIM AEKPVGDLSS PNETKYIISL
DQDSVVKLEN WTDASRVDGV VLEKVQEDEF RYRMYQTQVS DAGLYRCMVT
AWSPVRGSLW REAATSLSNP IEIDFQTSGP IFNASVHSDT PSVIRGDLIK
LFCIITVEGA ALDPDDMAFD VSWFAVHSFG LDKAPVLLSS LDRKGIVTTS
RRDWKSDLSL ERVSVLEFLL QVHGSEDQDF GNYYCSVTPW VKSPTGSWQK
EAEIHSKPVF ITVKMDVLNA FKYPLLIGVG LSTVIGLLSC LIGYCSSHWC
CKKEVQETRR ERRRLMSMEM D*

>hIL-12-short PTGFRN; 873 (SEQ ID NO: 5)

MCHQQLVISW FSLVFLASPL VAIWELKKDV YVVELDWYPD APGEMVVLTC DTPEEDGITW TLDQSSEVLG SGKTLTIQVK EFGDAGQYTC HKGGEVLSHS LLLLHKKEDG IWSTDILKDQ KEPKNKTFLR CEAKNYSGRF TCWWLTTIST DLTFSVKSSR GSSDPQGVTC GAATLSAERV RGDNKEYEYS VECQEDSACP AAEESLPIEV MVDAVHKLKY ENYTSSFFIR DIIKPDPPKN LQLKPLKNSR QVEVSWEYPD TWSTPHSYFS LTFCVQVQGK SKREKKDRVF TDKTSATVIC RKNASISVRA QDRYYSSSWS EWASVPCSGG SGGGSGGGGS GGGGSGGGSG GRNLPVATPD PGMFPCLHHS QNLLRAVSNM LQKARQTLEF YPCTSEEIDH EDITKDKTST VEACLPLELT KNESCLNSRE TSFITNGSCL ASRKTSFMMA LCLSSIYEDL KMYQVEFKTM NAKLLMDPKR QIFLDQNMLA VIDELMQALN FNSETVPOKS SLEEPDFYKT KIKLCILLHA FRIRAVTIDR VMSYLNASSA GGGGGGGG GPIFNASVHS DTPSVIRGDL IKLFCIITVE GAALDPDDMA FDVSWFAVHS FGLDKAPVLL SSLDRKGIVT TSRRDWKSDL SLERVSVLEF LLQVHGSEDQ DFGNYYCSVT PWVKSPTGSW QKEAEIHSKP VFITVKMDVL NAFKYPLLIG VGLSTVIGLL SCLIGYCSSH WCCKKEVQET RRERRRLMSM EMD*

>mIL-12-short PTGFRN; 874 (SEQ ID NO: 6)

MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD APGETVNLTC
DTPEEDDITW TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS
HLLLHKKENG IWSTEILKNF KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK
FNIKSSSSSP DSRAVTCGMA SLSAEKVTLD QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA
EETLPIELAL EARQQNKYEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ MKPLKNSQVE
VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRKKEK MKETEEGCNQ KGAFLVEKTS
TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRSGGSGG GSGGGSGGG
GSGGGSGGRV IPVSGPARCL SQSRNLLKTT DDMVKTAREK LKHYSCTAED
IDHEDITRDQ TSTLKTCLPL ELHKNESCLA TRETSSTTRG SCLPPQKTSL
MMTLCLGSIY EDLKMYQTEF QAINAALQNH NHQQIILDKG MLVAIDELMQ
SLNHNGETLR QKPPVGEADP YRVKMKLCIL LHAFSTRVVT INRVMGYLSS
ASAGGGGSGG GGSGPIFNAS VHSDTPSVIR GDLIKLFCII TVEGAALDPD
DMAFDVSWFA VHSFGLDKAP VLLSSLDRKG IVTTSRRDWK SDLSLERVSV

LEFLLQVHGS EDQDFGNYYC SVTPWVKSPT GSWQKEAEIH SKPVFITVKM DVLNAFKYPL LIGVGLSTVI GLLSCLIGYC SSHWCCKKEV QETRRERRRL MSMEMD*

SEQ ID NO: 7 PTGFRN IFN гамма-мономер

MGRLASRPLLLALLSLALCRGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS
QIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQV
MAELSPAAKTGSAGGGSGGGGGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSF
VELASTWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDT
VQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRF
HPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVV
IQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSS
PHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQ
VYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKY
GERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFW
ALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSV
VKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIE
IDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDR
KGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFIT
VKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 8 PTGFRN IFN гамма-димер

MGRLASRPLLLALLSLALCRGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS OIVSFYFKLFKNFKDDOSIOKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVORKAIHELIOV ${\tt MAELSPAAKTGGSGGSGGSGGSGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI}$ MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELI QVMAELSPAAKTGSAGGGGGGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLG SSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYE DTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHE GRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVA TVVIQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEP DYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWT LKYGERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVN IFWALEDSVLVVKAROPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDO DSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLS NPIEIDFOTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSS LDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPV FITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVOETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 9 PTGFRN_IFN_мышиный гамма-мономер

MGRLASRPLLLALLSLALCRGRHGTVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMKILQSQII SFYLRLFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLP ESSLRSAGGGGSGGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELAST WEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDTVQVKVL ADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGY EQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLR AAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSSPHVALS HVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNAS KVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQ RAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDSV LVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENW TDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSG PIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTS RRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVL NAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRLMSMEMD

SEQ ID NO: 10 PTGFRN IFN мышиный гамма-димер

MGRLASRPLLLALLSLALCRGRHGTVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMKILQSQII SFYLRLFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLP ESSLRGSGGSGGSGGGGGHGTVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLR SAGGGGGGGGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGF PAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDTVQVKVLADSLH VGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYH SGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPK ${\tt NVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSSPHVALSHVDAR}$ SYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGF ADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKORAODG DFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKA RQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASR VDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNAS VHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWK SDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYP LLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 11 ИЛ-15 441

MAPRARGCRTLGLPALLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTS SLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTA ATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTGGSGG GSGGGGGGGGGGGGGSGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVI

 ${\tt SLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSADYKDDD} \\ {\tt DKFEGGGGSGGGSAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPRSGLLTGRT} \\$

SEQ ID NO: 12 ИЛ-15 442

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLRPPATRGHHHHHHHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSP SSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDT TGGSGGGSGGGSTLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGGGSGGGSGGSNWVNVISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSADYKDDDDKFEGGGGSGGGSAVGQDTQEVIVVPHSLPFKV VVISAILALVVLTIISLIILIMLWOKKPRSGLLTGRT

SEQ ID NO: 13 ИЛ-15 443

SEQ ID NO: 14 ИЛ-15 444

METDTLLLWVLLLWVPGSTGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQ VISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSDYKDDD DKGGSGGGSGGGSTLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGGGGSGGGSGGSITCPPPMSVEHADIW VKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTTSAFEGGGGSGGGSAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLII LIMLWQKKPRSGLLTGRTHHHHHH

SEQ ID NO: 15 ИЛ-15 1009

TWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVM DGDWTLKYGERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDV FSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKY IISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREA ATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAP VLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEI HSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 16 ИЛ-15 1010

METDTLLLWVLLLWVPGSTGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQ VISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLOSFVHIVOMFINTSGGSSGS VKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHORPAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTTSAGGGGSGGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDW SFSSLGSSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATV QGNYEDTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVL ALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEK AVEVATVVIOPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARL DRDSLVHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGV TWLEPDYOVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVM DGDWTLKYGERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDV FSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKY IISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREA ATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAP VLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEI HSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 17 pDisplay-анти-CD3

MKIICLALVALLLTAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGSGG GGSAGGTATAGASSGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGSGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGAVGQD TQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPRDYKDDDDK

SEQ ID NO: 18 PTGFRN-анти-CD3

MKIICLALVALLLTAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH GGSAGGTATAGASSGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGRVVRV PTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEONFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPAOLYOERLORGEILLRR TANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPF ELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEORYHSGDVRLDTVGSDAYRLS VSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNIT TDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKS GEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQ RTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFR YRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKL FCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQ VHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMDTGGSGGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIR HNIEDGSVOLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDEL YKDYKDDDDK

SEQ ID NO: 19 PTGFRN_CD40L мышиный тример

METDTLLLWVLLLWVPGSTGMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYTMKSNLVMLENG KQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGV FELQAGASVFVNVTEASQVIHRVGFSSFGLLKLGSGGSGGSGMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAAS VLQWAKKGYYTMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERI LLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIHRVGFSSFGLLKLGSGGSGGSGGSGMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYTMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFC SNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIH RVGFSSFGLLKLSAGGGGSGGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSF VELASTWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDT VQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRF HPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVV IQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSS PHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQ VYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKY

GERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFW
ALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSV
VKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIE
IDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDR
KGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFIT
VKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 20 PTGFRN_CD40L человеческий тример

METDTLLLWVLLLWVPGSTGMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFE LOPGASVFVNVTDPSOVSHGTGFTSFGLLKLGSGGSGGSGGSGMOKGDONPOIAAHVISEASSKTTSVL QWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGSGGSGGSGGSGMQK GDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREA SSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFT SFGLLKLSAGGGGSGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELAS TWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDTVQVKV LADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLG YEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVL RAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSSPHVAL SHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYOVYLNA SKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSK QRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDS VLVVKAROPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDODSVVKLEN WTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVT TSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMD VLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVOETRRERRRLMSMEMD

SEQ ID NO: 21 PTGFRN_short-ahtu-CD3

MKIICLALVALLLTAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSSGSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGG GGSAGGTATAGASSGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGSGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGFIFNA SVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDW KSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKY PLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMDTGGSGGSVSKGEELFTGVVPIL

VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDF FKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYI MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMVL LEFVTAAGITLGMDELYKDYKDDDDK

SEQ ID NO: 22 FLT3L-PTGFRN

MTVLAPAWSPTTYLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELC GGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLV ALKPWITRONFSRCLELOCOPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAPOPPSAGGGGSGGGGSRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVE LHIKNVOPSDOGHYKCSTPSTDATVOGNYEDTVOVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAA SASPLHTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNVSVAEGKELDLTCNITTDRADDV RPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSLVHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSL WAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRF TVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKN IKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFRYRMYQTQ VSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGA ALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSH WCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Экзосомальные липиды		
Либобисфосфатидная кислота	Ганглиозид GM3 24:1	
Сфингомиелин (SM)	Ганглиозид GM3 16:0	
Ганглиозид GM3	PE40:5	
Фосфатидилсерин (PS)	PE40:6	
Фосфатидилинозитол (PI)	PE38:3	
Фосфатидилхолин (РС)	PE38:4	
Фосфатидилэтаноламин (РЕ)	PE36:1	
Лизофосфатидилхолин (LPC)	PE36:2	
Холестерин (Chol)	PE34:1	
Диацилглицерин (DG)	PE34:2	
PI18:0/20:3	РЕ эфир 38:5	
PI18:0/20:4	РЕ эфир 38:6	
PI18:0/18:1	РЕ эфир 34:1	

PI18:1/18:1	РЕ эфир 34:2
PI18:0/16:0	PC34:1
PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	Дигидросфингомиелин 16:0

Таблица 2. Экзосомальные полипептиды			
ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4

CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGKα	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSR2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL

GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	RPLP0-подобный	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10

STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VTA1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	НЕРН	BDH2	CD151
C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR

UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
ТТҮН3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
Clorf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	Clorf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC

ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
APOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX
ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B
RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5
ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXYD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
ВНМТ	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8
CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC

MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE
NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN
SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	Clorf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK
PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1
PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUM1L1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1
RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	СЕТР	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1

SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIPT
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10

RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRDL2	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	СР	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2

CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	СТН	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHVα	UNC45A
COX4I1	DDC	IGLα	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXYD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C

HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFBI	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	Clorf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3

PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444
RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589

TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5

TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1

SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3
DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1
FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3
AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2AI
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM
CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F

SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
ЕРНВ3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGHα	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTPI1
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903
CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819

PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSR1	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	ССТ6В
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B
RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	ВСНЕ
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE
RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

O 6			
Общие классы Белки с анкириновь	ім повтором	Фибронектины	Лиазы
Антитела	Рецепторы комплемента	GPI-связанные полипептиды	Нанотела
Аптамеры	Циклические пептиды	Белки с НЕАТ-повторами	Нуклеиновые кислоты
Белки с ARM- повторами	DARРины	Гидролазы	Полипептиды
Углеводы	ДНКазы	Киназы	Одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv)
Рецепторы клеточной поверхности	Ферменты	Липопротеины	Белки с тетратрикопептидны ми повторами
Комплемент		L	
Ингбитор C1 Рецептор бета-цепи C3	С4-связывающий белок CD59	CR3 CR4	Фактор I Гомологичный фактор рестрикции
C3aR	CR1	Фактор ускорения распада (DAF)	Мембранный кофакторный белок (МСР)
C3eR	CR2	Фактор Н	PRELP

Ферменты			
триацилглицеринл	СоА-гидролаза желчных	ферулоилэстераза	фосфатидатфосфатаза
ипаза	кислот		
(S)-метилмалонил-	бис(2-	формил-СоА-гдиролаза	фосфатидилглицерин
СоА-гидролаза	этилгексил)фталатэстераза		фосфатаза
[ацил-переносящий	бисфосфоглицератфосфатаз	фруктозо-бисфосфатаза	фосфатидилинозитолд
белок]фосфодиэсте	a		еацилаза
раза			
[фосфолизаза]фосф	гидролазы сложных эфиров	фумарилацетоацетаза	фосфодиэстераза I
атаза	карбоноовых кислот		
1,4-лактоназа	карбоксиметиленбутенлида	фузаринин-С-	фосфоглицератфосфат
	3 a	орнитинэстераза	аза
11-цис-ретинил-	целлюлоза-полисульфатаза	галактолипаза	фосфогликолатфосфат
пальмитатгидролаз			аза
a			
1-алкил-2-	цефалоспонин С-	глюконолактоназа	фосфоинозитидфосфо
ацетилглицерофос	деацетилаза		липаза С
фохолинэстераза			
2'-	цереброзид-сульфатаза	глюкозо-1-фосфатаза	фосфолипаза А1
гидроксибифенил-			
2-			
сульфинатдесульф			
иназа			
2-пирон-4,6-	цетраксатбензилэстераза	глюкозо-6-фосфатаза	фосфолипаза А2
дикарбоксилатлакт			
оназа			
3', 5'-	хлорогенатгидролаза	глутатионтиолэстераза	фосфолипаза С
бисфосфатнуклеот			
идаза			
3-	хлорофиллаза	глицерин-1-фосфатаза	фосфолипаза D
гидроксиизобутири			
л-СоА-гидролаза			
3'-нуклеотидаза	холинэстераза	глицерин-2-фосфатаза	фосфоноацетальдегид
			гидролаза
3-	холинсульфатаза	глицерофосфохолинфос	фосфоноацетатгидрол
оксоадипатеноллак		фодиэстераза	аза
тоназа			
3-фитаза	холоил-СоА-гидролаза	Гликозидазы, т.е.,	фосфонпируватгидрол
		ферменты, которые	аза

		гликозильные	
		соединения	
4-	хондро-4-сульфатаза	гликосульфатаза	фосфопротеинфосфат
гидроксибензоил-			asa
СоА-тиоэстераза			
4-	хондро-6-сульфатаза	гликозилазы	Гидролазы сложных
метилоксалоацетат			диэфиров фосфорной
эстераза			кислоты
4- фитаза	цитрат-лиаза-деацетилаза	гистидинол-фосфатаза	Гидролазы сложных
•			моноэфиров
			фосфорной кислоты
4-	кокаинэстераза	гормон-чувствительная	Гидролазы сложных
пиридоксолактоназ		липаза	триэфиров фосфорной
а			кислоты
5'-нуклеотидаза	кутиназа	Гидролизирующие N-	фосфосеринфофатаза
13,111,011,011	ay amaga	гликозильные	фотфотринфофиция
		соединения	
6-ацетилглюкозо-	цикламат-сульфогидролаза	Гидролизирующие S-	поли(3-
деацетилаза	димин сульфогидромам	гликозильные	гидроксибутират)депо
дещетняаза		соединения	лимераза
6-	Цистеиновые		поли(3-
фосфоглюконолакт		гидроксиацилглутатионг	гидроксиоктаноат)деп
оназа	эндопептидазы	идролаза	олимераза
	Vanfavavrantavvaavv		•
эстераза а-	Карбоксипептидазы	гидроксибутирандимерн	полинеуридин-
аминокислот	цистеинового типа	ая гидролаза	альдегид-эстераза
Гидролазы а-	D-арабинонлактоназа	гидроксиметилглутарил-	протеин-глутамат-
амино-ацил-		СоА-гидролаза	метилэстераза
пептидов			
ацетоацетил-СоА-	дезоксилимонат-А-	идуронат-2-сульфатаза	N-ацил-
гидролаза	кольцевая-лактоназа		гомосеринлактоназа
			гашения кворума
ацетоксибутинилби	dGTPa3a	инозитол-фосфат-	ретиниил-пальмитат-
тиофендеацетилаза		фосфатаза	эстераза
ацетилажмалин-	дигидрокумарингидролаза	эстераза ювенильного	Сериндегидротаза или
эстераза		гормона	серингидроксиметилт
			рансфераза
ацетилалкилглицер	Дипептидазы	кунурениназа	Сериновые
инацетилгидролаза			эндопептидазы
ацетилахолинэстер	Дипептидгидролазы	L-арабинолактоназа	серин-
asa			этаноламинфосфат-

адетил-СоА динентиди-пентидазы и динопротенциназы серинового типа серинового типа динентиди-пентидазы дожных динопротенциназы серинового типа серинового типа динентидитари дисульфоглокозамин-6- дис				фосфодиэстераза
Пидролазы сложных моноэфиров дифосфорной кислоты	ацетил-СоА-	Дипептидил-пептидазы и	лимонин-D-кольцевая-	Карбоксипептидазы
жислая фосфорной кислоты кислая фосфорной кислоты действие на дележения веществ кислые на дележения веществ кислые на дележения веществ кислые на дележения веществ действие на дележения веществ кислые антидриды с щелько каталита действие на дележения веществ дележения веществ дележения механизмом действие на дележения дележения дележения веществ дележения веществ дележения механизмом действие на дележения дележения дележения веществ дележения веществ дележения веществ дележения механизмом действие на дележения дележения дележения веществ дележения веществ дележения д	гидролаза	трипептидил-пептидазы	лактоназа	серинового типа
ацетилируваттидр дисульфоглюкозамин-6- сульфатаза лодеканоил-[ашил- ацетилалициятале апетилаза переносаций белок [тидролаза ацетилкиланаза переносаций белок [тидролаза отношение не образованию сложных моноэфиров 31- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Лидодезоксирибону клеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 51- фосфорной кислоты действие на кислые ангидриды с целью катализа праводенные катализа трансмембранного движения веществ приводящие к образованию с деятью катализа приводящие к образованию с пожных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с пожных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с пожных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с сложных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с сложных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с сложных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с сложных моноэфиров 31- фосфорной кислоты действие и по отношению и кислоты последовательности сфинтомиелинфосфод и мостераза действие и по отношение как и по отношению и кислоты последовательности сфинтомиелинфосфод и мостераза детилистилана на пиди правежения по отношению и кислоты последовательности сфинтомиелинфосфод и мостераза детилистилана на пиди правежения по отношению и кислоты последовательности сфинтомиелинфосфод и мостераза детилистилана на пиди правежения по отношению и кислоты правежения по отношению и кислоты правежения по отношению и кислоты правежения по отношение и правежения по отношение и м	ацетилэстареза	Гидролазы сложных	липопротеинлипаза	S-
апетилируватгидр сульфатаза досконоил-[ацил- переносяций болок]гидрола за ацетилксиланэстер за деней за ацетилксилана за ацетилириза за ацетилириза за ацетилксилана за ацетилириза за ацетилксилана за ацетилксилана за ацетилксилана за ацетилксилана за ацетилксилана за ацетилириза за ацетилириза за ацетилириза за ацетилириза за ацетилириза за ацетилксилана за ацетилириза за а		моноэфиров дифосфорной		формилглутатионгидр
одаза судьфатаза додеканоил-[ацил- ащетилаза Эндодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Эндодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты Валяются специфические адалезоксирибонукл еазы, которые являются специфическии по отношению к измененным основаниям. Действие на кислые антидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ Кислые антидриды с целью облегчения клегочного и субклеточного Подектвие на одежанизмом подектаза пранофотиолищерат фосфорной кислоты и субклеточного Сайт-специфические янадалаза пранодезоксирибонукл азы последовательности негочного постираза синапинастераза синапинэстераза синапинеские янази: расцепление янази: расцепленаза специфич		кислоты		олаза
ащетилаза переносящий белок јгидролаза ащетилаза ащетилаза ащетилаза ащетилаза переносящий белок јгидролаза ащетилаза ащетилаза переносящий белок јгидролаза ащетилаза приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Видодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Действие на мислые ангидриды с целью катализа расшествите неизвестных каталитическим по отношению к измененым основаниям. Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с щелью сложных моноэфиров 3°- фосфатаза фосфорной кислоты Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с щелью сложных моноэфиров 3°- фосфатаза фосфорной кислоты фосфорной кислоты метилфосфотноглищерат сфингомиелинфосфод изстераза фосфатаза метилфосфотноглищерат сфингомиелинфосфод изстераза фосфатаза метилфосфотноглищерат сфингомиелинфосфод изстераза изстераза	ацетилпируватгидр	дисульфоглюкозамин-6-	L-рамноно-1,4-	сиалат-О-
ащетиляза персносящий белок]гидролаза ащетилксиланэстер аза приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза радделоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза радделоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты Действие на Эндолептидазы с нелью катализа каталитическим каталит	олаза	сульфатаза	лактоназа	ацетилэстераза
анастилисиланэстер аза приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Вействие на Эндолептидазы с целью каталита с целью каталита с целью каталита с целью сложных моноэфиров доблегчения кислые ангидриды с обжего и по отношению к каслоты Действие на Эндолептидазы с целью с целью сазанизмом трансмембранного движения веществ с целью с делью сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты Действие на ундолемовувлевазы, которые зазы ундолемованию основаниям. Действие на неизвестных каталитическим механизмом трансмембранного движения веществ с целью сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты Действие на ундолемованию сложных моноэфиров 3°- монованиям с целью каталита каталитическим каталитическим и по отношению к изменения веществ с целью каталита каталитическим и по отношению к изменения веществ с целью сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты Действие на ундолемованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие на ундолемованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие на ундолемованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие из образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие карама с делью образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие карама с делью образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие карама с делью образованию сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты действие карама с делью образованию с действова с делью образованию с делью образованию с действова с делью образованию с делью образованию с делью образованию с действова с делью образованию с	ацетилсалицилатде	додеканоил-[ацил-	лизофосфолипаза	синапинэстераза
ацетилксиланэстер аза приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°-фосфорной кислоты по отношению к последовательности кислая фосфатаза Эндодезоксирибону клеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°-фосфорной кислоты приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°-фосфорной кислоты по отношению к измененным основаниям. Действие на кислые ангидриды с целью катализа транемембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью катализа транемембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью катализа каталитическим механизмом по отношению к измененным основаниям. Действие на радодезоксирибону клеазы, которые являются специфическим по отношению к измененным основаниям. Металлозндопептидазы Сайт-специфические эндодезоксирибону клеазы: расщепление является специфическим по отношению к последовательности Действие на радодезоксирибону клеазы, метилфосфотноглищерат фонтионению к последовательности Действие на отношения фосфорной кислоты фосфорной кислоты фосфорной кислоты клеточного и субклеточного и субклеточного	ацетилаза	переносящий		
аза приводящие к образованию сложных моноэфиров 3°-фосфорной кислоты неизвестных кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ кислые ангидриды с целью сателью сти действие на кислые ангидриды с целью сателью сти действие на кислые ангидриды с целью сателью сти действие на кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью сателью собразованию с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью сателью сателью сателью собразованию с целью собразованию с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью собразованию с целью с с целью с собразованию с целью с собразованию с целью с с целью с собразованию с с целью с с целью с с целью с с с с целью с с с с целью с с с с с с с с с с с с с с с с с с с		белок]гидролаза		
сложных моноэфиров 3°- фосфорной кислоты кислая фосфатаза Действие на отранемембранного движения веществ движения веществ действие на Эндорибонуклеазы, транемембранного движения веществ действие на Эндорибонуклеазы, тотошению катализа каталитическим по отношению катализа катализа катализа катализа к	ацетилксиланэстер	Эндодезоксирибонуклеазы,	маннит-1-фосфатаза	Сайт-специфические
фосфорной кислоты кислая фосфатаза Лидодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5'-фосфорной кислоты Действие на Эндопептидазы с целью катализа каталитическим деяжения веществ действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с постношению к измененным основаниям. Действие на Эндопептидазы с целью катализа каталитическим неизвестных с целью катализа каталитическим деяжения веществ действие на Эндорибонуклеазы, последовательности действие на Ондорибонуклеазы, последовательности действие на Ондорибонуклеазы, последовательности действие на Ондорибонуклеазы, последовательности фосфорной кислоты фосфорной кислоты клеточного и субклеточного действонно на образованию с последовательности фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	аза	приводящие к образованию		эндодезоксирибонукл
кислая фосфатаза — Зндодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°-фосфорной кислоты — Действие на радопептидазы с целью катализа трансмембранного движения веществ — Действие на образованию с целью катализа каталитическим механизмом — Действие на образованию с целью катализа каталитическим механизмом — Действие на образованию с целью катализа приводящие к образованию с целью катализа трансмембранного движения веществ — Действие на образованию с целью катализа каталитическим механизмом — Действие на образованию с целью с целью с целью катализа неизвестных н		сложных моноэфиров 3'-		еазы: расщепление не
кислая фосфатаза Видодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты Действие на оне за трансмембранного движения веществ движения веществ ислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на образованию с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на образованию с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на образованию с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на образованию с целью с целью с целью с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на образованию с целью с ц		фосфорной кислоты		является
кислая фосфатаза Эндодезоксирибону клеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5:- фосфорной кислоты Действие на кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ кислые ангидриды с целью ангидриды с целью ангидриды с целью катализа каталитическим по отношению к насачизмом Действие на Эндопептидазы с целью катализа каталитическим механизмом Действие на Эндорибону клеазы, приводящие к образованию с ложных моноэфиров 3:- фосфорной кислоты Действие на отношению к последовательности Действие на отношению к неизвестных неизв				специфическим по
жислая фосфатаза Эндодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5°- фосфорной кислоты Действие на кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ действие на кислые ангидриды с целью ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ доблегчения клеточного и субклеточного Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию облегчения клеточного и субклеточного Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию облегчения клеточного и субклеточного Заы эндодезоксирибонукл сазы два учения в последовательности образованию облегчения клеточного и субклеточного Металлоэндопептидазы с металлоэндопептидазы с педифические эндодезоксирибонукл сазы: расщепление последовательности Облегчения фосфорной кислоты Металлокарбоксипептид заы эндодезоксирибонукл сазы, потношению к последовательности Облегчения фосфорной кислоты Облегчения приводящие к образованию облегчения клеточного и субклеточного и субклеточного и субклеточного				отношению к
приводящие к образованию сложных моноэфиров 5'- фосфорной кислоты Действие на кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ Действие на катализа трансмембранного движения веществ Действие на катализа катализа, приводящие к образованию с целью с целью с целью с целью катализа трансмембранного движения веществ и делью с целью с целью с целью с целью с целью с целью катализа трансмембранного движения веществ и делью с целью с ц				последовательности
сложных моноэфиров 5'- фосфорной кислоты Действие на кислые ангидриды с целью катализа каталитическим механизмом Действие на Трансмембранного движения веществ Кислые ангидриды с целью катализа каталитическим механизмом Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения клеточного и субклеточного	кислая фосфатаза	Эндодезоксирибонуклеазы,	Металлокарбоксипептид	Сайт-специфические
фосфорной кислоты фосфорной кислоты Действие на Эндопептидазы с Металлоэндопептидазы с целью катализа каталитическим трансмембранного движения веществ Действие на Эндорибонуклеазы, кислые ангидриды с целью с ангидриды трансмембранного движения веществ Действие на Эндорибонуклеазы, последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- фосфорной кислоты клеточного и субклеточного		приводящие к образованию	азы	эндодезоксирибонукл
Специфическими по отношению к измененным основаниям. Действие на кислые ангидриды с целью каталитическим механизмом движения веществ Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- фосфорной кислоты клеточного и субклеточного		сложных моноэфиров 5'-		еазы, которые
Действие на Эндопептидазы с Металлоэндопептидазы Сайт-специфические неизвестных аталитическим неханизмом является специфическим по отношению к последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'-облегчения клеточного и субклеточного		фосфорной кислоты		являются
Действие на расшепление измененным основаниям. Действие на кислые ангидриды неизвестных неизвестных неизвестных неизвестных наталитическим неханизмом является специфическим по отношению к последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения клеточного и субклеточного				специфическими по
Действие на Эндопептидазы с Металлоэндопептидазы Сайт-специфические неизвестных катализа катализа катализа катализа трансмембранного механизмом является специфическим по отношению к последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, кислые ангидриды с целью сложных моноэфиров 3'-облегчения клеточного и субклеточного				отношению к
Действие на Эндопептидазы с Металлоэндопептидазы Эндодезоксирибонукл еазы: расшепление трансмембранного движения веществ на Эндорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- фосфорной кислоты клеточного и субклеточного				измененным
кислые ангидриды с целью катализа трансмембранного движения веществ — Видорибонуклеазы, приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'-фосфотного и субклеточного — Видорибонуклеазы приводящие к образованию с целью облегчения клеточного и субклеточного — Видорибонуклеазы приводящие к образованию с целью облегчения клеточного и субклеточного — Видорибонуклеазы приводящие к образованию с целью облегчения клеточного — Видорибонуклеазы приводящие к образованию с целью облегчения клеточного — Видорибонуклеазы приводящие к образованию с целью облегчения приводящие к образованию облегчения приводящие к образованию с целью облегчения приводящие к образованию облегчения приводящие к образованию с целью облегчения приводящие к образованию облегчения приводящие к образованию с целью облегчения приводящие к образованию облегчения приводения приводения приводение прив				основаниям.
с целью катализа каталитическим трансмембранного механизмом является специфическим по отношению к последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды с целью облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	Действие на	Эндопептидазы с	Металлоэндопептидазы	Сайт-специфические
трансмембранного движения веществ движения веществ действие на кислые ангидриды сложных моноэфиров 3'- облегчения клеточного и субклеточного	кислые ангидриды	неизвестных		эндодезоксирибонукл
движения веществ специфическим по отношению к последовательности Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	с целью катализа	каталитическим		еазы: расщепление
Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	трансмембранного	механизмом		является
Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	движения веществ			специфическим по
Действие на Эндорибонуклеазы, метилфосфотиоглицерат сфингомиелинфосфод кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного				отношению к
кислые ангидриды приводящие к образованию с целью сложных моноэфиров 3'- фосфорной кислоты клеточного и субклеточного				последовательности
с целью сложных моноэфиров 3'- облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	Действие на	Эндорибонуклеазы,	метилфосфотиоглицерат	сфингомиелинфосфод
облегчения фосфорной кислоты клеточного и субклеточного	кислые ангидриды	приводящие к образованию	фосфатаза	иэстераза
клеточного и субклеточного	с целью	сложных моноэфиров 3'-		
субклеточного	облегчения	фосфорной кислоты		
	клеточного и			
движения	субклеточного			
	движения			

Действие на GTP с	Эндорибонуклеазы,	метилумбеллиферон-	S-
целью облегчения	приводящие к образованию	ацетатдеацетилаза	сукцинилглутатионгид
клеточного и	сложных моноэфиров 5'-		ролаза
субклеточного	фосфорной кислоты		
движения			
Действие на связи	Эндорибонуклеазы,	монотерпен-е-	стероида-лактоназа
фосфор-азот	которые являются	лактонгидролаза	•
	активными в отношении		
	как рибо-, так и		
	дезоксирибонуклеиновых		
	кислот и приводят к		
	образованию сложных		
	моноэфиров 3'-фосфорной		
	кислоты		
Действие на связи	Эндорибонуклеазы,	N-ацетилгалактозамин-	стеринэстераза
сера-азот	которые являются	4-сульфатаза	Стериностериза
copa asor	активными в отношении	Гоульфинаа	
	как рибо-, так и		
	дезоксирибонуклеиновых		
	кислот и приводят к		
	образованию сложных		
	моноэфиров 5'-фосфорной		
	кислоты		
актиномицинлакто	Ферменты, действующие на	N-ацетилгалактозамин-	стерил-сульфатаза
, The state of the		6-сульфатаза	стерил-сульфатаза
наза	кислые ангидриды	, ·	суусууууд СоА
ацилкарнитингидр	Ферменты, действующие на	N-	сукцинил-СоА-
олаза	связи углерод-углерод	ацетилгалктозаминоглик	гидролаза
	ж	андеацетилаза	
ацил-СоА-	Ферменты, действующие на	N-ацетилглюкозамин-6-	caxapo3o-
гидролаза	связи углерод-азот,	сульфатаза	фосфатфосфатаза
	отличные от других		
	пептидных связей		
ацилглицеринлипаз	Ферменты, действующие на	N-	сахар-фосфатаза
a	связи углерод-фосфор	сульфоглюкозаминсуль	
	_	фогидролаза	
ацилоксиацилгидр	Ферменты, действующие на	олеоил-[ацил-	Гидролазы сложных
олаза	связи углерод-сера	переносящий	эфиров серной
		белок]гидролаза	кислоты
ацилпируватгидрол	Ферменты, действующие на	Омега-пептидазы	танназа
аза	эфирные связи		

Ферменты, действующие на	орселлинат-депсид-	Гидролазы сложных
галидные связи	гидролаза	тиоэфиров
Ферменты, действующие на	оксалоацетаза	Тиоэфира и
пептидные связи		триалкилсульфония
(пептидазы)		гидролазы
Ферменты, действующие на	пальмитоил[протеин]гид	Треонинэндопептидаз
связи фосфор-азот	ролаза	Ы
Ферменты, действующие на	пальмитоил-СоА-	тимидинфосфорилаза
связи сера-азот	гидролаза	
Ферменты, действующие на	пектинэстераза	трегалоза-фосфатаза
связи сера-сера		
Эфиргидролазы	Пептидил-пептид-	триацетат-лактоназа
	гидролазы	
Экзодезоксирибонуклеазы,	Гидролазы пептидил-	Гидролазы сложных
приводящие к образованию	аминокислот	моноэфиров
сложных моноэфиров 5'-		трифосфорной
фосфорной кислоты		кислоты
Экзонуклеазы, которые	Гидролазы	тритионатгидролаза
являются активными в	пептидиламинокислот	
отношении как рибо-, так и	или гидролазы	
дезоксирибонуклеиновых	ациламинокислот	
кислот и приводят к		
образованию сложных		
моноэфиров 3'-фосфорной		
кислоты		
Экзонуклеазы, которые	Пептидил-дипептидазы	тропинэстераза
являются активными в		
отношении как рибо-, так и		
omomemm kak phoo , rak ii		
дезоксирибонуклеиновых		
-		
дезоксирибонуклеиновых кислот и приводят к		
дезоксирибонуклеиновых кислот и приводят к		
	Ферменты, действующие на пептидные связи (пептидазы) Ферменты, действующие на связи фосфор-азот Ферменты, действующие на связи сера-азот Ферменты, действующие на связи сера-сера Эфиргидролазы Экзодезоксирибонуклеазы, приводящие к образованию сложных моноэфиров 5'-фосфорной кислоты Экзонуклеазы, которые являются активными в отношении как рибо-, так и дезоксирибонуклеиновых кислот и приводят к образованию сложных моноэфиров 3'-фосфорной кислоты Экзонуклеазы, которые законорной кислоты	галидные связи Ферменты, действующие на пальмитоил[протеин]гид ролаза Ферменты, действующие на связи фосфор-азот Ферменты, действующие на связи фосфор-азот Ферменты, действующие на связи сера-азот Ферменты, действующие на связи сера-азот Ферменты, действующие на пальмитоил-СоА-гидролаза Ферменты, действующие на связи сера-азот Пептидил-пептид-гидролазы Экзодезоксирибонуклеазы, гидролазы пептидил-аминокислот Фосфорной кислоты Экзонуклеазы, которые отношении как рибо-, так и дезоксирибонуклеиновых кислот и приводят к образованию сложных моноэфиров 3'-фосфорной кислоты Экзонуклеазы, которые Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы Пептидил-дипептидазы

Аминопептидазы	Экзорибонуклеазы,	фенилацетил-СоА-	убиквитин-
	приводящие к образованию	гидролаза	тиоэстераза
	сложных моноэфиров 3'-		
	фосфорной кислоты		
арилэстераза	Экзорибонуклеазы,	Фенилаланин-аммоний-	УДФ-сульфохиновоза-
	приводящие к образованию	лиаза	синтаза
	сложных моноэфиров 5'-		
	фосфорной кислоты		
арилсульфатаза	Фактор IX	Фенилаланингидроксила	уриказа
		за	
Аспарагиназа	Фактор VIII	феофорбидаза	уронолактаза
Аспарагиновые	синтаза сложных	флоретингидролаза	гидролаза восковых
эндопептидазы	ацилэтилэфиров жирных		сложных эфиров
	кислот		
b-дикетонгидролаза		гидролаза сложных	ксилоно-1,4-лактоназа
		форболовых диэфиров	

Таблица 4. Мишени			
Общие классы мишеней			
Микроорганизмы	Полипептиды	днк	Аминокислоты
Грибы	Токсины	РНК	Прионы
Бактерии	Липиды	Паразиты	Цитокины
Вирус	Клетки	Клеточный дебрис	
Мишени, связанные	с инфекционными болезня	ми	
Липополисахариды	Белок клеточной инвазии	Интермедилизин	Секретируемый
			эффекторный белок
			sptP
Токсин запирающей	Холерный энтеротоксин	Инвазивный белок sipA	Силигериолизин
30ны			
Белок	Цистеинпротеаза	Компонент йота-	Сериновая протеаза
полимеризации		токсина Іа	
актина RickA			
Белок	Цитолетальный	Иванолизин	Шига-токсин
полимеризации	растягивающий токсин		
актина RickA			
Аденозинмонофосф	Цитолизин	LepB	Сфингомиелиназа
ат-протеин-			
трансфераза vopS			
аденилатциклаза	Цитотоксический	Летальный фактор	Стафилокиназа
	некротизирующий фактор		

Аденилатциклаза	Цитотоксин	Лейкотоксин	Стрептокиназа	
ExoY				
Ферментативный	Дермонекротрофический	Листериолизин	Стрептолизин	
компонент АДФ-	токсин			
рибозилтрансфераз				
ы				
Аэролизин	Деубиквитиназа	Микробная коллагеназа	Стрептопаин	
Альфа-токсин	Дифтерийный токсин	Автопереносчик белка	Сиулизин	
		внешней мембраны		
		IcsA		
Альвеолизин	Энтерогемолизин	Лейкоцидин Пантон	Суперантиген	
		Валентина F		
Альвеолизин	Энтеротоксин	Перфринголизин	Секретируемый T3SS	
			эффектор EspF	
Антролизин О	Ингибитор	Коклюшный токсин	Столбнячный токсин	
	дифференцировки			
	эпидермальных клеток			
Белок rickA,	Экзоэнзим	Фосфолипаза	Tir	
активирующий				
комплекс Arp2/3				
Бинарный токсин	Экзотоксин	Активатор	TolC	
АДФ-		плазминогена		
рибозилтрансфераз				
ы CDT				
Ботулинический	G-нуклеотидный фактор	Пневмолизин	Токсин синдрома	
нейротоксин	обмена		токсического шок	
Токсин С2,	Гуанин-нуклеотидный	Защитный антиген	Цинк-	
компонент II	фактор обмена sopE		карбоксипептидаза	
CagA	Термостабильный	Протеинкиназа	Цинк-	
	энтеротоксин		карбоксипептидаза	
Кальмодулин-	IgA-специфический	Пиолизин	Zn-зависимая	
чувствительная	автопереносчик		пептидаза	
аденилатциклаза	серинэндопептидазы			
Фактор	Инозитол-фосфат-	Токсин RTX		
ингибирования	фосфатаза sopB			
клеточного цикла				
Липидные и клеточные мишени				
Циркулирующие	липопротеин очень низкой	триглицериды	Жирные кислоты	
опухолевые клетки	плотности (VLDL)			
Метастазы	липопротеин высокой	хиломикроны	Холестерин	

	плотности			
Эукариотические	липопротеин ни	зкой	аполипопротеины	
клетки	плотности			

Таблица 5. Виды ра	ка		
Острый	Колоректальный рак	Макроглобулинемия	Плевролегочная
лимфобластный		Вальденстрема	бластома детей
лейкоз (ALL)			
Острая миелоидная	Краниофарингиома детей	Рак молочной железы у	Беременность и рак
лимфома (AML)		мужчин	молочной железы
Адренокортикальн	Кожная Т-клеточная	Злокачественная	Первичная лимфома
ая карцинома	лимфома	фиброзная гистиоцитома	центральной нервной
		кости и остеосаркома	системы (ЦНС)
СПИД-	Протоковая карцинома In	Меланома	Рак предстательной
ассоциированная	Situ (DCIS)		железы
саркома Капоши			
СПИД-	Эмбриональные опухоли	Карцинома из клеток	Редкие виды рака
ассоциированная	детей	Меркеля	
лимфома			
Рак анального	Рак эндометрия	Мезотелиома	Рак прямой кишки
канала			
Рак аппендикса	Эпендимома детей	Метастатический	Почечно-клеточная
		плоскоклеточный рак шеи	карцинома
		с неизвестной первичной	
		локализацией	
Астроцитомы	Эпителиальный рак	Карцинома срединного	Рак переходных
детей		тракта, включающая ген	клеток почечной
		NUT	лоханки и
			мочеточника
Атипичная	Рак пищевода	Молярная беременность	Ретинобластома
тератоидно-			
рабдоидная			
опухоль детей			
Базальноклеточная	Эстезионейробластома	Рак ротовой полости и	Рабдомиосаркома
карцинома	детей	ротоглотки	
Рак желчных	Саркома Юинга	Синдром множественной	Рак слюнных желез
протоков		эндокринной неоплазии	
		детей	
Рак мочевого	Внегонадная	Множественная	Саркома
пузыря	герминогенная опухоль	миелома/новообразование	

		плазматических клеток	
Рак костей	Рак внепеченочного желчного протока	Фунгоидный микоз	Вторичные виды рака
Рак кишечника	Рак глаза	Миелодиспластические синдромы	Синдром Сезари
Глиома ствола головного мозга детей	Рак желчного пузыря	Миелодиспластические/ми елопролиферативные новообразования	Рак кожи
Опухоли головного мозга	Рак желудка	Миелопролиферативные хронические расстройства	Рак кожи (кроме меланомы)
Рак молочной железы	Карциноид желудочно- кишечного тракта	Рак носовой полости и околоносовых пазух	Мелкоклеточный рак легкого
Бронхиальные опухоли детей	Герминогенная опухоль	Рак носоглотки	Рак тонкого кишечника
Лимфома Беркитта	Гестационные трофобластические опухоли (GTT)	Нейробластома	Саркома мягких тканей
Рак с неизвестной первичной локализацией	Глиома	Неходжкинская лимфома	Плоскоклеточная карцинома
Метастазирование в костную ткань	Лейкоз волосковых клеток	Немелкоклеточный рак легкого	Метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестной первичной локализацией
Метастазирование в головной мозг	Рак головы и шеи	Рак пищевода	Рак желудка
Метастазирование в печень	Рак головы детей	Рак ротовой полости	Рак желудка
Метастазирование в легкое	Гепатоцеллюлярный рак (печени)	Рак ротовой полости	Кожная Т-клеточная лимфома, см. фунгоидный микоз и синдром Сезари
Карциноид	Гистиоцитоз клеток Лангерганса	Рак ротоглотки	Рак яичка
Карцинома с неизвестной первичной локализацией	Ходжкинская лимфома	Остеосаркома (рак кости)	Рак горла
Кардиальные	Гипофарингеальный рак	Остеосаркома и	Тимома и рак

опухоли (сердца)		злокачественная	вилочковой железы
детей		фиброзная гистиоцитома	
Атипичная	Интраокулярная	Рак яичника	Рак щитовидной
тератоидно-	меланома		железы
рабдоидная			
опухоль			
центральной			
нервной системы			
детей			
Эмбриональные	Опухоли островков	Рак поджелудочной	Переходно-клеточный
опухоли	поджелудочной железы,	железы	рак почечной лоханки
центральной	нейроэндокринные		и мочеточника
нервной системы	опухоли поджелудочной		
детей	железы		
Рак центральной	Рак почки	Нейроэндокринные	Рак с неизвестной
нервной системы		опухоли поджелудочной	первичной
детей		железы (опухоли	локализацией
		островковых клеток	
		поджелудочной железы)	
Рак шейки матки	Гистиоцитоз клеток	Папилломатоз детей	Переходно-клеточный
	Лангерганса		рак мочеточника и
			почечной лоханки
Хордома детей	Рак гортани	Параганглиома	Рак мочеточника
Хориокарцинома	Лейкоз	Рак паращитовидной	Рак эндометрия матки
		железы	
Хронический	Рак губы и ротовой	Рак полового члена	Саркома матки
лимфоцитарный	полости		
лейкоз (CLL)			
Хронический	Рак печени	Рак глотки	Рак влагалища
миелоидный			
лейкоз (CML)			
Хронические	Дольковая карцинома In	Феохромоцитома	Рак вульвы
миелопролиферати	Situ (LCIS)		
вные расстройства			
Рак толстой кишки	Опухоль с низким	Опухоль гипофиза	Макроглобулинемия
	потенциалом		Вальденстрема
	злокачественности		
Лимфома	Рак легкого	Новообразование	Опухоль Вильмса
		плазматических	

	миелома	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

внеклеточную везикулу, содержащую клеточную мембрану, ограничивающую замкнутый объем, при этом указанная клеточная мембрана имеет внутреннюю поверхность и наружную поверхность; и

первый иммуномодулирующий компонент, ассоциированный с указанной клеточной мембраной или заключенный в указанном замкнутом объеме.

- **2.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки.
- 3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанный отрицательный регулятор контрольной точки выбирают из группы, состоящей из: цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (СТLА-4), белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТІМ-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (ВТLА), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ід и ІТІМ (ТІБІТ), V-доменного Ід супрессора активации Т-клеток (VISTA), аденозинового рецептора А2а (A2aR), иммуноглобулинподобного рецептора клеток-киллеров (КІR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.
- **4.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы.
- **5.** Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой член суперсемейства рецепторов ФНО.
- 6. Композиция по п. 5, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas-рецептора, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR.
- 7. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой член суперсемейства ФНО.
- **8.** Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНОα, ФНО-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2.
- **9.** Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD40L.
- **10.** Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD27L.

- **11.** Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой OX40L.
- **12.** Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28.
- Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что указанная костимулирующая молекула суперсемейства СD28 представляет собой ICOS или CD28.
- **14.** Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.
- **15.** Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой CD80.
- **16.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой цитокин или связывающий партнер цитокина.
- **17.** Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанный цитокин выбирают из группы, состоящей из: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-15.
- 18. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-7.
- 19. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-12.
- 20. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-15.
- **21.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР), Т-клеточный корецептор, главный комплекс гистосовместимости (ГКГС), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или их производное.
- **22.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора.
- **23.** Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что указанный активатор Т-клеточного рецептора или корецептора представляет собой активатор CD3, необязательно агонистическое антитело к CD3.
- **24.** Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген.
- 25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНОсвязанного апоптоз-индуцирующего лиганда.
- **26.** Композиция по п. 24 или п. 25, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности.

- **27.** Композиция по п. 24 или п. 25, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта.
- **28.** Композиция по любому из пп. 1 27, отличающая тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист или антагонист.
- **29.** Композиция по любому из пп. 1 27, отличающая тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.
- **30.** Композиция по любому из пп. 1 27, отличающая тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид.
- **31.** Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что указанный полинуклеотид выбирают из группы, состоящей из: мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловой РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК.
- **32.** Композиция по пп. 1 27, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.
- **33.** Композиция по любому из пп. 1 32, отличающаяся тем, что указанный первый иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде слитого белка, экспонированного на наружной поверхности указанной внеклеточной везикулы.
- **34.** Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что указанный слитый белок содержит PTGFRN или его фрагмент или его вариант.
- **35.** Композиция по п. 34, отличающаяся тем, что последовательность указанного слитого белка представляет собой SEQ ID NO: 3.
- **36.** Композиция по любому из пп. 1 35, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула представляет собой экзосому.
- **37.** Композиция по любому из пп. 1 32, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула представляет собой нановезикулу.
- **38.** Композиция по любому из пп. 1 37, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.
- **39.** Композиция по любому из пп. 1 38, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула дополнительно содержит второй иммуномодулирующий компонент.
- **40.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки.
- 41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что указанный отрицательный регулятор контрольной точки выбирают из группы, состоящей из: цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (СТLА-4), белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТІМ-3), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (ВТLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ід и ІТІМ (ТІБІТ), V-доменного Ід супрессора активации Т-клеток (VISTA), аденозинового рецептора А2а (A2aR),

- иммуноглобулинподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), CD20, CD39 и CD73.
- **42.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы или активатор связывающего партнера положительной костимулирующей молекулы.
- **43.** Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой член суперсемейства рецепторов ФНО.
- **44.** Композиция по п. 43, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства рецепторов ФНО выбирают из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas-рецептора, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR.
- **45.** Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой член суперсемейства ФНО.
- **46.** Композиция по п. 45, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО выбирают из группы, состоящей из: ФНОα, ФНО-С, ОХ40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2.
- **47.** Композиция по п. 46, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD40L.
- **48.** Композиция по п. 46, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой CD27L.
- **49.** Композиция по п. 46, отличающаяся тем, что указанный член суперсемейства ФНО представляет собой ОХ40L.
- **50.** Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что указанная положительная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28.
- **51.** Композиция по п. 50, отличающаяся тем, что указанная костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28.
- **52.** Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.
- **53.** Композиция по п. 52, отличающаяся тем, что указанный активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой CD80.
- **54.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой цитокин или связывающий партнер цитокина.
- **55.** Композиция по п. 54, отличающаяся тем, что указанный цитокин выбирают из группы, состоящей из: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-15.
- 56. Композиция по п. 54, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-7.

- 57. Композиция по п. 54, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-12.
- 58. Композиция по п. 54, отличающаяся тем, что указанный цитокин представляет собой ИЛ-15.
- **59.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР), Т-клеточный корецептор, главный комплекс гистосовместимости (ГКГС), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или их производное.
- **60.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора.
- **61.** Композиция по п. 60, отличающаяся тем, что указанный активатор Т-клеточного рецептора или корецептора представляет собой активатор CD3, необязательно агонистическое антитело к CD3.
- **62.** Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген.
- 63. Композиция по п. 62, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген выбирают из группы, состоящей из: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), опухолевого белка р53 (р53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной смерти (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сМЕТ, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, ИЛ-3, раково-тестикулярного антигена, MART-1 gp100 и ФНОсвязанного апоптоз-индуцирующего лиганда.
- **64.** Композиция по п. 62 или п. 63, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген происходит из референтной геномной последовательности.
- **65.** Композиция по п. 62 или п. 63, отличающаяся тем, что указанный опухолевый антиген происходит из геномной последовательности субъекта.
- **66.** Композиция по любому из пп. 39 65, отличающая тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист или антагонист.
- **67.** Композиция по любому из пп. 39 65, отличающая тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.
- **68.** Композиция по любому из пп. 39 65, отличающая тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид.
- **69.** Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что указанный полинуклеотид выбирают из группы, состоящей из: мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловой РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК.
- 70. Композиция по пп. 39 65, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.
- **71.** Композиция по любому из пп. 39 70, отличающаяся тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде слитого белка, демонстрируемого на наружной поверхности указанной внеклеточной везикулы.

- 72. Композиция по п. 71, отличающаяся тем, что указанный слитый белок содержит PTGFRN или его фрагмент или его вариант.
- 73. Композиция по п. 72, отличающаяся тем, что последовательность указанного слитого белка представляет собой SEQ ID NO: 3.
- **74.** Композиция по любому из пп. 39 73, отличающая тем, что указанный второй иммуномодулирующий компонент отличается от первого иммуномодулирующего компонента.
- **75.** Композиция по любому из пп. 39 74, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула дополнительно содержит третий иммуномодулирующий компонент.
- **76.** Композиция по п. 75, отличающаяся тем, что указанный третий иммуномодулирующий компонент отличается от первого и второго иммуномодулирующих компонентов.
- 77. Способ получения указанной композиции по любому из пп. 1 38, включающий:

модификацию клетки-продуцента указанными первым, вторым и/или третьим иммуномодулирующими компонентами;

получение указанной внеклеточной везикулы из указанной клетки-продуцента; и необязательно выделение указанных полученных внеклеточных везикул.

78. Способ получения указанной композиции по любому из пп. 1 - 38, включающий:

получение указанной внеклеточной везикулы из указанной клетки-продуцента; и

выделение указанных полученных внеклеточных везикул; и

модификацию указанной выделенной внеклеточной везикулы указанными первым, вторым и/или третьим иммуномодулирующими компонентами.

- **79.** Способ по п. 77 или п. 78, дополнительно включающий составление указанных выделенных внеклеточных везикул в фармацевтическую композицию.
- 80. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества указанной композиции по любому из пп. 1 - 38, при этом указанная композиция способна активировать иммунный ответ у указанного субъекта, тем самым усиливая целенаправленное воздействие на опухоль иммунной системы указанного субъекта.

81. Способ лечения болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD) у субъекта, включающий:

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества указанной композиции по любому из пп. 1 - 38, при этом указанная композиция способна подавлять иммунный ответ у указанного субъекта, тем самым облегчая симптомы GvHD.

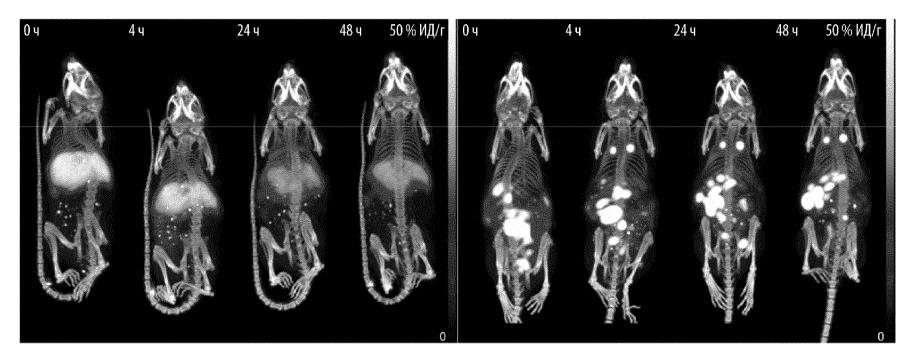
82. Способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающий:

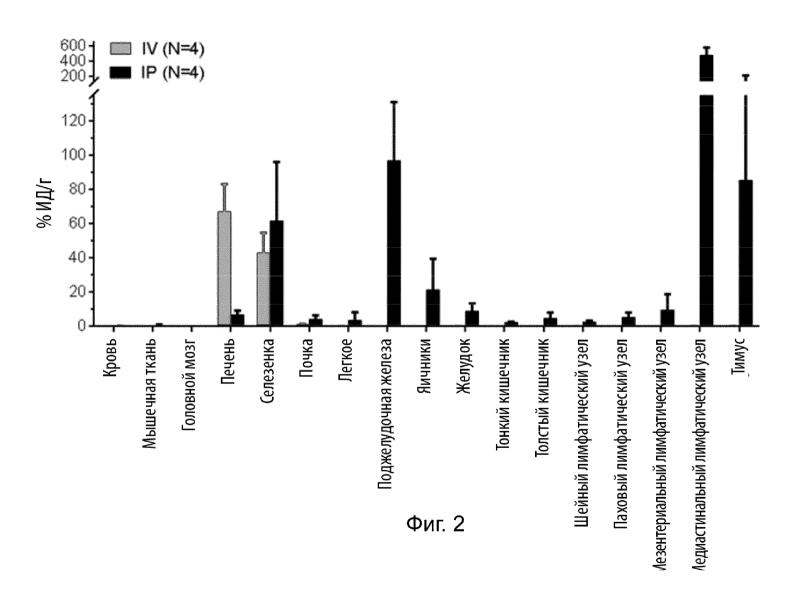
введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества указанной композиции по любому из пп. 1 - 38, при этом указанная композиция способна подавлять иммунный ответ у указанного субъекта, тем самым подавляя иммунную активность указанного субъекта.

83. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий:

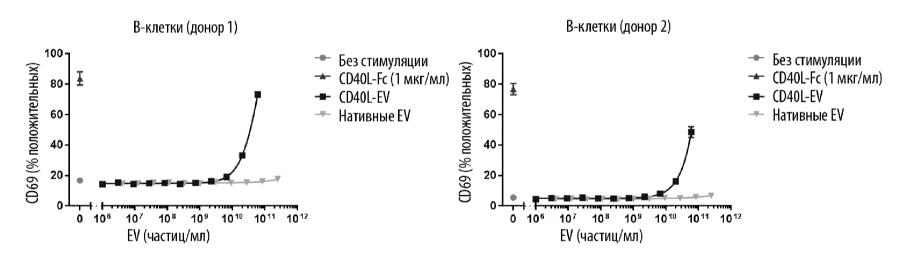
введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества указанной композиции по любому из пп. 24 - 27, при этом указанная композиция способна потенцировать иммунный ответ на указанный опухолевый антиген, тем самым усиливая иммунный ответ указанного субъекта на рак.

Фиг. 1А Фиг. 1В



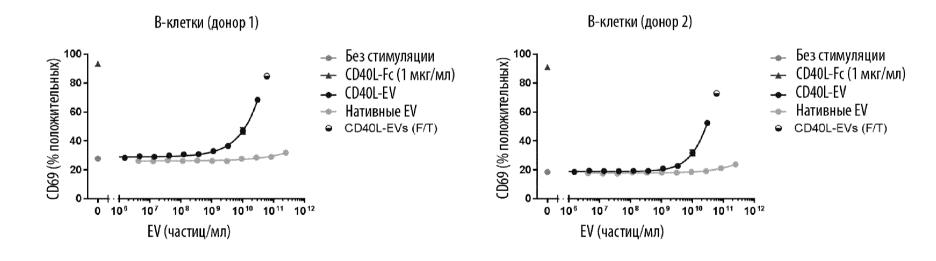


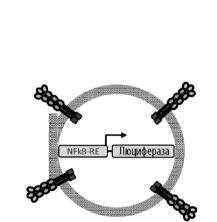






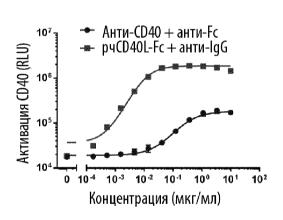
Фиг. 4В

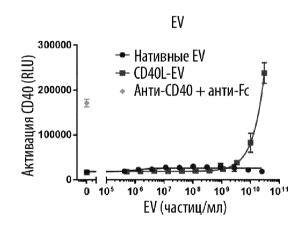




Фиг. 5А

Фиг. 5В





Фиг. 5С

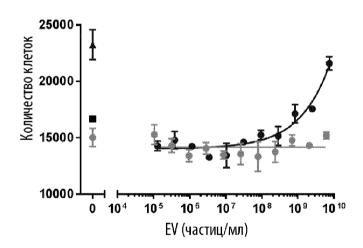
Фиг. 6А

СD8+ Т-клетки (день 3) 30000 - 20000 - 20000 - 104 105 106 107 108 109 1010 EV (частиц/мл)

- Aнти-CD3 (1 нг/мл)
- ★ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- → Нативные EV + анти-CD3
- **--** CD80-EV + анти-CD3

Фиг. 6В

CD4+ Т-клетки (день 3)

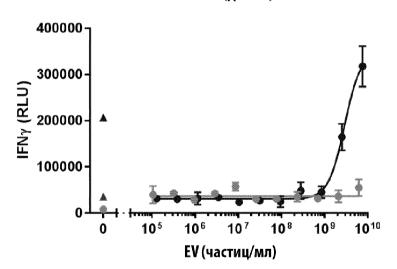


- **---** Анти-CD3 (1 нг/мл)
- → Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- → Нативные EV + анти-CD3
- **→** CD80-EV + анти-CD3

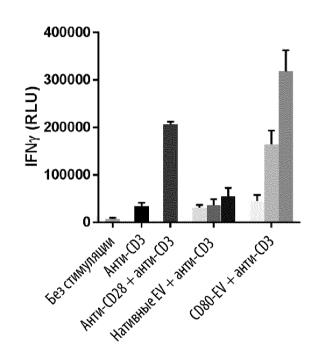
Фиг. 7А

Фиг. 7В

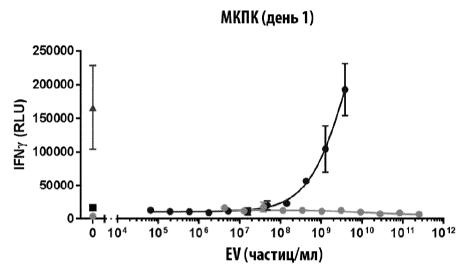
МКПК (день 3)



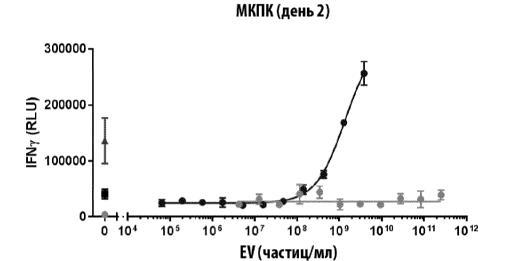
- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- → Нативные EV + анти-CD3
- **СD80-EV** + анти-CD3



Фиг. 8А Фиг. 8В

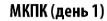


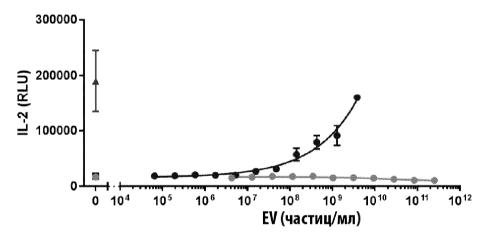
- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- Нативные EV + анти-CD3
- **CD27L-EV** + antru-CD3



- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- Нативные EV + анти-CD3
- **→** CD27L-EV + анти-CD3

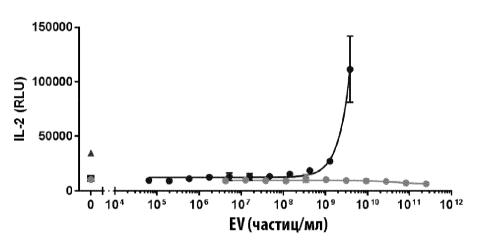
Фиг. 9А Фиг. 9В





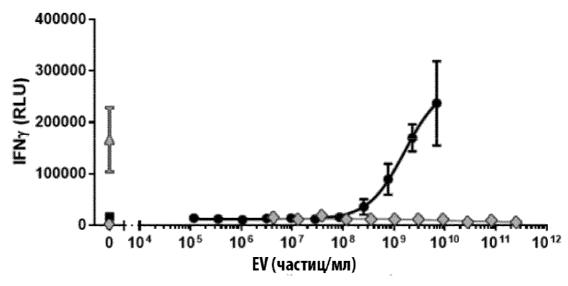
- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- Нативные EV + анти-CD3
- **◆** CD27L-EV + aHTU-CD3

МКПК (день 2)



- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- Нативные EV + анти-CD3
- ◆ CD27L-EV + анти-CD3

МКПК (донор 1)

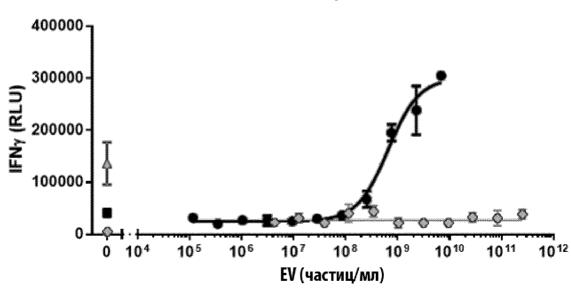


- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- Нативные EV + анти-CD3

Фиг. 10А

ОХ40L-EV + анти-CD3

МКПК (донор 2)

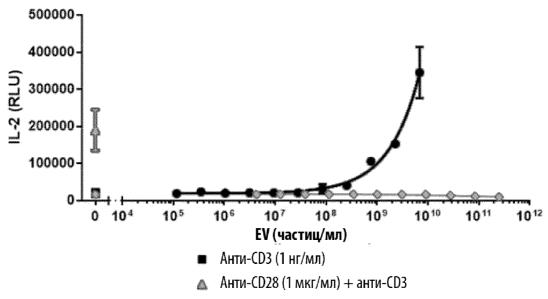


- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3
- ◆ Нативные EV + анти-CD3

Фиг. 10В

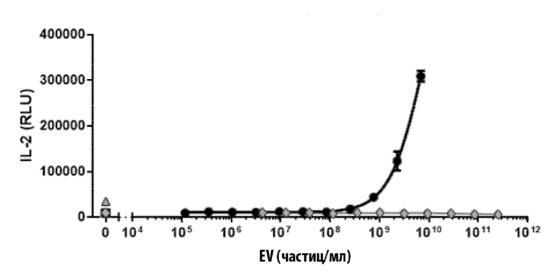
• OX40L-EV + анти-CD3

МКПК (донор 1)



- Нативные EV + анти-CD3
- OX40L-EV + анти-CD3

МКПК (донор 2)



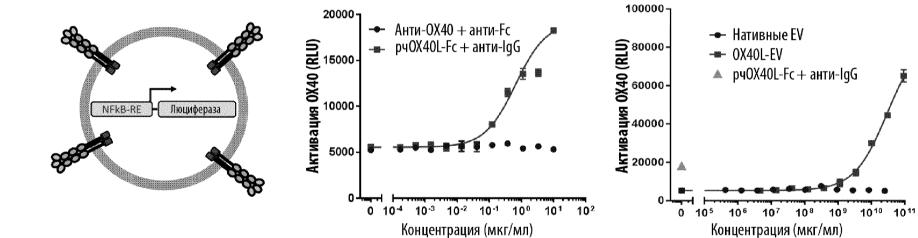
- Анти-CD3 (1 нг/мл)
- ▲ Анти-CD28 (1 мкг/мл) + анти-CD3 3
- → Нативные EV + анти-CD3

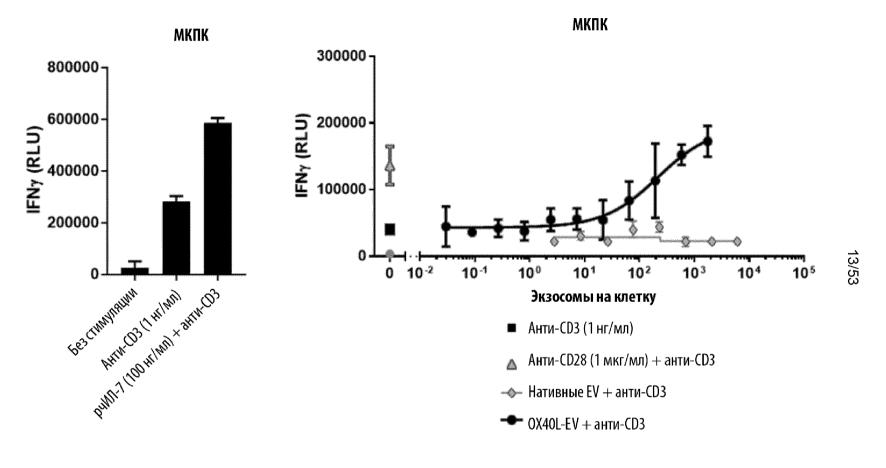
🍑 ОХ40L-EV + анти-CD3

Фиг. 11В

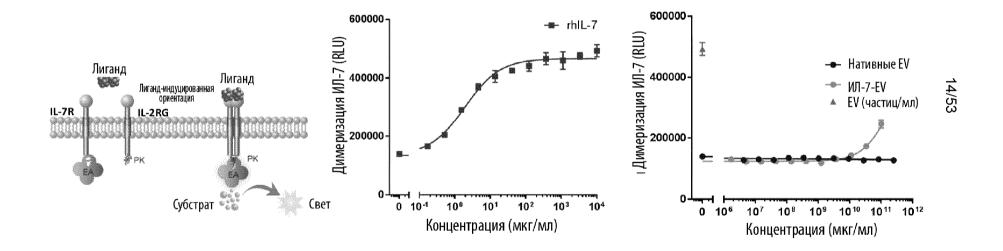
Фиг. 11А

12/53

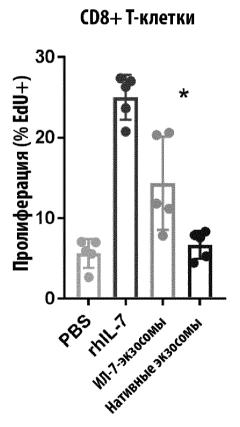




Фиг. 13А Фиг. 13В

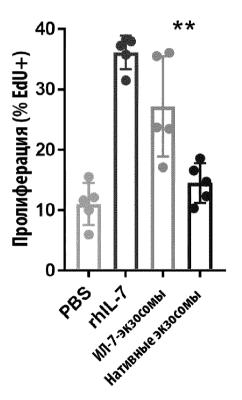


Фиг. 15А



Фиг. 15В

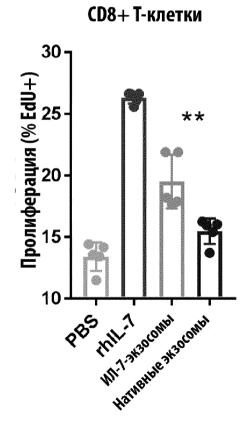


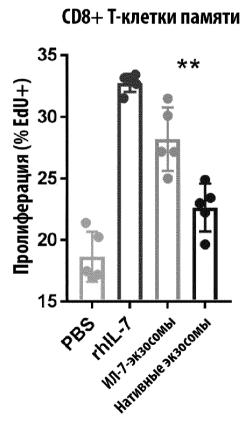


16

Фиг. 16А

Фиг. 16В





IL-7

PTGFRN

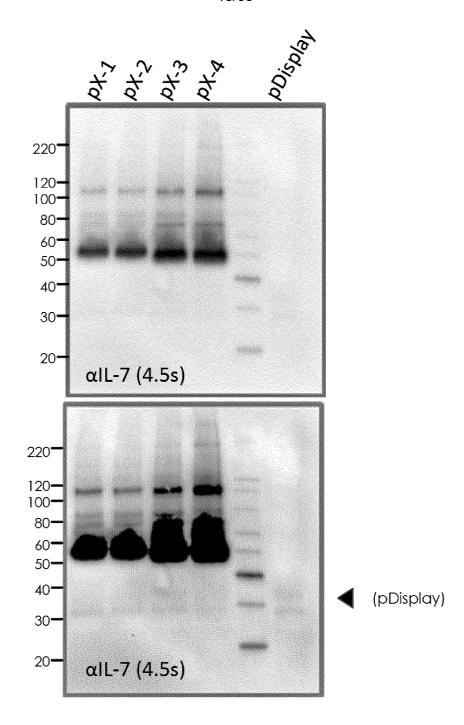
Фиг. 17А



Фиг. 17В

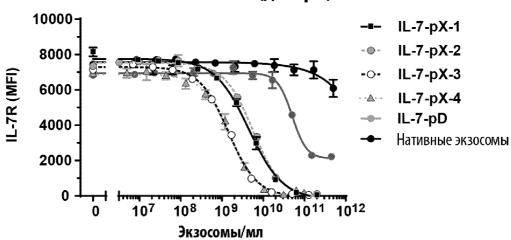
MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNC LNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCT GQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH SAGGGGSDYKDDDDKGGGGSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDM AFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSE DQDFGNYYCSVTPWVKSPTGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVI GLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRRERRRLMSMEMD

Метка FLAG-tag /линкер



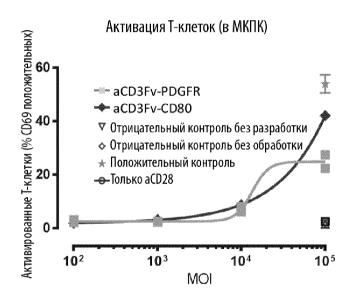
Фиг. 18А

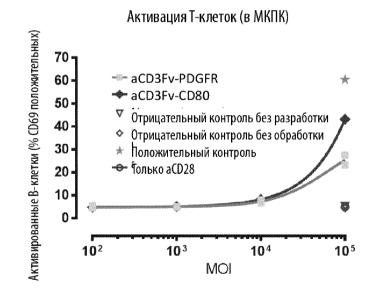
CD8+ Т-клетки (донор 1)



Фиг. 18В

Фиг. 19А



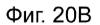


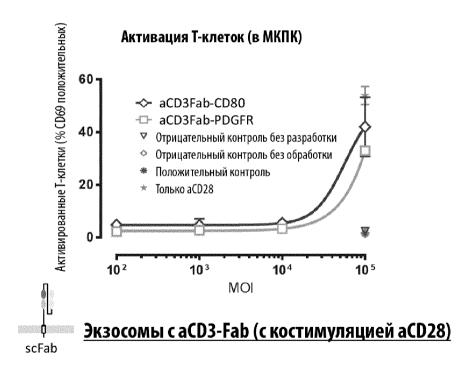
Фиг. 19В

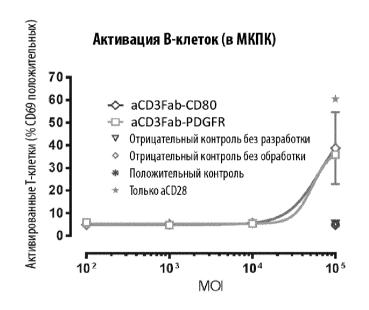


Экзосомы с aCD3-Fv (с костимуляцией aCD28)

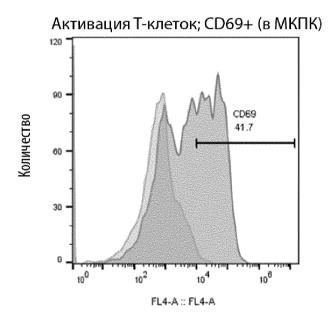
Фиг. 20А

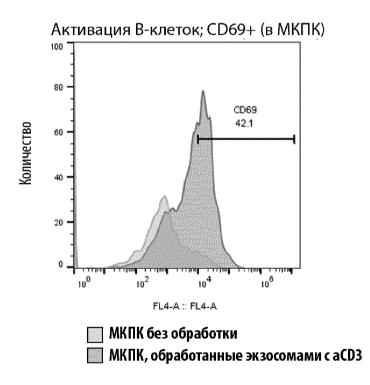






Фиг. 21А Фиг. 21В

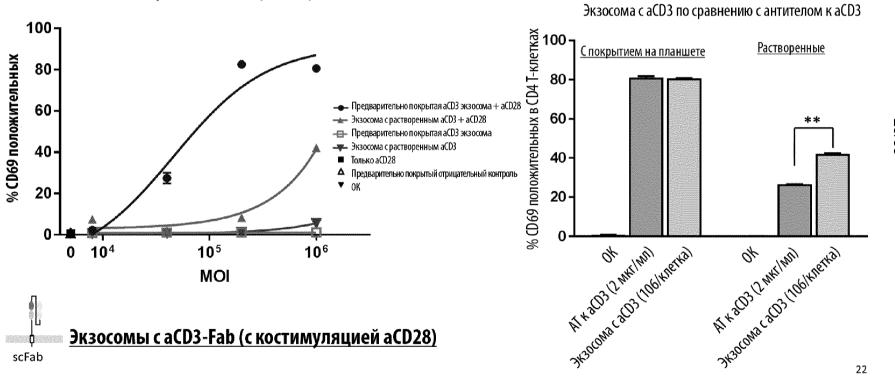




22

Фиг. 22В Фиг. 22А





Фиг. 23А

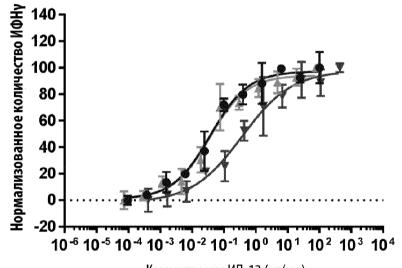
Фиг. 23В





Фиг. 24А Фиг. 24В



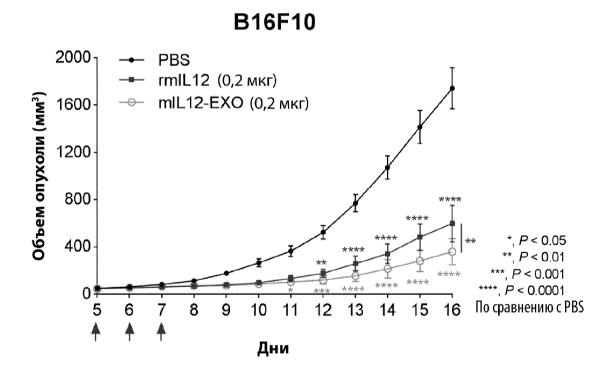


Концентрация ИЛ-12 (нг/мл)

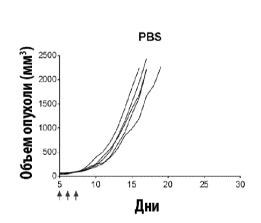
- -- rhIL-12
- → 871 (IL12-PTGFRN)
- ▼ 873 (IL12-short-PTGFRN)

МКПК	Среднее значение EC50 (n = 2)	Положение
rhIL12	0.029	
871 (IL12-PTGFRN)	0.022	1
873 (IL12-short-PTGFRN)	0.219	2

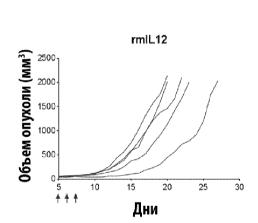
Фиг. 25



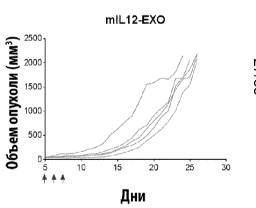




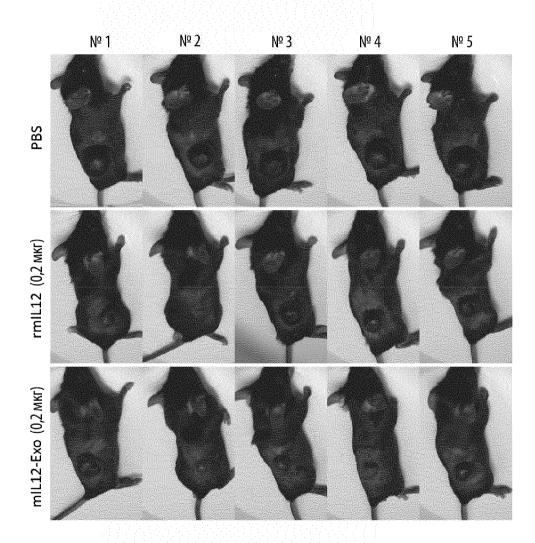
Фиг. 26А



Фиг. 26В

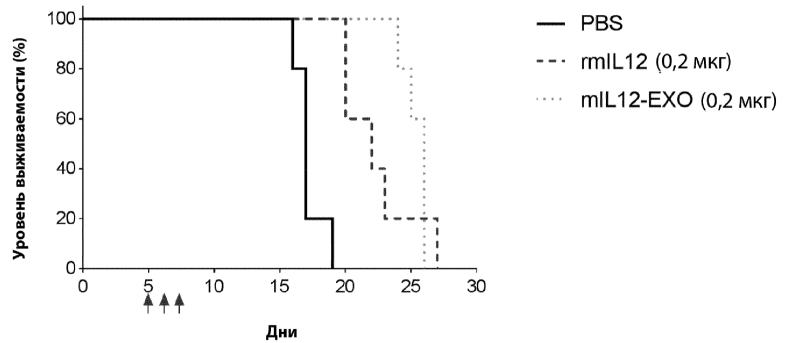


Фиг. 26С

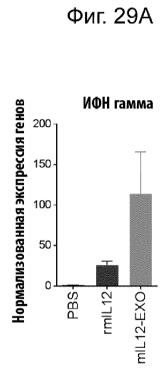


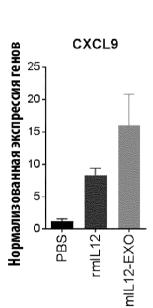
Фиг. 27

Фиг. 28

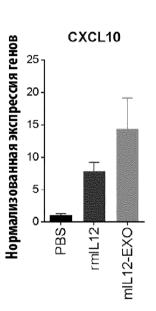




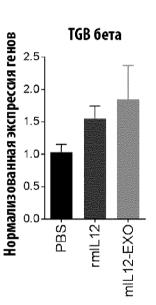




Фиг. 29В

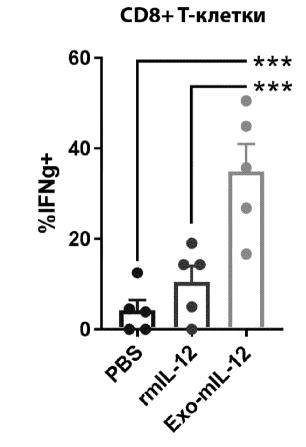


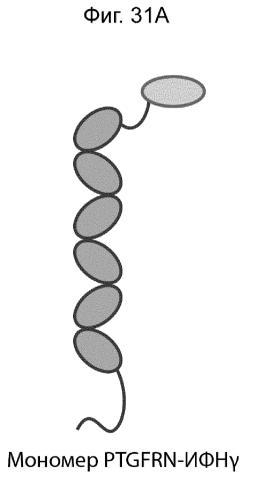
Фиг. 29С

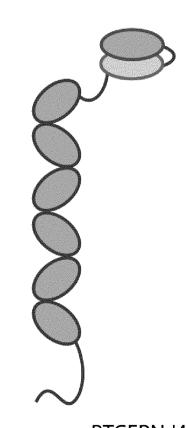


Фиг. 29D

Фиг. 30



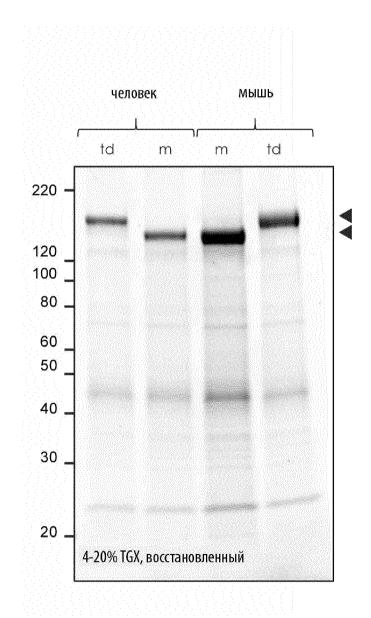




Фиг. 31В

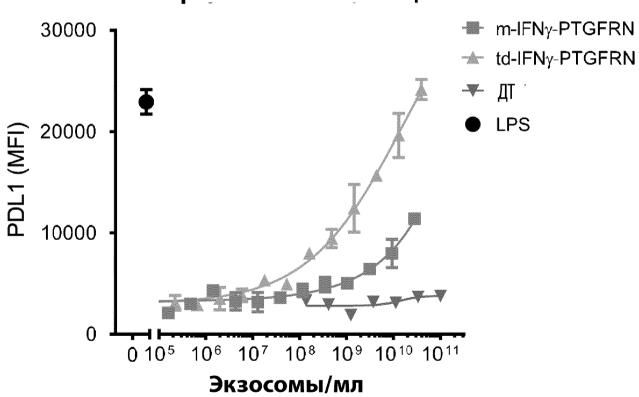
Тандемный мономер PTGFRN-ИФНү

Фиг. 32

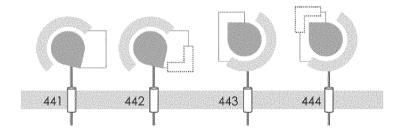


Фиг. 33



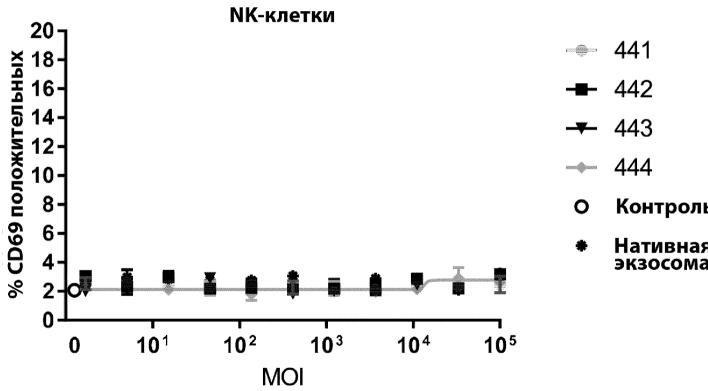


Фиг. 34

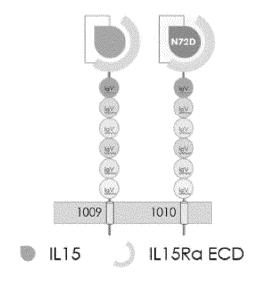




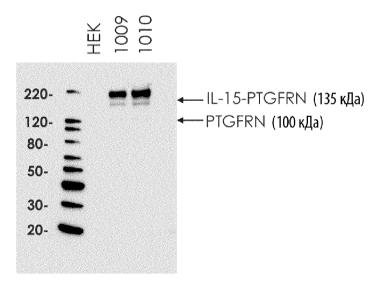




Фиг. 36А

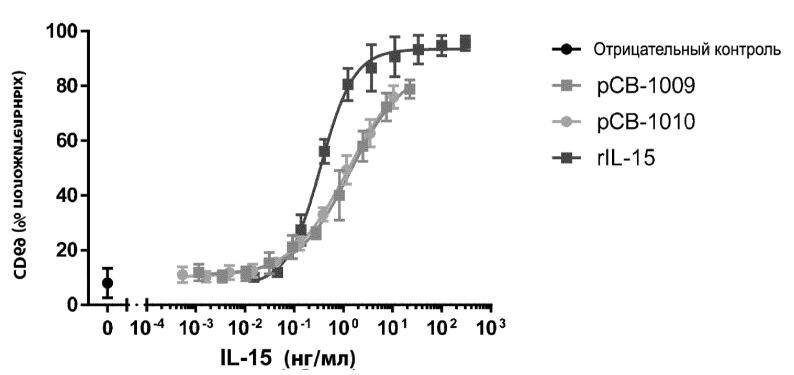


Фиг. 36В

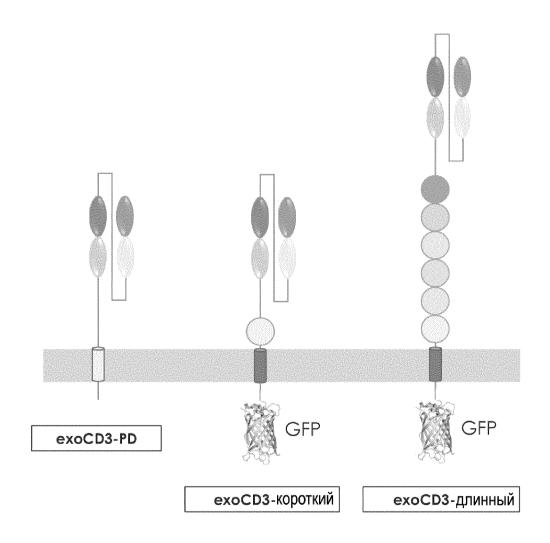


Анти-PTGFRN WB



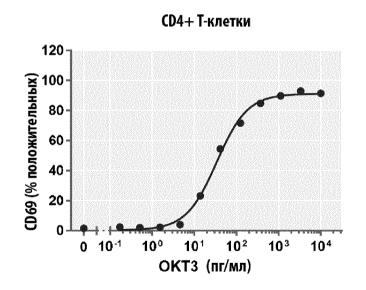


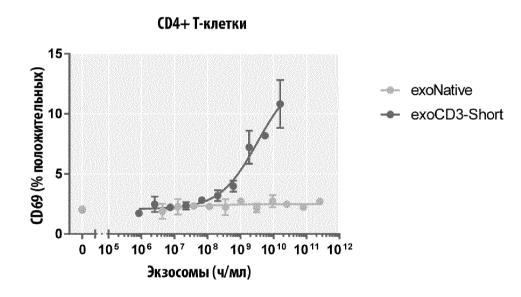
Фиг. 38



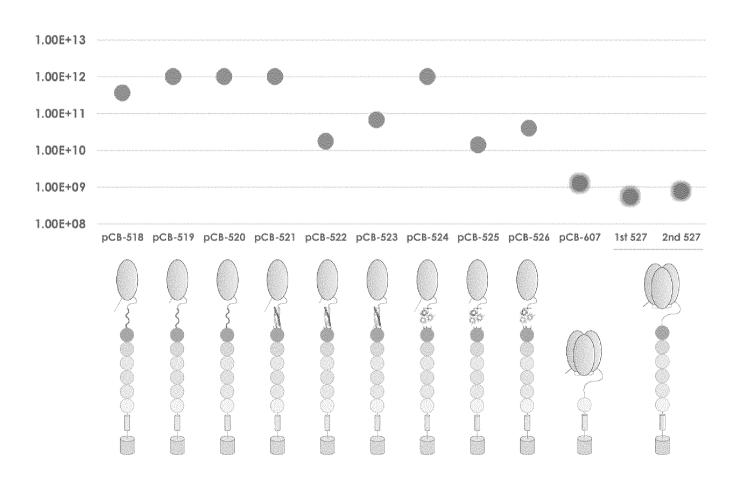
Фиг. 40А

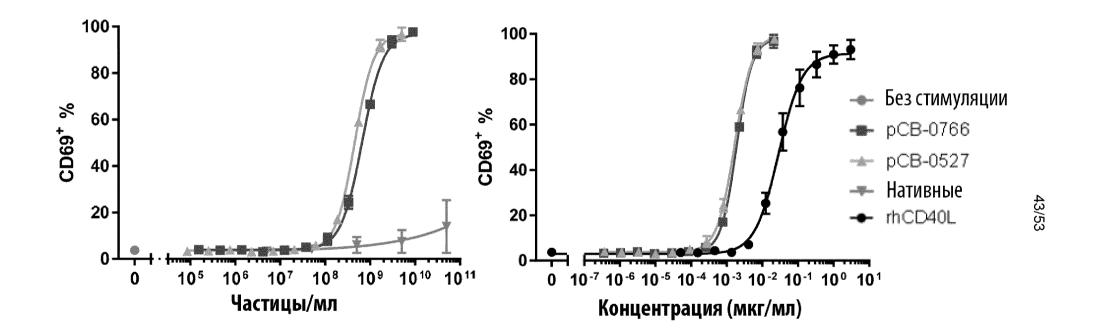
Фиг. 40В



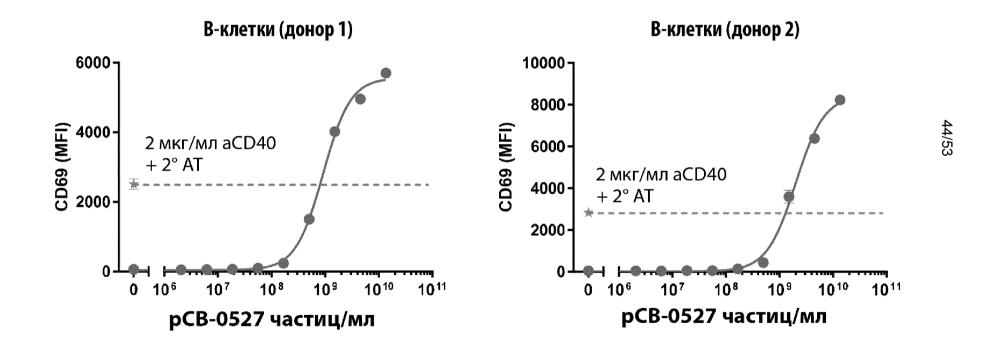


Фиг. 41

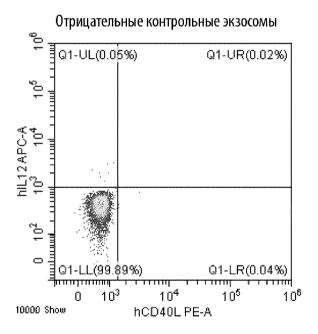




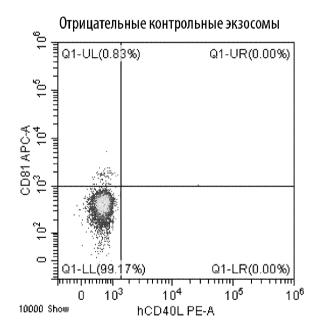




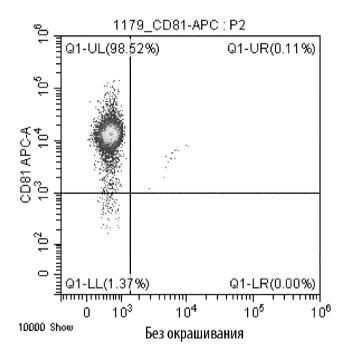
Фиг. 44А



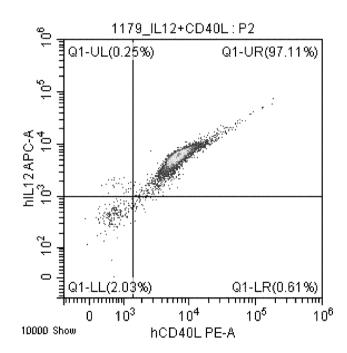
Фиг. 44В



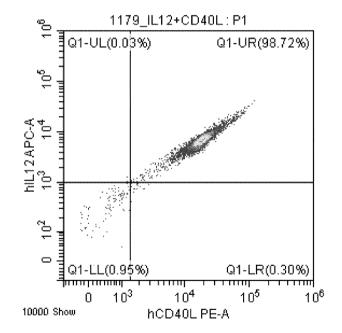
Фиг. 45А

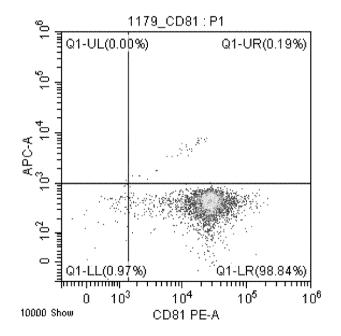


Фиг. 45В



Фиг. 46А Фиг. 46В

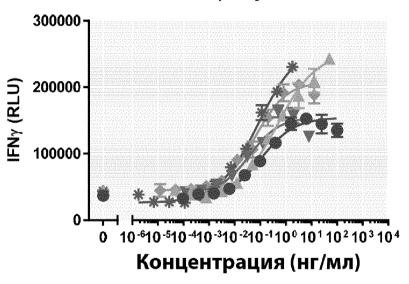




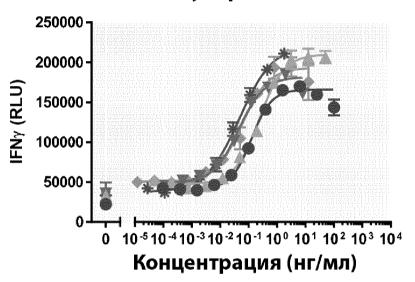
Фиг. 47А

Фиг. 47В





МКПК 2, стимулированные aCD3

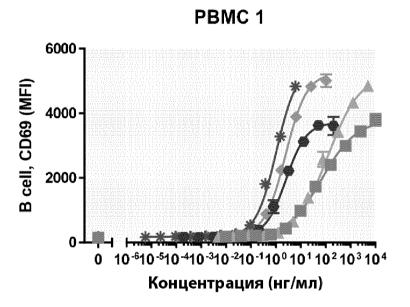


- rhlL12
- → rhIL12*+rhCD40L
- Exo-hIL12
- * Exo-hIL12/CD40L (1179)
- Exo-hIL12*+Exo-hCD40L

Фиг. 48

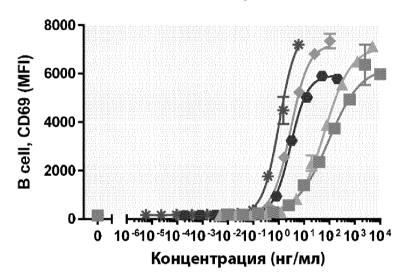
EC50 (нг/мл)	rhIL12	rhIL12+rhCD40L	Exo-hIL12	Exo-hIL12/CD40L (1179)	Exo-hIL12+Exo-hCD40L
Донор 1	0.111	0.466	0.038	0.085	0.065
Донор 2	0.124	0.233	0.034	0.047	0.058
Среднее	0.117	0.349	0.041	0.066	0.062

Фиг. 49А



Фиг. 49В





- ---- rhCD40L
- rhIL12+rhCD40L*
- Exo-hCD40L
- * Exo-hIL12/CD40L (1179)
- Exo-hIL12+Exo-hCD40L*

Фиг. 50

EC50 (нг/мл)	rhCD40L	rhIL12+rhCD40L*	Exo-hCD40L	Exo-hlL12/CD40L (1179)	Exo-hIL12+Exo-hCD40L*
Донор 1	70.08	124.9	2.518	1.034	2.441
Донор 2	91.75	64.76	2.946	1.053	2.939
Среднее	80.915	94.830	2.732	1.044	2.690

Фиг. 51А Фиг. 51В Фиг. 51с

