



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.04.05

(21) Номер заявки  
201691448

(22) Дата подачи заявки  
2015.01.20

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*C12N 15/88* (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОСОМЫ, ГИБРИДОСОМА, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ ПОМОЩИ СПОСОБА, И СПОСОБ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ИЛИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА

(31) 61/929,559

(32) 2014.01.21

(33) US

(43) 2016.12.30

(86) PCT/IB2015/050436

(87) WO 2015/110957 2015.07.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
АНДЖАРИУМ БАЙОСАЙЕНСИЗ АГ  
(CH)

(72) Изобретатель:  
Де Бир Жозель (CH)

(74) Представитель:  
Носырева Е.Л. (RU)

(56) CARLO A. PALMERINI ET AL.: "Role of Cholesterol, DOTAP, and DPPC in Prostate/Spermatozoa Interaction and Fusion", JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 211, no. 3, 7 November 2006 (2006-11-07), pages 185-190, XP019458441, ISSN: 1432-1424, DOI: 10.1007/S00232-006-0009-2, page 185, left-hand column - page 188, right-hand column, paragraph 3; figures 1-5 page 189, right-hand column, last paragraph - page 190, left-hand column, paragraph 1

DE LA PEÑA H. ET AL.: "Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 344, no. 2, 31 May 2009 (2009-05-31), pages 121-132, XP027416274, ISSN: 0022-1759 [retrieved on 2009-04-01], page 121, left-hand column, paragraph 1 - page 124, right-hand column, paragraph 1.3; figure 1, page 127, right-hand column, paragraph 2.1 - page 128, right-hand column, paragraph 2.2, page 130, right-hand column, paragraph 2.4 - page 131, left-hand column, paragraph 3

DATABASE MEDLINE [Online], US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 31 May 2009 (2009-05-31), DE LA PEÑA HUGO ET AL.: "Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology.", XP002742428, Database

accession no. NLM19345222, abstract & JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 31 MAY 2009, vol. 344, no. 2, 31 May 2009 (2009-05-31), pages 121-132, ISSN: 1872-7905

DATABASE BIOSIS [Online], BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; May 2009 (2009-05), DE LA PEÑA HUGO ET AL.: "Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology", XP002742431, Database accession no. PREV200900422586, abstract & JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 344, no. 2, May 2009 (2009-05), pages 121-132, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2009.03.011

SHUBHADEEP BANERJEE ET AL.: "Poly(styrene-co-maleic acid)-based pH-sensitive liposomes mediate cytosolic delivery of drugs for enhanced cancer chemotherapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 436, no. 1-2, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 786-797, XP055200618, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.059, page 786, paragraph 1 - page 787, page 795, paragraph 4

WO-A1-2013048734

US-A1-2013053426

K. YUYAMA ET AL.: "Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- by Microglia", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 14, 30 March 2012 (2012-03-30), pages 10977-10989, XP055200773, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.324616, page 10977, right-hand column, last paragraph - page 10978, left-hand column, paragraph 1, page 10983, left-hand column, last paragraph - page 10984, left-hand column, paragraph 2, figure 4

WO-A1-2011097480

US-A1-2011251156

ROOPA HEBBANDI NANJUNDAPPA ET AL.: "Novel CD8T cell-based vaccine stimulates Gp120-specific CTL responses leading to therapeutic and long-term immunity in transgenic HLA-A2 mice", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 30, no. 24, 25 March 2012 (2012-03-25), pages 3519-3525, XP028487785, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2012.03.075 [retrieved on 2012-03-30], page 3520, left-hand column, paragraph 2, page 3524, right-hand column, paragraph 1 - left-hand column, paragraph 2

US-A1-2013195765

WO-A2-2008092153

(57) Настоящим изобретением обеспечивается способ получения гибридного биологически совместимого носителя (гибридосомы), причем указанный способ включает (а) обеспечение первой везикулы, содержащей мембрану и одно или более терапевтических и/или диагностических

средств; (b) обеспечение второй везикулы, содержащей липидный бислои; и (с) приведение в контакт указанной первой везикулы с указанной второй везикулой. Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается гибридный биологически совместимый носитель, полученный при помощи способа, описанного выше, а также способ доставки терапевтического или диагностического средства в клетку, включающий приведение в контакт указанной клетки с гибридной.

037503 B1

037503 B1

---

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических биологически совместимых носителей и направленной доставки активных средств для терапевтических, профилактических, визуализационных и диагностических применений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения гибридысомы, гибридысоме, полученной при помощи способа, и способу доставки терапевтического или диагностического средства.

### Уровень техники настоящего изобретения

Современные подходы терапии лекарственными средствами преимущественно основываются на разработке новых терапевтических молекул, а также на усовершенствовании схем комплексной терапии. Тем не менее, клиническая эффективность этих подходов по определению ограничивается их физико-химическими, фармакокинетическими свойствами и свойствами перекрестной реактивности, непроизвольно вытекающими из ограниченной концентрации в предполагаемом месте действия и широкого обих биораспределения.

Стремясь справиться с этой проблемой, новая команда из области нанотехнологии облегчает доставку молекул лекарственного средства к нездоровым органам, тканям и/или клетки. Наиболее передовые вдохновленные нанотехнологией платформы для доставки лекарственного средства фокусируются на захвате терапевтически активных молекул в системах-носителях на основе синтетических липидов. Инкапсулирование облегчает отделение лекарственного средства от окружающей среды *in vivo*, тем самым преодолевая неидеальные свойства лекарственного средства, в том числе ограниченную растворимость, стабильность в сыворотке, период полувыведения из кровотока и биораспределение.

Идеальный синтетический наноноситель, который состоит из нетоксичных составляющих и специфично интернализуется клетками-мишенями, на данный момент остается труднодостижимым. Таким образом, эти системы не используют полный потенциал, который может обеспечить нанотехнология. Понимание того, как молекулы передаются в природе, может обеспечить схему эффективных и биологически совместимых сред для доставки лекарственного средства.

Известно, что клетки обмениваются информацией посредством секреции растворимых факторов или путем непосредственного взаимодействия. В ходе недавних исследований пришли к выводам, что клетки также высвобождают происходящие из мембраны везикулы, которые оказывают воздействие как на близлежащие, так и на отдаленные клетки (Marcus & Leonard, 2013). Эти внеклеточные везикулы секретируются большинством клеток и являются физиологическими составляющими большинства биологических жидкостей (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012). Внеклеточные везикулы включают в себя подтипы апоптозных телец, микровезикул и экзосом (EL Andaloussi, Mäger, Breakefield, & Wood, 2013).

Хотя исследования того, каким образом внеклеточные везикулы могут действовать в качестве медиаторов межклеточного взаимодействия, пока еще находятся на начальных стадиях, изучение их характерной роли в доставке биологически активной нагрузки от клеток-"доноров" к клеткам-"реципиентам" обеспечивает ценную информацию для понимания сложности оптимальной доставки лекарственного средства. В различных исследованиях идентифицировали несколько условий, при которых внеклеточные везикулы могут функционировать в качестве терапевтических носителей. Существует все больше доказательств, что эти носители обладают определенными характеристиками, дающими им превосходство с точки зрения фармацевтики перед синтетическими носителями для лекарственных средств. Особое значение для этого превосходства имеет набор мембранных белков и определенных липидов, интегрированных в состав поверхности внеклеточных везикул.

Существует несколько трудностей, которые затрудняют использование или имитацию природных носителей для эффективных систем для доставки лекарственного средства. Наиболее примечательно, превращение внеклеточных везикул из средств доставки сигналов в носители для лекарственного средства требует введения терапевтических или диагностических молекул, экзогенных по отношению к клетке-"донору". Соответствующие методики конструирования, предлагаемые к настоящему времени, включают применение процедур биоинженерии в отношении клеток-"доноров" (т.е. генетической модификации, вирусной трансфекции, липофекции токсичными катионными липидами и т.д.), а также сильных или повреждающих механизмов манипуляции, применяемых к выделенным везикулам (т.е. электропорации, химических агентов для конъюгирования и т.д.). Эти способы, в конечном итоге, повышают обеспокоенность в отношении безопасности, а также возможности масштабирования и затрудняют перевод в клиническую практику. Другие важные проблемы, которые все еще нужно решить, включают контроль над структурной целостностью носителя, эффективное инкапсулирование активной нагрузки и встраивание дополнительных нацеливающих фрагментов.

В идеальном случае изощренные биомиметические подходы к функционализации, требующие включения многочисленных биологически активных компонентов мембраны в синтетические наноносители, можно обойти, если будут использоваться интактные мембраны внеклеточных везикул. Напротив, для преодоления губительных последствий биотехнологических протоколов введения терапевтических, а также нацеливающих компонентов, экзогенных по отношению к внеклеточным везикулам, предпочтительно должны быть независимыми от манипуляций с клетками. Исходя из этих принципов,

полезной может быть замена методик биоинженерии нанотехнологическими стратегиями, используемыми в современных системах для доставки лекарственного средства на основе наночастиц.

С учетом вышеупомянутых недостатков целью настоящего изобретения является обеспечение нового фармацевтического носителя с хорошо определенными характерными свойствами, без недостатков носителей из уровня техники при синергичном суммировании преимуществ получаемых ex-vivo синтетических наносителей и встречающихся in vivo внеклеточных везикул.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, содержащей указанный новый фармацевтический носитель.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение применений и способов на основе указанного нового фармацевтического носителя или фармацевтического средства, содержащего его, для лечения, мониторинга, предупреждения, определения стадии и/или диагностики заболевания или состояния.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения указанного нового фармацевтического носителя контролируемым образом, включая чувствительные к стимулу модули.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа доставки одного или более биологически активных средств в клетку, более конкретно, в клетку, выбранную из лейкоцита, глиальной клетки и стволовой клетки.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения вышеуказанного фармацевтического носителя контролируемым образом, включая чувствительные к стимулу модули.

Дополнительные цели и преимущества настоящего изобретения будут изложены в нижеприведенном описании.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящим изобретением обеспечивается способ получения гибридного биологически совместимого носителя (гибридосомы), причем указанный способ включает:

(а) обеспечение первой везикулы, содержащей мембрану и одно или более терапевтических и/или диагностических средств, инкапсулированных в указанной первой везикуле, при этом указанная первая везикула была получена in vitro, при этом указанная первая везикула выбрана из группы, включающей наночастицы на основе липидов (LNP), липосомы, стабилизированные полимером LNP, церасомы, сфингосомы, ниосомы, полимеросомы, стабилизированные синтетическими наночастицами LNP, гибридные наночастицы по типу ядро-оболочка на основе липида-полимера, природные полученные из мембраны LNP и природные покрытые мембраной LNP, и при этом указанная первая везикула содержит по меньшей мере один фузогенный фрагмент, который обеспечивает возможность или усиливает разрушение мембраны или смешивание липидов между мембраной и липидным бислоем, при этом по меньшей мере один фузогенный фрагмент является ионизируемым катионным липидом, содержащим по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу так, что липид становится положительно заряженным при pH около или ниже физиологического pH и нейтральным при pH около или выше физиологического pH;

(b) обеспечение второй везикулы, содержащей липидный бислой, которая продуцируется in vivo и высвобождается во внеклеточную среду; и

(c) приведение в контакт указанной первой везикулы с указанной второй везикулой при pH ниже 7,4 и при температуре от 0 до 60°C, тем самым объединяя указанную первую везикулу с указанной второй везикулой и получая указанную гибридосому.

Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается гибридный биологически совместимый носитель, полученный при помощи способа, описанного выше.

Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается способ доставки терапевтического или диагностического средства в клетку, включающий приведение в контакт указанной клетки с гибридосомой.

#### **Краткое описание графических материалов**

Вышеизложенные и другие характеристики, а также преимущества настоящего изобретения будут более понятны из следующих примеров и с учетом приложенных графических материалов, где:

фиг. 1 представляет собой график, на котором приведены спектры оптического поглощения в УФ и видимой области спектра для Au-iLNP, маточного раствора Au и iLNP;

фиг. 2 представляет собой полученное с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) изображение Au-iLNP (масштабная метка: 100 нм);

фиг. 3 представляет собой гистограмму диаметров GBM-экзосом и пустых iLNP (полученных с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA));

фиг. 4 представляет собой график, на котором показан средний размер частиц после смешивания GBM-экзосом и iLNP в неионизирующих условиях (pH 7,4) или в буфере для слияния (pH 5,5) (получен с помощью динамического рассеяния света (DLS));

фиг. 5 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для GBM-экзосом и iLNP с варьирующими условиями pH буфера;

фиг. 6 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использова-

- нием R18 для GBM-экзосом и iLNP, содержащих DLinDMA в концентрации 0, 30, 40 или 50%;
- фиг. 7 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для GBM-экзосом и iLNP, содержащих ионизируемый липид DODAP или DLinDMA;
- фиг. 8 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для GBM-экзосом и iLNP, содержащих PEG-липид в варьирующей концентрации;
- фиг. 9 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для GBM-экзосом и iLNP при варьирующих температурах;
- фиг. 10 представляет собой график, полученный посредством флуоресцентной кросс-корреляционной спектроскопии (FCCS) смеси GBM-экзосом и iLNP при pH 5,5;
- фиг. 11 представляет собой график, на котором показано зависящее от времени изменение среднего диаметра частиц в смеси GBM-экзосом и iLNP при pH 5,5, отслеживаемое с помощью динамического рассеяния света (DLS);
- фиг. 12 представляет собой график, на котором показано зависящее от времени изменение среднего диаметра частиц и коэффициент полидисперсности смеси MCL-экзосом и iLNP при pH 5,5, отслеженное с помощью динамического рассеяния света (DLS);
- фиг. 13 отображает пять гистограмм, на которых показаны распределения частиц в смесях iLNP и экзосом после 3, 5, 7, 9 и 18 мин смешивания при pH 5,5;
- фиг. 14 представляет собой график, на котором показано наложение распределений по размеру, полученных с помощью NTA, для iLNP, экзосом и гибридов;
- фиг. 15 представляет собой график, на котором показан анализ с помощью проточной цитометрии клеток, экспрессирующих GFP, через 72 ч после трансфекции эквивалентными количествами pDNA в iLNP, неслитыми iLNP с экзосомами и гибридами. По оси времени указаны значения времени трансфекции;
- фиг. 16 представляет собой график, на котором показано определенное с помощью DLS среднее количество фотонов в секунду, указывающее на присутствие наночастиц в каждой фракции pDNA-iLNP по плотности в градиенте сахарозы;
- фиг. 17 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа с помощью проточной цитометрии клеток, экспрессирующих GFP, через 72 ч после трансфекции частицами объединенных фракций разной плотности;
- фиг. 18 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа с помощью проточной цитометрии клеток, экспрессирующих GFP, через 72 ч после трансфекции эквивалентными количествами очищенных гибридов. По оси времени указаны значения времени трансфекции;
- фиг. 19 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа с помощью проточной цитометрии при 24-часовом инкубировании очищенных IgG гибридов, меченных вторичными антителами к IgG (контроль: светло-серый, вторичное антитело к IgG: серый);
- фиг. 20 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для экзосом и iLNP, содержащих олигонуклеотиды;
- фиг. 21 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для экзосом и твердых наночастиц, инкапсулированных в iLNP, или олигонуклеотидов/наночастиц, совместно инкапсулированных в iLNP;
- фиг. 22 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для экзосом и белка, инкапсулированного в iLNP;
- фиг. 23 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для экзосом и iLNP с модифицированной поверхностью;
- фиг. 24 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием пирена для MCL-экзосом, самих по себе или смешанных с iLNP, произведенных с помощью быстрого смешивания в микропоточковой системе или с помощью экструзии;
- фиг. 25 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 для пустых iLNP и меченных PMN-MV в буфере для слияния или буфере с pH 7,4, а также iLNP, инкапсулирующих разные виды нагрузки;
- фиг. 26 представляет собой график, на котором показаны результаты анализа слияния с использованием R18 пустых iLNP и меченных PLT-MV в буфере для слияния или буфере с pH 7,0; и
- фиг. 27 представляет собой гистограмму, на которой показана средняя интенсивность флуоресценции для клеток Jekol, трансфицируемых в течение 1 ч гибридами, полученными из меченных NBD iLNP, или мечеными NBD iLNP самими по себе (n=160 клеток, "усами" на графике указывается среднеквадратичная ошибка).

#### **Подробное описание изобретения**

В контексте настоящего изобретения под первой везикулой следует понимать EDEM, а под второй везикулой - BDM.

В первом аспекте настоящим изобретением обеспечивается гибридный биологически совместимый носитель (гибридосома), который содержит структурные и биологически активные элементы, происходящие по меньшей мере из одного биологически совместимого модуля для доставки (BDM) и по мень-

шей мере одного сконструированного модуля для инкапсулирования лекарственного средства (EDEM), содержащего по меньшей мере один регулируемый фузогенный фрагмент.

Используемые в данном документе термины "гибридный биологически совместимый носитель" или "гибридосома" относятся к гибриднему биологически совместимому носителю, который содержит структурные и биологически активные элементы (например, липиды, углеводы, жирные кислоты, полинуклеотиды или полипептиды), происходящему по меньшей мере из одного биологически совместимого модуля для доставки (BDM) (например, экзосом, микровезикул, апоптозных телец) и по меньшей мере одного сконструированного модуля для инкапсулирования лекарственного средства (EDEM), содержащего регулируемый фузогенный фрагмент. В конкретном варианте осуществления внутренний объем гибридосомы содержит по меньшей мере одно биологически активное средство, происходящее из BDM, секретируемого *in vivo*. (например, эндогенные полинуклеотиды, ферменты или полипептиды) и по меньшей мере одно биологически активное средство, инкапсулированное в EDEM, произведенном *in vitro*. В другом варианте осуществления внутренний объем гибридосомы содержит только натуральные компоненты, которые происходят из BDM и могут подвергаться дополнительной обработке. Гибридосома согласно настоящему изобретению является результатом объединения одного BDM с одним EDEM, нескольких BDM с одним EDEM, нескольких EDEM с одним BDM или нескольких BDM с несколькими EDEM. Процесс объединения можно контролировать по размеру BDM и EDEM, их соответствующим зарядам и условиям, применяемым в ходе реакции объединения, как, например соотношение BDM/EDEM, pH, температура и время реакции. Такая модульная стратегия для сборки новой композиции из отдельных единиц может предлагать новый уровень гибкости при конструировании. Это соединение передающих и терапевтических компонентов может придавать получаемому в результате гибриднему носителю уникальные характеристики, которые в ином случае не достижимы для отдельных систем.

Используемый в данном документе термин "биологически совместимый модуль для доставки (BDM)" относится к секретируемой в естественных условиях везикуле, содержащей липидный бислой, который продуцируется *in vivo* и высвобождается во внеклеточную среду. BDM секретируются различными типами клеток, в том числе, без ограничения, эпителиальными клетками, опухолевыми клетками и другими иммунными клетками (например, тучными клетками, T- и B-лимфоцитами, дендритными клетками). Применяемые в настоящем изобретении BDM либо выделяют из физиологических жидкостей или образца ткани, взятого у субъекта, предпочтительно субъекта-человека, либо выделяют из культуральных сред. В одном конкретном варианте осуществления BDM, применяемые в настоящем изобретении, получают из клеточной культуры, где клетки либо являются клетками в естественном состоянии, либо были ранее подвергнуты воздействию процедур иммортализации и/или конструирования. Клеточная культура может быть гомогенной (один тип клеток) или гетерогенной (несколько типов клеток) и может состоять из выделенных клеток и/или тканей. BDM можно выделить или получить из организма, в том числе прокариот, эукариот, бактерий, грибов, дрожжей, беспозвоночных, позвоночных, рептилий, рыб, насекомых, растений и животных. Среды, взятые от культивируемых клеток ("кондиционированные среды", среды от клеток или среды культивирования клеток), могут представлять собой биологическую жидкость.

BDM можно собирать и выделять с помощью способов, известных специалисту в данной области. Например, BDM можно собирать из клеточной культуры или тканевого супернатанта с помощью одной или более методик, выбранных из группы, включающей, без ограничения, дифференциальное ультрацентрифугирование, ультрацентрифугирование в градиенте, фильтрование, фильтрование в тангенциальном потоке (TFF), фильтрование через трековую мембрану при низком давлении и их комбинации. В одном варианте осуществления применяемые в настоящем изобретении BDM получают путем центрифугирования культурального супернатанта для осаждения нежелательных обломков клеток с последующим ультрацентрифугированием для осаждения экзосом, ультрацентрифугированием в градиенте плотности (например, с использованием градиента сахарозы) или комбинацией этих способов.

BDM, пригодные для настоящего изобретения, варьируют в размере от приблизительно 30 до приблизительно 2000 нм и могут содержать биологически активные молекулы (например, полинуклеотид и/или полипептиды). Примеры BDM включают, без ограничения, "экзосомы" (диаметром от приблизительно 30 до приблизительно 200 нм), "микровезикулы" (диаметром от приблизительно 100 до приблизительно 2000 нм) и "апоптозные тельца" (диаметром от приблизительно 300 до приблизительно 2000 нм). Термин "BDM" используется взаимозаменяемо с терминами "экзосома", "микровезикула" или "апоптозное тельце", "мембранные частицы", "мембранные везикулы", "экзосомообразные везикулы", "эктосомообразные везикулы", "эктосомы" или "экзовезикулы". Липидный бислой BDM получают из мембран клетки-донора. BDM, полученные из разных типов клеток, могут проявлять отличия в липидном составе по сравнению с плазматической мембраной. В ходе образования экзосом трансмембранные и периферические мембранные белки могут быть включены в мембрану везикулы, и в то же время цитозольные компоненты также могут внедряться в везикулы.

Используемый в данном документе термин "эндогенный" относится к соединению, в естественных условиях продуцируемому клеткой и полученному из клетки. Например, BDM содержит эндогенный

полипептид, если этот полипептид продуцировался внутри клетки, из которой получен BDM.

Используемый в данном документе термин "секретируемый в естественных условиях" применительно к носителю, частице, везикуле или молекуле относится к носителю, частице, везикуле или молекуле, которая высвобождается в окружающую среду из клетки, организма или ткани посредством процесса, имеющего место в природе. Например, секретиромой в естественных условиях является экзосома, которая может быть выделена из источника и которая не была физически перемещена за пределы границ источника человеком в лаборатории. Дополнительным неограничивающим примером процесса секреции частиц в естественных условиях является слияние внутриклеточной органеллы с клеточной мембраной или "пузырение" клеточной мембраны.

Используемый в данном документе термин "сконструированный модуль для инкапсулирования лекарственного средства (EDEM)" относится к везикуле, содержащей одну или более мембран, которые были получены *in vitro*. Пригодные в настоящем изобретении EDEM выбраны из, без ограничения, наночастиц на основе липидов (LNP), липосом, стабилизированных полимером LNP, цerasом, сфингосом, ниосом, полимеросом, стабилизированных синтетическими наночастицами LNP, гибридных наночастиц по типу ядро-оболочка на основе липида-полимера, природных полученных из мембраны LNP, быстро разрушаемых липидных наночастиц (reLNP) и природных покрытых мембраной LNP. Применяемые в настоящем изобретении EDEM характеризуются по меньшей мере одним структурным свойством, которое обеспечивает возможность их контролируемого объединения с BDM. В одном варианте осуществления указанное структурное свойство обеспечивается одним или более составляющими липидного бислоя(бислоев) EDEM. В одном конкретном варианте осуществления применяемый в настоящем изобретении EDEM является ионизируемым LNP (iLNP).

Применяемые в настоящем изобретении EDEM могут иметь разнообразную морфологию. Они могут содержать либо один липидный бислой (однослойная везикула), группу концентрических бислоев, разделенных узкими водными ячейками (многослойная везикула или MLV), либо мембранообразующие полимеры. Более того, в отличие от BDM, EDEM являются практически однородными в плане распределения по размеру и плотности. Применяемые в данном случае EDEM характеризуются диаметром (средний диаметр частиц) от приблизительно 15 до приблизительно 500 нм. В некоторых вариантах осуществления EDEM характеризуются диаметром, составляющий приблизительно 300 нм или менее, 250 нм или менее, 200 нм или менее, 150 нм или менее, 100 нм или менее или 50 нм или менее. В одном конкретном варианте осуществления EDEM, применяемый в настоящем изобретении, характеризуется диаметром от приблизительно 15 до приблизительно 150 нм.

Пригодные в настоящем изобретении EDEM производят таким образом, чтобы они проявляли конкретные физико-химические характеристики. Физико-химические характеристики каждого конкретного EDEM могут варьировать в соответствии с природой и концентрацией активного средства(средств), заключенного в него, состава мембраны у полимерной мембраны или липидного бислоя(бислоев), природы среды, в которой были диспергированы EDEM, их размера и полидисперсности. В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения EDEM содержат мембрану в виде липидного бислоя, включающую ионизируемые катионные липиды и вспомогательные липиды. В некоторых конкретных вариантах осуществления EDEM, применяемые для создания гибридосомы согласно настоящему изобретению, производят, исходя из молярного отношения DlinDMA:Chol:DSPC:PEG-Cer (молярное отношение 40:40:17,5:2,5).

Производство EDEM можно осуществлять посредством ряда способов, известных из уровня техники, которые раскрыты, например, в следующих источниках. Они включают, например, обработку ультразвуком, экструзию, воздействие высокого давления/гомогенизацию, микрофлюидизацию, диализ с детергентом, индуцированное кальцием слияние малых липосом и способы гидратирования липидных пленок. Например, LNP можно получить с помощью ранее описанного способа с использованием предварительно сформированных везикул (Mauger et al., 2001). Как правило, способ заключается в экструдировании LNP через поликарбонатную мембрану с узкими порами для уменьшения размеров LNP до четко определенного распределения по размеру, а на последующей стадии, если требуется, терапевтические средства загружаются в предварительно сформированные везикулы. В качестве альтернативы, EDEMS можно получить посредством самопроизвольной самосборки в микропоточковой системе. Протоколы получения четко определенного распределения по размеру с использованием таких методик производства известны из уровня техники (Belliveau et al., 2012). Предпочтительно EDEM, используемые в настоящем изобретении, являются практически однородными в плане распределения по размеру и плотности для облегчения разделения субпопуляций BDM и гибридосом. Разделение выполняют с помощью методик, хорошо известных из уровня техники, к примеру гель-хроматографии и центрифугирования в градиенте плотности. В одном конкретном варианте осуществления плотность EDEM ниже, чем у гибридосомы, тем самым способствуя отделению гибридных везикул от EDEM посредством центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Используемый в данном документе термин "фузогенный фрагмент" относится к фузогенным липидам или любым другим фузогенным компонентам EDEM или гибридосомы. Такой фузогенный фрагмент усиливает или обеспечивает возможность разрушения мембраны или смешивание липидов между мем-

браной и липидным бислоем. Например, первая мембрана может происходить из EDEM, тогда как вторая мембрана охватывает BDM. В качестве альтернативы первая мембрана может быть мембраной гибридо-сомы, тогда как вторая мембрана представляет собой мембрану на внешней поверхности клетки, эндосо-мальную мембрану, лизосомальную мембрану или ядерную мембрану. Фузогенный фрагмент повышает взаимодействие EDEM или гибридо-сомы, содержащей указанный фузогенный фрагмент, со второй мем-браной, тем самым способствуя смешиванию мембранных липидов, а также смешиванию внутреннего объема и инкапсулированного содержимого. В качестве альтернативы фузогенный фрагмент может по-вышать вхождение в компартмент клетки или выход из него. Такими компартментами могут быть, к примеру, эндосомы или ядро. В определенных вариантах осуществления фузогенный фрагмент может представлять собой, например, целенаправленно действующий фактор, такой как разрушающий мем-брану синтетический полимер или, например, pH-чувствительный полипептид, участвующий в переносе через мембрану (например, мелиттин). В некоторых вариантах осуществления фузогенный фрагмент может содержать фузогенный сегмент (например, головную группу липида, хвостовую группу липида, блок или участок полимера, сегмент пептида).

Под используемым в данном документе термином "регулируемый" подразумевают, что, варьируя условия реакции (например, pH, температуру, концентрацию солей) в способе согласно настоящему изобретению и/или варьируя количества фузогенных компонентов (например, ионизируемых липидов, фу-зогенного липида, pH-чувствительного полимера, вспомогательных липидов, фузогенного целенаправ-ленно действующего фрагмента) EDEM, можно селективно предоставлять сильные фузогенные свой-ства EDEM и/или BDM в ходе реакции объединения, в то же время сохраняя относительно более низкую способность к слиянию до или после объединения. Предпочтительно в каждом случае фузогенный фраг-мент может характеризоваться регулируемой способностью к слиянию в его желаемом количестве (на-пример, концентрации). Фузогенные характеристики фузогенного фрагмента можно определить с помо-щью подходящих анализов, известных из уровня техники. Например, способность к слиянию у полимера можно определить в клеточном анализе *in vitro*, как, например, в анализе гемолиза эритроцитов. Эндосо-молитическую активность полимера можно определить в клеточном анализе *in vitro*.

Термин "фузогенный липид" можно использовать по отношению к липидам, которые претерпевают изменение структуры и/или заряда при низком pH (т.е. при pH приблизительно 5,5) по сравнению с их зарядом или структурой при высоком pH (т.е. pH приблизительно 7,4), это приводит в результате к тому, что липид становится более фузогенным. Эти фузогенные липиды могут представлять собой анионные липиды, нейтральные липиды или чувствительные к pH липиды, которые характеризуются тем, что в случае, когда pH изменяется от примерно 7 до примерно 4 липид претерпевает такое изменение заряда или структуры, что становится более фузогенным. Изменение заряда или структуру также может проис-ходить в обратном направлении при изменении pH от примерно 4 до примерно 6. В других вариантах осуществления, если температура повышается выше температуры фазового перехода, например 20°C, фузогенный липид претерпевает такое изменение структуры, что принимает гексагональную или конусо-образующую структуру. Дополнительные фузогенные липиды этого типа известны из уровня техники, и их можно применять в составах, комплексах и способах, описанных в данном документе. Некоторые примеры этих "фузогенных" липидов меняют структуру, принимая гексагональную структуру, в то время как другие примеры этих липидов претерпевают изменение заряда. Эти фузогенные липиды также могут включать липиды, известные из уровня техники как "конусообразующие" липиды. Термин "фузогенный липид" также можно использовать для обозначения липидов, которые проявляют свойства формы моле-кулы, заключающиеся в образовании конуса таким образом, что остов липида содержит головную груп-пу с малым поперечным сечением и область ацильной цепи с большей площадью поперечного сечения. Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, предполагают, что выше конкретной температуры (на-пример, 20°C) эти липиды индуцируют фазовый переход к небислоидной гексагональной структуре H<sub>II</sub>.

Используемые в данном документе термины "липид" и "липоид" относятся к группе органических соединений, которые содержат полярную головную группу, которая связана с липофильной хвостовой группой через линкерную группу. Липиды обычно характеризуются как нерастворимые в воде, но рас-творимые во многих органических растворителях. Липиды обычно делятся по меньшей мере на три класса: "простые липиды", которые включают жиры и масла; "сложные липиды", которые включают фосфолипиды и гликолипиды; и "производные липидов", такие как стероиды. Термин "липид" и "липо-ид" можно использовать взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин "вспомогательный липид" относится к стабилизирую-щим липидам, включающим нейтральные липиды и анионные липиды. Некоторые EDEM, применяемые в настоящем изобретении, содержат один или более вспомогательных липидов или могут быть обогаще-ны одним или более вспомогательными липидами, такими как холестерин и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). Нейтральный липид относится к нескольким видам липидов, которые существу-ют либо в незаряженной, либо нейтральной цвиттер-ионной форме при физиологическом pH. Типичные липиды включают, без ограничения, дистеароил-фосфатидилхолин (DSPC), диолеил-фосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоил-фосфатидилхолин (DPPC), диолеил-фосфатидилглицерол (DOPG), дипальмито-ил-фосфатидилглицерол (DPPG), диолеил-фосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеил-

фосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоил-фосфатидилэтанолламин (POPE) и диолеоил-фосфатидилэтанолламин, дипальмитоил-фосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфо-этанолламин (DMPE), дистеароил-фосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтанолламин (SOPE) и 1,2-диэлаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (transDOPE). Анионный липид представляет собой липид, который характеризуется отрицательным зарядом при физиологическом pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерол, диацилфосфатидилсерин, кардиолипин и нейтральные липиды, модифицированные анионными модифицирующими группами.

Используемый в данном документе термин "ионизируемый катионный липид" относится к липиду, который несет суммарный положительный заряд при выбранном pH (например, ниже физиологического pH). Такие липиды включают, без ограничения, 1,2-дидолилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дидолилеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA), гептатриакон-та-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA), диоктадецил-диметиламмоний (DODMA), дистеарилдиметиламмоний (DSDMA), N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид (DODAC); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA); 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний-пропан (DODAP), N-(4-карбоксібенил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), YSK05, 4-(((2,3-бис-(олеилокси)пропил)-(метил)амино)метил)бензойная кислота (DOBAT), N-(4-карбоксібенил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), 3-((2,3-бис-(олеилокси)пропил)(метил)амино)пропановая кислота (DOPAT), N-(2-карбоксихл)пропан-1-аминий (DOMPAQ), N-(карбоксиметил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеилокси)пропан-1-аминий (DOAAQ), Alny-100, 3-(диметиламино)пропил(12Z,15Z)-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]генэйкоза-12,15-диеноат (DMAP-BLP) и 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Chol).

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый катионный липид может представлять собой аминоклипид. Используемый в данном документе термин "аминоклипид", как предполагается, включает такие липиды, которые содержат одну или две цепи жирной кислоты или жирного алкила и головную аминоклипидную группу (в том числе алкиламино- или диалкиламиногруппу), которая может быть протонирована с образованием катионного липида. В определенных вариантах осуществления аминоклипиды или катионные липиды согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу так, что липид становится положительно заряженным при pH около или ниже физиологического pH (например pH 7,4) и нейтральным при втором pH, предпочтительно около или выше физиологического pH. Конечно же, будет понятно, что присоединение или удаление протонов в зависимости от pH представляет собой равновесный процесс и что ссылка на имеющий заряд или нейтральный липид относится к природе преобладающей разновидности и не требует, чтобы весь липид присутствовал в заряженной или нейтральной форме. Липиды, которые содержат более чем одну протонируемую или депротонируемую группу или которые являются цвиттер-ионными, не исключаются из применения в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления катионный липид можно синтезировать с помощью способов, известных из уровня техники и/или описанных в публикациях международных заявок № WO 2012/040184, WO 2011/153120, WO 2011/149733, WO 2011/090965, WO 2011/043913, WO 2011/022460, WO 2012/061259, WO 2012/054365, WO 2012/044638, WO 2010/080724 WO 2010/21865 и WO 2014089239; а также в публикации заявки на патент США № US20140309277; причем каждый из источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Следует заметить, что термин "ионизируемый" относится к соединению, обладающему по меньшей мере одним ионизируемым участком в своей молекулярной структуре, и не обязательно означает "ионизированный", т.е. ионизируемый катионный липид может находиться либо в ионизированной, либо в неионизированной форме. В некоторых конкретных вариантах осуществления применяемые в настоящем изобретении EDEM содержат комбинацию ионизируемых катионных липидов, раскрытых выше (например, DLinDMA, DLin-KC2-DMA и/или DLin-MC3-DMA), для того, чтобы точно адаптировать суммарный заряд катионов на поверхности гибридом при физиологическом pH.

Термин "pH-чувствительный полимер" относится к полимеру, который при низком pH претерпевает изменения структуры или заряда по сравнению со своим зарядом или структурой при физиологическом pH (pH приблизительно 7,4), это приводит в результате к тому, что полимер становится более фузогенным. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления настоящего изобретения полимеры могут быть получены из гомополимеров алкилакриловых кислот, таких как бутилакриловая кислота (БАА) или пропилакриловая кислота (ПАА), или могут представлять собой сополимеры этилакриловой кислоты (ЕАА). Также можно применять полимеры на основе производных алкиламинов или алкильных спиртов в сополимерах малеинового ангидрида с метилвинилэфиром или стиролом. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть получены в виде сополимеров с другими мономерами. Добавление других мономеров может усилить эффективность полимеров или добавить химические группы с полезными функциональными свойствами для облегчения связывания с другими молекулярными элементами, в том числе с нацеливающим фрагментом и/или другими вспомогательными материалами, такими как поли(этиленгликоль). Эти сополимеры могут включать, без ограничения, сополимеры с мономерами,

содержащими группы, которые могут быть сшиты с нацеливающим фрагментом.

В целом, pH-чувствительный полимер состоит из мономерных остатков с конкретными свойствами. Анионные мономерные остатки содержат частицы, заряженные или способные приобретать заряд с образованием аниона, в том числе способные к протонированию анионные частицы. Анионные мономерные остатки могут быть анионными при примерно нейтральном pH 7,2-7,4. Катионные мономерные остатки содержат частицы, заряженные или способные приобретать заряд с образованием катиона, в том числе способные к депротонированию катионные частицы. Катионные мономерные остатки могут быть катионными при примерно нейтральном pH 7,2-7,4. Гидрофобные мономерные остатки содержат гидрофобные частицы. Гидрофильные мономерные остатки содержат гидрофильные частицы.

В целом, каждый полимер может представлять собой гомополимер (полученный в результате полимеризации одного единственного типа мономера, имеющего, по сути, одинаковый химический состав) или сополимер (полученный в результате полимеризации двух или более различных мономеров, имеющих разный химический состав). Полимеры, которые являются сополимерами, включают цепи статистического сополимера или цепи блок-полимера (например, ди-блок-сополимера, три-блок-сополимера, более высокоупорядоченного блок-сополимера и т.д.). Цепи любого указанного блок-сополимера можно обычным способом придать конфигурацию, а также воздействовать на нее в соответствии со способами, известными из уровня техники. В целом, каждый полимер может представлять собой линейный полимер или нелинейный полимер. Нелинейные полимеры могут иметь разнообразное строение, в том числе, например, разветвленные полимеры, полимеры по типу "щетка", звездообразные полимеры, дендримерные полимеры, и они могут представлять собой сшитые полимеры, полусшитые полимеры, графт-полимеры и их комбинации.

Используемый в данном документе термин "объединять", "объединение", "соединение" или "слияние" относится к непосредственному взаимодействию между мембраной и/или составляющими мембраны одного или более EDEM и BDM. Термин "непосредственные взаимодействия" может относиться к простой агрегации, обмену липидами, нарушению структуры, полуслиянию и слиянию. Термины "полуслияние" и "слияние" относятся к частичному или полному смешиванию компонентов мембран BDM и EDEM и образованию общего внутреннего пространства, содержащего материал, первоначально содержащийся в каждом из BDM/EDEM, образующих слитую частицу (например, активное средство, эндогенный белок или нуклеиновую кислоту). Термин "эффективность слияния" относится к относительному количеству гибридов, полученных из EDEM и BDM, которые являются объектом слияния.

Используемый в данном документе термин "мембрана" относится к "оболочке", содержащей алифатические молекулы, такие как молекулы жирных кислот, липидов или полимеры, и которая заключает в себя внутреннюю ячейку. Как таковой, этот термин можно использовать для определения мембраны липидной наночастицы, полимеросомы, секретируемой в естественных условиях частицы или любого типа клеток, в том числе клеток бактерий, грибов, растений, животных или человека (например, эпителиальных клеток). Термин "мембрана" также включает внутриклеточные липидные бислои, такие как, например, эндосомальные или лизосомальные мембраны, а также ядерные мембраны.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что гибридома согласно настоящему изобретению представляет несколько преимуществ перед другими фармацевтическими носителями, известными из уровня техники, причем данные преимущества получают путем физического объединения EDEM с BDM и синергичного суммирования преимуществ, проявляемых каждым из этих модулей. С одной стороны, EDEM можно сконструировать таким образом, чтобы они обладали точно определенными физико-химическими свойствами, регулируемой способностью к слиянию, высокими эффективностями инкапсулирования в отношении широкого спектра активных средств, устойчивостью к жестким условиям окружающей среды, необходимым для химического процесса конъюгирования, и соответствовали клиническим требованиям процесса производства. С другой стороны, BDM имеют безопасные профили токсичности и иммуногенности, проявляют внутренне присущую специфичность в отношении мишени (например, клетки, ткани или органа) и оптимизированы в отношении свойств, обеспечивающих нахождение в кровотоке организма. Таким образом, гибридома согласно настоящему изобретению представляет особый интерес для применений в терапии, визуализации и диагностике. Широкий спектр активных средств можно легко инкапсулировать *in vitro* в EDEM, а посредством объединения указанных EDEM со специфичными BDM, происходящими из субъекта, получают персонализированную биологически совместимую гибридома, включающую активные средства. Гибридома согласно настоящему изобретению может также предоставлять одно или более из следующих преимуществ: (a) уменьшение секвестрации под действием макрофагов ретикулоэндотелиальной системы (RES); (b) уменьшение ответа иммунной системы; (c) увеличенное время нахождения в кровотоке; (d) доставка со специфичным и усиленным целенаправленным воздействием и (e) повышение терапевтических эффектов и/или эффектов мониторинга.

Преимуществом размеры гибридомы согласно настоящему изобретению можно адаптировать таким образом, чтобы они соответствовали очень специфическим и направленным применениям. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения специфические структурные характеристики EDEM и BDM, применяемых для получения гибридомы, можно выбрать таким обра-

зом, чтобы способствовать распространению гибридосомы в тканях-мишенях. К примеру, для нацеливания на ткани солидных опухолей один или более базовых модулей (EDEM или BDM) можно выбрать таким образом, чтобы размеры получаемой в результате гибридосомы были меньше, чем многочисленные окончатые щели, находящиеся в "дырявой" сосудистой сети в солидных опухолях. Таким образом, эта адаптированная гибридосома может легко проникать из сосудов через окончатые отверстия сосудистой сети и прямо нацеливаться на опухолевые клетки из межклеточного пространства. Аналогично, для нацеливания на гепатоциты один или более базовых модулей могут быть выбраны/сконструированы таким образом, чтобы полученная в результате гибридосома была меньше, чем окончатые отверстия в эндотелиальном слое, выстилающем печеночные синусоиды в печени. Таким образом, гибридосома будет способна легко проникать через окончатые отверстия в эндотелии для достижения являющихся мишенью гепатоцитов. Напротив, гибридосому согласно настоящему изобретению можно сконструировать таким образом, чтобы ее размеры ограничивали или не допускали ее распространение в определенные клетки или ткани. В некоторых конкретных вариантах осуществления гибридосома характеризуется размером, составляющим от 20 до 800 нм, предпочтительно от 50 до 400 нм и более предпочтительно от 100 до 200 нм.

В некоторых конкретных вариантах осуществления BDM и/или EDEM, применяемые для получения гибридосомы, характеризуются одним или более свойствами рецептор-опосредованного эндоцитоза, клатрин-опосредованного и опосредованного кавеолами эндоцитоза, фагоцитоза и макропиноцитоза, свойствами, заключающимися в способности к слиянию, свойствами эндосомального или лизосомального разрушения и/или свойствами возможности высвобождения, которые дают таким гибридосомам преимущества в сравнении с другими системами для доставки подобного класса.

Цитотоксичность и/или биологическую совместимость EDEM, применяемого в настоящем изобретении, снижают путем специального подбора липидов, содержащихся в его липидном бислое(бислоях), таким образом дополнительно повышая биологическую совместимость полученной в результате гибридосомы. Таким образом, EDEM, применяемые в настоящем изобретении, не содержат токсичных липидов, используемых для трансфекции, таких как липофектамин и HiPerFect, которые преимущественно заменены одним или более ионизируемыми катионными липидами, такими как DLinDMA, DLin-KC2-DMA и/или Dlin-MC3-DMA. Ионизируемые катионные липиды можно применять в виде одиночного ионизируемого липида в EDEM (например, iLNP) или их можно объединять со вспомогательными липидами и/или модифицированными PEG липидами.

Как упоминалось выше, применение EDEM в качестве одного компонента гибридосомы согласно настоящему изобретению дает существенные преимущества: (1) EDEM могут быть получены с помощью широкомасштабных способов, и можно получать значительные количества инкапсулированного активного средства(активных средств); (2) эффективность инкапсулирования активного средства является высокой; (3) размер производимых EDEM можно контролировать таким образом, чтобы в результате можно было получать гибридосомы с оптимальным с терапевтической точки зрения размером; (4) вследствие того факта, что EDEM получают *in vitro*, некоторые специфические структурные характеристики можно сохранять для облегчения отделения не подвергшихся объединению субпопуляций; (5) EDEM способны противостоять жестким условиям окружающей среды, необходимым для химического процесса конъюгирования; и (6) EDEM, применяемые в настоящем изобретении, характеризуются регулируемой способностью к слиянию. Поскольку несколько EDEM можно объединить с одним или более BDM, становится возможным раздельное получение EDEM, инкапсулирующих отличающиеся активные средства (которые не могут быть инкапсулированы вместе по некоторым причинам, таким как разная растворимость в растворителе и т.д.), а затем объединение указанных отличающихся EDEM с одним или более BDM, таким образом создавая гибридосому, содержащую все необходимые активные средства.

В некоторых конкретных вариантах осуществления применяемый в настоящем изобретении EDEM модифицирован нацеливающим фрагментом и/или стабилизирующим фрагментом.

Применяемые в настоящем изобретении EDEM проявляют повышенную физическую и химическую стабильность по сравнению с субъединицами BDM. Соответственно, хотя BDM проявляют хорошую стабильность в физиологической среде, EDEM способны противостоять изменчивым условиям среды, требующимся для химического процесса конъюгирования и последующих вставок. Например, EDEM могут сохранять стабильность при контакте с восстанавливающими средствами (например, дитиотреитолом (DTT)). В сочетании с этой повышенной стабильностью настоящим изобретением предусматривается модификация поверхностей EDEM с применением дополнительных вспомогательных веществ. В одном варианте осуществления термин "модифицированный" может использоваться для характеристики модифицированного EDEM в сравнении с произведенным EDEM, из которого был получен такой модифицированный EDEM. Соответственно, термин "модифицированный" также может относиться к изменениям в составах EDEM, поскольку композиции EDEM согласно настоящему изобретению могут быть обогащены фузогенными фрагментами или дополнительными катионными, не-катионными и модифицированными PEG липидами для дополнительного нацеливания на ткани или клетки.

Применяемые в настоящем изобретении EDEM можно получить для обеспечения преимущественного нацеливания гибридосом на конкретные ткани, клетки или органы, такие как сердце, легкие, почки

и/или головной мозг. Например, EDEM, такие как iLNP, можно получать для достижения улучшенной доставки клетки- и ткани-мишени.

Используемым в данном документе термином "нацеливающие фрагменты" обозначаются вспомогательные вещества, которые могут быть связаны (либо ковалентно, либо нековалентно) *in vitro* с EDEM для содействия взаимодействию гибридосомы с определенными клетками-мишенями или тканями-мишенями. Используемые в настоящем раскрытии термины "связанный" или "конъюгированный" означают, что два элемента (в данном случае нацеливающий фрагмент и везикула-носитель) связываются с достаточной аффинностью, чтобы реализовать терапевтическую/диагностическую пользу от связи между двумя элементами. Например, нацеливание может быть опосредовано включением одного или более нацеливающих лигандов (например, моноклонального антитела) в гибридосому или на ней для содействия доставки к клеткам- или тканям-мишеням. Распознавание нацеливающего лиганда тканью, являющейся мишенью, активно облегчает распространение в ткани и клеточное поглощение содержимого гибридосомы клетками- и тканями-мишенями. Подходящие лиганды выбирают на основе их физических, химических или биологических свойств (например, селективной аффинности и/или распознавания поверхностных маркеров или характерных признаков клетки-мишени).

Нацеливающие лиганды выбирают таким образом, чтобы использовались исключительные характеристики особенности клетки-мишени, тем самым позволяя гибридосоме различать клетки-мишени и клетки, не являющиеся мишенями. Такие нацеливающие фрагменты могут включать, без ограничения, любой член пары, способной к специфическому связыванию, антитела, моноклональные антитела, а также их производные или аналоги, в том числе фрагменты с вариабельными доменами (Fv), одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), Fab'-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, однодоменные антитела; фрагменты антител, гуманизированные антитела, фрагменты антител; мультивалентные варианты вышеизложенных.

Предусматриваются также гибридосомы, которые содержат один или более лигандов (например, пептиды, аптамеры, олигонуклеотиды, витамин или другие молекулы), которые способны усиливать аффинность композиций в отношении одной или более клеток- или тканей-мишеней. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд может охватывать поверхность липидной наночастицы (например, гликозаминогликан), включенной в гибридосому или инкапсулированной внутри гибридосомы. В одном варианте осуществления гибридосомы включают мультивалентные связывающие реактивы, в том числе, без ограничения, следующие: моноспецифичные или биспецифичные антитела, такие как стабилизированные дисульфидными мостиками Fv-фрагменты, тандемно расположенные scFv-фрагменты ((scFv)<sub>2</sub>-фрагменты), диатела, триатела или тетратела, которые, как правило, представляют собой ковалентно связанные или иным образом стабилизированные (т.е. стабилизированные доменом "лейциновая молния" или стабилизированные спиралью) scFv-фрагменты; и другие участвующие в хоминге фрагменты включают, например, аптамеры, рецепторы и слитые белки.

В некоторых вариантах осуществления гибридосоме можно использовать в режиме мультиспецифичной аффинности. При этом гибридосома содержит по меньшей мере два отличающихся нацеливающих фрагмента, ковалентно связанных с поверхностью гибридосомы. Первый нацеливающий фрагмент специфично связывается с антигеном или молекулой на поверхности клетки (т.е. поверхностным антигеном клетки), а второй нацеливающий фрагмент связывается с внутриклеточной мишенью. В некоторых вариантах осуществления первый нацеливающий фрагмент и второй нацеливающий фрагмент включены в одну полипептидную цепь. В определенных вариантах осуществления некоторые из нацеливающих фрагментов или все нацеливающие фрагменты состоят из аминокислот (в том числе природных, не относящихся к природным и модифицированных аминокислот), нуклеиновых кислот и аптамера или сахаридов. В определенных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный нацеливающий фрагмент является экзогенным и конъюгированным с EDEM, тогда как внеклеточный нацеливающий фрагмент присутствует на BDM и продуцируется *in vivo*. В другом варианте осуществления внутриклеточный нацеливающий фрагмент, полученный *in vivo*, присутствует на BDM, тогда как внеклеточный нацеливающий фрагмент конъюгирован с EDEM.

"Первый нацеливающий фрагмент" в биспецифичном варианте осуществления может представлять собой антитело, антитело-подобную молекулу, пептид или малую молекулу, такую как витамины, например фолат, сахара, такие как лактоза и галактоза, или другие малые молекулы. Поверхностный антиген клетки может представлять собой любую молекулу клеточной поверхности, которая подвергается интернализации, такую как белок, сахар, головная группа липида или другой антиген на поверхности клетки. Примеры поверхностных антигенов клетки, пригодных в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, тетраспанины, EGF-рецептор, HER2/Neu, VEGF-рецепторы, интегрины, CD38, CD33, CD19, CD20, CD22 и асиалогликопротеиновый рецептор.

"Второй нацеливающий фрагмент" в биспецифичном варианте осуществления распознает внутриклеточную мишень. Этот нацеливающий фрагмент специфично связывается с внутриклеточной поверхностью мембраны или антигеном, таким как белок. В определенных вариантах осуществления внутриклеточный нацеливающий фрагмент будет усиливать локализацию вещества в необходимом месте внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления второй нацеливающий фрагмент является белковым и

в определенных вариантах осуществления представляет собой молекулу антитела или антитело-подобную молекулу. Другие вторые нацеливающие фрагменты включают пептиды, такие как, например, синтетические аналоги пептида мелиттина, и органические макромолекулы, которые в силу своего размера (молекулярный вес >500 г), заряда или других физико-химических свойств неспособны проникать в клетки самостоятельно или характеризуются слабой способностью к такому проникновению. В некоторых вариантах осуществления второй нацеливающий фрагмент представляет собой аптамер нуклеиновой кислоты. Второй нацеливающий фрагмент может связываться с цитозольными белками; белками, связанными с внутренней стороной плазматической мембраны или с ядерной, митохондриальной или другими мембранами в клетке; или ядерными белками или белками в других субклеточных компартментах. Специалисту в данной области будет очевидно, что нацеливающие фрагменты, которые блокируют важнейшие функции внутриклеточной передачи сигнала, будут хорошими кандидатами для применения в качестве вторых нацеливающих фрагментов. Вторые нацеливающие фрагменты могут напрямую подавлять активность белка, или блокировать взаимодействие с субстратом белка, или они могут блокировать белок-белковые взаимодействия.

Дополнительный вариант осуществления охватывает встраивание дополняющих функциональных нацеливающих фрагментов для усиления внутриклеточного транспорта активной гибридысомы. Пример усиленного внутриклеточного транспорта достигается при использовании нацеливающих фрагментов, способных "захватывать", связывать или задействовать природные активные системы клеточного транспорта. Например, связывание одного из этих белков моторного комплекса микротрубочек с пептидом, связывающимся с моторным белком, обеспечивает возможность активного транспорта по транспортной сети микротрубочек. Иллюстративные моторные белки включают, без ограничения, динеин и кинезин.

В определенных вариантах осуществления второй нацеливающий фрагмент играет двойную роль, а именно обладает способностями к проникновению через мембрану, а также функциями нацеливания внутри клетки. Например, пептид мелиттин или его аналоги обладают способностью к взаимодействию с мембраной при низком pH и функцией ядерного хоминга в цитозоле. Такую двойную роль можно приписать сегменту второго нацеливающего фрагмента. Например, функции нацеливания на ядро, опосредованные за счет последовательностей ядерной локализации (например, пептидной последовательности "KRKR") и амфипатических сегментов из  $\alpha$ -спиралей, содержащихся в том же втором нацеливающем фрагменте. Следовательно, в определенных вариантах осуществления двойная роль второго нацеливающего фрагмента может опосредовать две дополняющие функции гибридысомы. Иллюстративные композиции гибридысом, модифицированных вторым нацеливающим фрагментом двойного назначения, описаны в примерах ниже.

Более того, EDEM согласно настоящему изобретению можно модифицировать таким образом, чтобы они имели молекулы с амфипатическими свойствами, такие как проникающие в клетку пептиды, на своей поверхности. Эти пептиды характеризуются их способностью нарушать целостность бислоя мембраны либо за счет создания дефектов, разрушения, либо посредством образования поры, приводя к взаимодействию между EDEM и BDM. Примеры таких пептидов можно получить из белков, таких как Tat и Rev, а также пептидов, полученных из токсинов, таких как кротамин или мелиттин. Предпочтительный класс проникающих в клетку пептидов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают гидрофобные домены, которые являются "инертными" при физиологическом pH, но являются активными в среде с низким pH. При индуцированном pH развертывании и обнажении гидрофобного домена фрагмент связывается с липидными бислоями и оказывает влияние на взаимодействие между EDEM и BDM или гибридысомами и эндосомальными компартментами. Иллюстративное конъюгирование фузогенного пептида описано в примерах ниже.

Настоящим изобретением также предусматривается встраивание хемоселективных и биоортогональных дополняющих функциональных молекул в или на EDEM для усиления специфического для определенной области объединения с BDM. Например, встраивание слитых пептидов в липидный бислой EDEM, таких как белки SNARE (растворимые белки-рецепторы прикрепления N-этилмалеимид-чувствительного фактора) или их синтетические миметики, обеспечивает возможность рецептор-специфического взаимодействия между EDEM и BDM.

В одном варианте осуществления для облегчения конъюгирования нацеливающих фрагментов с EDEM часть мольной доли модифицированного PEG липида может быть замещена модифицированными PEG липидами с функциональным элементом, таким как малеимид (например, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид(полиэтиленгликоль)-2000]) или аминогруппа (например, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000]) на дистальном конце PEG. Иллюстративные способы конъюгирования описаны в примерах ниже.

EDEM, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать экранирующий фрагмент, заякоренный в липидном бислое. Используемый в данном документе термин "стабилизирующий фрагмент" относится к молекуле, которая может модифицировать свойства поверхности гибридысомы посредством компонента EDEM, включенного в нее. Стабилизирующий фрагмент может предотвращать прилипание гибридысом друг к другу или их прилипание к клеткам крови или стенкам сосудов. В определенных вариантах осуществления гибридысомы со стабилизирующими фрагментами характеризуются

пониженной иммуногенностью, когда их вводят субъекту. В одном варианте осуществления стабилизирующие фрагменты также могут увеличивать время нахождения гибридысомы в кровотоке у субъекта. Стабилизирующие фрагменты для применения в настоящем изобретении могут включать такие фрагменты, которые, в целом, хорошо известны из уровня техники.

Примеры стабилизирующих фрагментов включают, без ограничения, соединения, содержащие полиэтиленгликоль и другие соединения, такие как, без ограничения, дендримеры, полиалкиленоксид, поливиниловый спирт, поликарбоксилат, полисахариды и/или гидроксилалкилкрахмал, которые уменьшают взаимодействие или связывание комплекса с частицей, присутствующей *in vivo* или *in vitro*, такой как сывороточный белок системы комплемента, кофакторы, гормоны или витамины. Термин "модифицированный PEG липид" относится, но без ограничения, к цепи полиэтиленгликоля длиной до 20 кДа, конъюгированной с помощью ковалентной связи с липидом с алкильной цепью (цепями) длиной C6-C20. В определенных вариантах осуществления подходящие полиэтиленгликоль-липиды включают модифицированный PEG фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), модифицированные PEG керамиды (например, PEG-CerC20), модифицированные PEG диалкиламины, модифицированные PEG диацилглицеролы и модифицированные PEG диалкилглицеролы. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль-липид представляет собой (метоксиполиэтиленгликоль)2000-димиристолглицерол (PEG-s-DMG).

Дополнительные неограничивающие примеры модифицированных PEG липидов включают PEG-диалкилоксипропил (DAA), R-3-[( $\omega$ -метокси-поли(этиленгликоль)-2000)карбамоил]-1,2-димиристоилоксипропил-3-амин (PEG-c-DOMG) и N-ацетилгалактозамин-((R)-2,3-бис-(октадепилокси)-пропил-1-(метокси-поли(этиленгликоль)-2000)пропилкарбамат) (GalNAc-PEG-DSG).

Настоящим изобретением предусматривается, что если PEG находится на поверхности EDEM, BDM и/или гибридысоме, то соединения, отличные от липидов, такие как, например, пептиды, гидрофобные анкерные структуры или полимеры, углеводы, металлы или другие ионы, можно применять для конъюгирования с PEG, чтобы закорить эти соединения в липидном бислое.

Обращаясь к BDM, настоящим изобретением предусматривается, что биологически активные молекулы в цитозоле и плазматической мембране встраиваются в ходе образования BDM, приводя в результате к BDM, характеризующимся исключительными функциональными свойствами, которые позволяют использовать BDM в качестве эффективных наночастиц-носителей активных средств. В связи с этим BDM способны доставлять активное средство к клеткам- и тканям-мишеням, при этом сохраняя биологическую активность эндогенной нагрузки, а также активных средств. В частности, BDM проявляют эволюционно оптимизированный период полувыведения из сыворотки и взаимодействие с тканями- и/или клетками-мишенями. Преимущественная способность к доставке у одного или более BDM переносится и на гибридысому согласно настоящему изобретению после объединения BDM с одним или более EDEM. Более того, BDM способны переносить эндогенные биологически активные компоненты к гибридысоте. В одном конкретном варианте осуществления один или более BDM собирают и применяют для содействия высвобождению эндогенных miRNA, полинуклеотидов и полипептидов, продуцируемых *in vivo* клетками-донорами, в объеме, заключенный в гибридысому согласно настоящему изобретению. В другом варианте осуществления один или более BDM собирают и применяют для содействия переносу биологически активных молекул и/или полипептидов, включенных в мембрану BDM в качестве составляющих мембраны гибридысомы.

В некоторых вариантах осуществления BDM, применяемые в настоящем изобретении, получены от субъекта-донора, страдающего заболеванием или нарушением, таким как рак. Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, ожидают, что по меньшей мере некоторые из BDM, собранных у субъекта, обладают способностью к специфическому нацеливанию на клетки, ассоциированные с указанным заболеванием или нарушением, и, таким образом, их можно преимущественно применять для мониторинга или лечения заболевания. Более того, компоненты BDM, применяемых в настоящем изобретении, могут взаимодействовать с конкретными клетками и облегчать эндоцитоз, тем самым обеспечивая возможность направленной доставки инкапсулированного материала в конкретную клетку, тип клеток или ткань. Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, специфичность к клетке-мишени у BDM, применяемых в настоящем изобретении, зависит от типа клетки, из которой получен BDM. К примеру, BDM, полученные из В-клеток или клеток глиобластомы, можно применять для получения гибридысомы согласно настоящему изобретению. Такие BDM могут переносить один или более эндогенных нацеливающих на В-клетки или глиобластома фрагментов, продуцируемых *in vivo*, в гибридысому, тем самым придавая гибридысоте специфичность в отношении В-клеток или глиобластомы. Также ожидается, что гибридысому повторно вводят субъекту, от которого получен BDM, применяемый для получения гибридысомы, компоненты BDM, переносимые в гибридысому, делают ее совместимой с иммунной системой указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления клетка, из которой получен BDM, представляет собой опухолевую клетку. Опухолевая клетка может быть первичной опухолевой клеткой или может быть получена из опухолевой клетки, например, путем перевивания, культивирования, разрачивания, иммортализации и т.д. Таким образом, опухолевая клетка может происходить из опухоли ракового пациента или пациента с предраковым состоянием или может происходить из линии опухолевых или раковых клеток.

Опухолевая клетка может происходить из доброкачественной опухоли или злокачественной опухоли.

В других вариантах осуществления клетка, из которой получен BDM, представляет собой инфицированную клетку, т.е. клетку, которая содержит патоген.

В других вариантах осуществления клетка, из которой получен BDM, представляет собой мутированную клетку. Например, в некоторых вариантах осуществления мутированная клетка экспрессирует мутантные или неправильно свернутые белки. В некоторых вариантах осуществления мутированная клетка сверхэкспрессирует один или более белков. В некоторых вариантах осуществления мутантная клетка вовлечена в дегенеративное нарушение, такое как протеопатическое нарушение. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку центральной нервной системы.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит гибридосому, которая не содержит каких-либо терапевтических средств и/или диагностических средств в своей внутренней ячейке. Такую гибридосому можно получить, к примеру, путем объединения "пустого" EDEM с BDM. В некоторых конкретных вариантах осуществления "пустой" EDEM содержит некий структурный элемент в своей мембране, который будет облегчать дальнейшую загрузку активными средствами с помощью методики, известной из уровня техники (например, электропорации).

Используемые в данном документе термины "активное средство" или "биологически активное средство" относятся к любому соединению или смеси соединений, которые обеспечивают физиологический результат, например, благоприятный или полезный результат, при контакте с живым организмом, например, млекопитающим, таким как человек. Активные средства являются отличимыми от других компонентов доставляемых композиций, таких как носители, разбавители, связующие, красители и т.д. Активное средство может представлять собой любую молекулу, а также ее связывающую часть или фрагмент, которые способны модулировать биологический процесс у живого субъекта. В определенных вариантах осуществления активное средство может представлять собой вещество, применяемое в диагностике, лечении или предупреждении заболевания или в виде компонента медикамента. В некоторых вариантах осуществления активное средство может относиться к соединению, которое способствует получению диагностической информации о являющейся мишенью области в теле живого организма, такого как млекопитающее, или у человека. Например, визуализирующие средства можно классифицировать как активные средства согласно настоящему изобретению, поскольку они являются веществами, которые обеспечивают визуальную информацию, необходимую для диагностики.

В некоторых других вариантах осуществления гибридосома в композиции содержит одно или более терапевтических средств и/или диагностических средств. Как описано выше, эти терапевтические средства и/или диагностические средства вначале инкапсулируются в EDEM, а затем переносятся во внутреннюю ячейку гибридосомы при объединении указанного EDEM с BDM.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое средство" означает физиологически или фармакологически активное вещество, которое может приводить к желательному биологическому эффекту в являющейся мишенью области у животного, такого как млекопитающее, или у человека. Терапевтическое средство может представлять собой любое неорганическое или органическое соединение. Терапевтическое средство может снижать, подавлять, смягчать, ослаблять, задерживать или стабилизировать развитие или прогрессирование заболевания, нарушения или роста клеток у животного, такого как млекопитающее или человек. Примеры включают, без ограничения, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты (в том числе siRNA, miRNA и ДНК), полимеры и малые молекулы. В различных вариантах осуществления терапевтические средства могут быть охарактеризованными или неохарактеризованными.

В одном варианте осуществления терапевтическое средство может присутствовать в EDEM или BDM до объединения этих двух модулей. Например, BDM могут содержать одно или более терапевтических средств (например, miRNA), эндогенных по отношению к клетке, из которой получен BDM, и EDEM могут содержать одно или более терапевтических средств (например, антинеопластическое средство) до объединения с BDM. Способы инкапсулирования активных средств в EDEM известны из уровня техники (Бао, Mitragotri, & Tong, 2013). В качестве альтернативы, гибридосому можно загрузить терапевтическим средством после объединения EDEM и BDM посредством ковалентного и нековалентного связывания с поверхностью клетки, последующего встраивания в мембрану гибридосомы или через открытые поры в мембрану гибридосомы для обеспечения возможности проникновения активных средств в инкапсулированный объем (например, посредством электропорации).

Терапевтические средства согласно настоящему изобретению также могут присутствовать в различных формах. Такие формы включают, без ограничения, незаряженные молекулы, молекулярные комплексы и фармакологически приемлемые соли (например, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат, нитрит, нитрат, борат, ацетат, малеат, тартрат, олеат, салицилат и т.п.). В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства можно модифицировать солями металлов, аминами или органическими катионами (например, четвертичного аммония). В качестве терапевтического средства также можно применять производные лекарственных средств, такие как основания, сложные эфиры и амиды. Терапевтическое средство, которое является нерастворимым в воде, можно применять в форме, которая представляет собой его водорастворимое производное, такое как производное-основание. В таких случаях производное терапевтического средства может превращаться в исходную терапевтически активную

форму при доставке в являющуюся мишенью область. Такие превращения могут происходить посредством различных метаболических процессов, включающих ферментативное расщепление, гидролиз под действием pH в организме, или посредством других подобных процессов.

Как предусматривается настоящим изобретением, подходящие терапевтические средства включают, без ограничения, химиотерапевтические средства (т.е. антинеопластические средства), анестетические средства, блокаторы бета-адренергических рецепторов, антигипертензивные средства, антидепрессивные средства, антисудорожные средства, противорвотные средства, антигистаминные средства, противоаритмические средства, противомаларийные средства, антипролиферативные средства, средства, препятствующие васкуляризации, ранозаживляющие средства, средства, восстанавливающие ткани, средства для термальной терапии и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления подходящие терапевтические средства также могут представлять собой, без ограничения, иммунодепрессивные средства, цитокины, цитотоксические средства, нуклеолитические соединения, радиоактивные изотопы, рецепторы и активирующие пролекарство ферменты. Терапевтические средства согласно настоящему изобретению могут быть секретируемыми в естественных условиях, или их можно получать синтетическими или рекомбинантными способами или любой их комбинацией.

Широкий спектр терапевтических средств можно использовать в сочетании с EDEM, описанными в данном документе. Неограничивающие примеры таких терапевтических средств включают антинеопластические средства, противoinфекционные средства, местные анестетики, противоаллергические средства, противоанемические средства, ингибиторы ангиогенеза, блокаторы бета-адренергических рецепторов, антагонисты кальциевых каналов, антигипертензивные средства, антидепрессанты, противосудорожные средства, антибактериальные средства, противогрибковые средства, противовирусные средства, противоревматические средства, антигельминтные средства, антипаразитарные средства, кортикостероиды, гормоны, антагонисты гормонов, иммуномодуляторы, антагонисты нейромедиаторов, противодиабетические средства, антиэпилептические средства, антигеморрагические средства, противогипертензивные средства, антиглаукомные средства, иммуномодулирующие цитокины, седативные средства, хемины, витамины, токсины, наркотические вещества, средства, полученные из растений (например, экстракты из листьев, корней, цветков, семян, стеблей или ветвей), и их комбинации.

В различных вариантах осуществления лекарственные средства, которые подвержены классической множественной лекарственной устойчивости, могут иметь особую применимость в качестве терапевтических средств согласно настоящему изобретению. Такие лекарственные средства включают, без ограничения, алкалоиды барвинка (например, винбластин), антрациклины (например, доксорубин) и ингибиторы транскрипции РНК.

В дополнительных вариантах осуществления терапевтическое средство может представлять собой средство для химиотерапии рака. Примеры подходящих средств для химиотерапии рака включают, без ограничения, следующие: азотистый иприт, нитрозомочевины, этиленимин, алкансульфонаты, тетразин, соединения платины, пиримидиновые аналоги, пуриновые аналоги, антиметаболиты, аналоги фолатов, антрациклины, таксаны, алкалоиды барвинка, и ингибиторы топоизомеразы и гормональные средства.

Дополнительные лекарственные средства для химиотерапии рака, которые можно применять в качестве терапевтических средств в настоящем изобретении, включают, без ограничения, следующие: алкилирующие средства, такие как циклофосфамид; алкилсульфонаты; азиридины; этиленимины и метиламеламины; антиметаболиты; пиримидиновые аналоги; антиадренергические средства; средство для восполнения дефицита фолиевой кислоты; ретиноевую кислоту; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеупомянутых средств.

Дополнительные терапевтические средства, которые являются подходящими для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли. Неограничивающие примеры таких антигормональных средств включают антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен и торемифен; антиандрогены, такие как лейпролид, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеупомянутых средств.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве терапевтических средств также можно применять цитокины. Неограничивающими примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. Дополнительные примеры включают гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионил-гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухолей  $\alpha$  и  $\beta$ ; мюллерову ингибирующую субстанцию; гонадотропин-ассоциированный пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста сосудистого эндотелия; интегрин; тромбopoэтин (TPO); фактор роста нервов, такой как NGF-P; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ; инсулиноподобный фактор роста I и II; эритро-

позтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL); факторы некроза опухолей, такие как TNF- $\alpha$  или TNF- $\beta$ ; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и лиганд kit (KL). Используемый в данном документе термин "цитокин" включает белки из природных источников или из рекомбинантных источников (например, из культуры Т-клеток и биологически активных эквивалентов нативной последовательности цитокинов).

В дополнительных вариантах осуществления терапевтическое средство также может представлять собой терапевтическое средство на основе антитела, неограничивающие примеры включают герцептин, эрбитукс, авастин, ритуксан, симулект, энбрел, адалимумаб и ремикейд.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство может представлять собой наночастицу. Неограничивающие примеры таких наночастиц включают наночастицу на основе любого металла и полупроводника, которая включает, без ограничения, золото, серебро, оксид железа, квантовые точки или углеродные нанотрубки. Например, в некоторых вариантах осуществления наночастица может представлять собой наночастицу, которую можно применять для термоабляции или термальной терапии.

В некоторых вариантах осуществления EDEM загружается анионными терапевтическими средствами. Анионные терапевтические средства включают любое терапевтическое средство с суммарным отрицательным зарядом, или имеющее отрицательно заряженную группу, которая способна взаимодействовать с ионизируемым липидом в гибридосоме. Такие терапевтические средства включают любое известное или потенциальное терапевтическое средство, в том числе такие лекарственные средства и соединения, как, без ограничения, олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, модифицированные нуклеиновые кислоты (в том числе белок-нуклеиновые кислоты и т.п.), белки и пептиды с отрицательно заряженными группами, традиционные лекарственные средства, такие как растительные алкалоиды и аналоги, обладающие отрицательно заряженными группами и т.п. Терапевтические средства, которые по своей природе не являются анионными, можно дериватизировать анионными группами для облегчения их применения в настоящем изобретении, например, паклитаксел можно дериватизировать группой полиглутаминовой кислоты.

В одном варианте осуществления гибридосома содержит отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты, подлежащие введению в клетки. Неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, предназначенных для применения в настоящем изобретении, представляют собой siRNA, микроРНК (miRNA), малую или короткую РНК, образующую шпильки (shRNA), направляющую РНК (gRNA), РНК со сгруппированными регулярно разделенными промежутками короткими палиндромными повторами (crRNA), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, транс-активирующую РНК со сгруппированными регулярно разделенными промежутками короткими палиндромными повторами (tracrRNA), плазмиды, антисмысловые нуклеиновые кислоты и рибозимы. Настоящим изобретением предусматривается, что нуклеиновые кислоты, содержащиеся в гибридосоме, могут быть эндогенными по отношению к клетке, из которой был получен BDM, и/или экзогенной нуклеиновой кислотой, инкапсулированной EDEM.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, инкапсулированные в гибридосому, кодируют малую интерферирующую РНК (siRNA) или антисмысловую РНК для того, чтобы модулировать или иным образом снижать или устранять экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты или гена. В определенных вариантах осуществления такие инкапсулированные полинуклеотиды могут быть природными или рекомбинантными по своей природе и могут проявлять свою терапевтическую активность с использованием либо смысловых, либо антисмысловых механизмов действия (например, путем модуляции экспрессии целевого гена или нуклеиновой кислоты). Используемый в данном документе термин "модуляция" относится к изменению экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. Модуляция может означать увеличение или повышение или она может означать уменьшение или снижение.

В некоторых других вариантах осуществления гибридосома согласно настоящему изобретению содержит полинуклеотиды, кодирующие такие представляющие интерес полипептиды или белки, как гормон, фермент, рецептор или модулирующие пептиды. В некоторых конкретных вариантах осуществления гибридосома содержит биологически активные средства, которые после трансфекции способны продуцировать функциональные полипептиды, которые могут упростить нацеливание/трансфекцию дополнительной гибридосомы в клетки-мишени. В определенных вариантах осуществления гибридосомы, описанные в данном документе, используют многофункциональную стратегию для облегчения доставки инкапсулированных материалов (например, одного или более полинуклеотидов) и последующего высвобождения при взаимодействии с клеткой-мишенью.

Как правило, фармацевтическая композиция для применения в качестве вакцины против конкретной формы рака будет содержать BDM, полученные из опухолевых/раковых клеток, относящихся к конкретной форме рака. Например, фармацевтическая композиция для применения в вакцине против глиобластомного рака, как правило, содержит BDM, очищенные от опухолевых/раковых клеток глиобластомы. Таким образом, BDM содержит ассоциированные с опухолью антигены, которые стимулируют адаптивный иммунный ответ на антигены, присутствующие на опухолевых/раковых клетках, подлежащих лече-

нию/от которых необходимо защитить субъекта. То же источник/назначение применяется к другим заболеваниям.

В одном варианте осуществления BDM, используемые с настоящим изобретением, могут представлять собой любую протеолипосомную везикулу, полученную путем разрушения или "пузырения" из наружной мембраны бактерии или паразита с образованием везикул, которые сохраняют антигены с наружной мембраны (см. публикации международных заявок № WO 2014/122232 и WO 2011/08027, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). BDM, полученные из бактерий и паразитов, характеризуются рядом свойств, которые делают их привлекательными кандидатами для платформ для доставки иммунотерапевтических средств, включая следующие: (i) сильная иммуногенность, (ii) самостоятельная адьювантность, (iii) способность взаимодействовать с клетками млекопитающих и поглощаться посредством слияния мембраны или присоединения к клетке через рецепторы адгезии и (iv) возможность включения экспрессии гетерологичного антигена посредством методик конструирования рекомбинантных молекул.

Таким образом, фармацевтическую композицию, содержащую гибридосому согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, можно применять для лечения или профилактики различных заболеваний и нарушений.

Используемый в данном документе термин "диагностическое средство" относится к компоненту, который можно выявлять у субъекта или в исследуемом образце и дополнительно описан в данном документе. В некоторых вариантах осуществления диагностические средства в настоящем изобретении могут представлять собой вещества, которые обеспечивают визуальную информацию о являющейся мишени области в организме животного, такого как млекопитающее, или у человека. Диагностическое средство, применяемое в настоящем изобретении, может включать любое диагностическое средство, известное из уровня техники.

Диагностическое средство можно выявить с помощью ряда способов, в том числе в виде средства, обеспечивающего и/или усиливающего выявляемый сигнал, который включает, без ограничения, сигналы в виде гамма-излучения, радиоактивные, оптические сигналы, сигналы в виде поглощения флуоресцентного излучения, экзогенные сигналы, магнитные или томографические сигналы. Методики визуализации диагностического средства могут включать, без ограничения, компьютерную томографию (СТ), магнитно-резонансную томографию (MRI), оптическую визуализацию, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (СПЕКТ), позитронно-эмиссионную томографию (PET), рентгенографию, визуализацию гамма-излучения и т.п.

В одном варианте осуществления радиоактивный изотоп может действовать в качестве диагностического средства и может встраиваться в гибридосому, описанную в данном документе, а также может включать радионуклиды, которые испускают гамма-лучи, позитроны, бета- и альфа-частицы и рентгеновские лучи. Подходящие радионуклиды включают, без ограничения,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{130}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{88}\text{Y}$  и  $^{90}\text{Y}$ .

В некоторых вариантах осуществления полезной нагрузкой может быть выявляемое средство, такое как, без ограничения, различные органические малые молекулы, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или субстраты ферментов, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люцифераза, люциферин и экворин), хемилюминесцентные материалы). Такие выявляемые по оптическим свойствам метки включают, например, без ограничения, октадецилродамин В, 7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил, 4-ацетидамо-4'-изотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту, акридин и производные, 5-(2'-аминоэтил)-аминонафталин-1-сульфовую кислоту (EDANS), дилитиевую соль 4-амино-N-(3-[винилсульфонил]-фенил)нафталимид-3,6-дисульфоната, N-(4-анилино-1-нафтил)малеимид, антралиламид, BODIPY, бриллиантовый желтый, кумарин и производные, цианиновые красители, цианозин, 4',6'-диаминидино-2-фенилиндол (DAPI), бромпирогаллоловый красный, 7-диэтиламино-3-(4'-изотиоцианатофенил)-4-метилкумарин, диэтилентриамин-пентаацетат, 4,4'-диизотиопианатодигидро-стильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту, 4,4'-диизотиопианатостильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту, дансилхлорид, 4-диметиламинофенилазофенил-4'-изотиоцианат (DABITC), эозин и производные, эритрозин и производные, этидий, флуоресцеин, 5-карбоксифлуоресцеин (FAM), 5-(4,6-дихлортриазин-2-ил)аминофлуоресцеин (DTAF), 2',7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, X-родамин-5-(и 6)-изотиоцианат (QFITC или XRITC), флуорескамин, 1Н-бензо[e]индолия 2-[2-[3-[[1,3-дигидро-1,1-диметил-3-(3-сульфопропил)-2Н-бензо[e]индол-2-илиден]этилиден]-2-[4-(этоксикарбонил)-1-пиперазинил]-1-циклопентен-1-ил]этинил]-1,1-диметил-3-(3-сульфопропил)-гидроксид, соединение, являющееся внутренней солью с п,п-диэтилэтанамином (1:1) (IR144), 5-хлор-2-[2-[3-[[5-хлор-3-этил-2(3Н)-бензотиазол-илиден]этилиден]-2-(дифениламино)-1-циклопентен-1-ил]этинил]-3-этил-бензотиазолия перхлорат (IR140), изотиоцианат малахитового зеленого, 4-метилумбеллиферон, орто-крезолфталейн, нитротирозин, парарозанилин, феноловый красный, В-фикоэритрин, о-фталевый диальдегид, пирен, пирен-бутират, сукцинимидил-1-пирен, квантовые точки на основе бутирата, реактивный красный 4 (Cibacron™ бриллиантовый красный 3В-А), родамин и произ-

водные, 6-карбоксихромолин (ROX), 6-карбоксихромолин (R6G), лиссамина родамин В сульфониламин, родамин (Rhod), родамин В, родамин 123, родамин X-изотиоцианат, сульфородамин В, сульфородамин 101, сульфониламин производное сульфородамина 101 (техасский красный), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихромолин (TAMRA) тетраметилродамин, тетраметилродамин-изотиоцианат (TRITC), рибофлавин, розоловую кислоту, тербиевые хелатные производные, цианин-3 (Cy3), цианин-5 (Cy5), цианин-5.5 (Cy5.5), цианин-7 (Cy7), IRD 700, IRD 800, Alexa 647, La Jolla Blue, фталоцианин и нафталоцианин.

В контексте вариантов осуществления, включающих оптическую визуализацию, диагностическое средство может представлять собой контрастные вещества, например полупроводниковые нанокристаллы или квантовые точки. В случае визуализации с помощью оптической когерентной томографии диагностическое средство может представлять собой металл, как, например, частицы золота или серебра в нанорешетках. В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство может представлять собой наночастицы металла, такие как наночастицы золота или серебра.

В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство может включать визуализирующее средство для магнитно-резонансной (MR) томографии. Иллюстративные магнитно-резонансные средства включают, без ограничения, парамагнитные средства, суперпарамагнитные средства и т.п. Иллюстративные парамагнитные средства могут включать, без ограничения, гадопентетовую кислоту, гадолиний, гадопентетол или гадоксетовую кислоту. Суперпарамагнитные средства могут включать, без ограничения, суперпарамагнитный оксид железа и ферристен. В определенных вариантах осуществления диагностические средства могут включать рентгеноконтрастное средство. Примеры рентгеноконтрастных средств включают, без ограничения, йопамидол, йомепрол, йогексол, йопентол или метризамид.

Аналогично терапевтическим средствам, описанным выше, диагностические средства могут быть связаны с гибридной различными способами, в том числе, например, могут быть включены, инкапсулированы или прикреплены к гибридной. В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство может представлять собой комплекс/конъюгат с ионом металла, который может быть ковалентно или нековалентно прикреплен к поверхности частицы. В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство может представлять собой радионуклид, который может быть ковалентно или нековалентно прикреплен к поверхности гибридной. Аналогично, загрузку диагностических средств можно осуществлять посредством ряда способов, известных из уровня техники. Один пример загрузки диагностических средств в EDEM представлен в разделе "Примеры".

Соответственно, один вариант осуществления согласно настоящему изобретению относится к гибридной, содержащей по меньшей мере один EDEM, который может содержать активное средство, такое как диагностическое средство и/или терапевтическое средство. Гибридной можно применять в виде части композиции для лечения, мониторинга, предупреждения, определения стадии и/или диагностики заболевания или состояния, включающего заболевание, такое как рак. Это можно осуществлять, например, путем объединения терапевтического средства и диагностического средства в гибридной. Это также можно осуществлять путем введения гибридной, которая включает первую субпопуляцию, загруженную терапевтическим средством, и вторую субпопуляцию, загруженную диагностическим средством. В другом варианте осуществления настоящим изобретением предполагается способ диагностики заболевания или состояния, диагностируемого путем введения диагностического средства, включающий введение гибридной согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Таким образом, фармацевтическую композицию, содержащую гибридную согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, можно применять для диагностических применений.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предполагается фармацевтическая композиция, содержащая гибридную, где активные средства, встроенные в BDM, вызывают иммунный ответ в отношении одного или более ассоциированных с заболеванием антигенов таких как, например, опухолевый антиген. Предполагается, что содержащая гибридную фармацевтическая композиция, способная вызывать иммунный ответ, может быть полезной в контексте иммунотерапии, например, против рака или инфекций.

В некоторых вариантах осуществления BDM содержат полученные *in vivo* ассоциированные с заболеванием антигены, такие как один или более ассоциированных с опухолью антигенов, один или более ассоциированных с патогеном антигенов или один или более ассоциированных с дегенеративным нарушением антигенов. Термин "ассоциированные с заболеванием антигены" может относиться к белкам, продуцируемым в связанных с заболеванием клетках, которые характеризуются аномальной структурой и/или аномальным характером экспрессии по сравнению с не связанными с заболеванием клетками. Аномальные белки также могут продуцироваться клетками, инфицированными онковирусами, например EBV и HPV. Например, в некоторых вариантах осуществления BDM являются хорошо подходящими для презентации антигенов, которые могут стимулировать необходимые иммунные ответы у субъектов. Это преимущество может возникнуть вследствие того, что BDM продуцируются клетками, а не синтезируются искусственно, и таким образом обеспечивают антигены, которые являются "натуральными". То есть, антигены, продуцируемые клетками и находящиеся в BDM, могут представлять собой полноразмерные

пептиды, которые подвергаются процессингу (например, гликозилируются и т.д.) и фолдингу клеткой аналогично антигенам, подвергающимся действию иммунных клеток у субъекта. Помимо белков, другие субстраты, подобные гликолипидам и гликопротеинам клеточной поверхности, также могут характеризоваться аномальной структурой в связанных с заболеванием клетках и, следовательно, могут являться мишенями иммунной системы. В связи с этим антигены в BDM можно использовать в вакцинах или лечебных средствах, например, против рака. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более антигенов может содержать антиген раковой клетки. В качестве неограничивающих примеров антиген раковой клетки может представлять собой щелочную фосфатазу плацентарного типа, p53, p63, p73, mdm-2, прокатепсин-D, B23, C23, PLAP, CA125, MUC-1, *cerB/HER2*, NY-ESO-1, SCP1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, HSP27, HSP60, HSP90, GRP78, TAG72, HoxA7, HoxB7, *ErCAM*, *gas*, мезотелин, сурвивин, EGFK, MUC-1 и с-тус.

В другом варианте осуществления BDM получают из антигенпрезентирующих клеток. Настоящим изобретением, в частности, предполагаются BDM, полученные из пораженных заболеванием антигенпрезентирующих клеток. В конкретном варианте осуществления BDM содержат ассоциированные с опухолью антигены от хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и лимфомы из клеток мантимальной зоны. В неограничивающем примере BDM получают из клеток лимфомы из клеток мантимальной зоны, которые несут трансмембранный рецептор тирозиновой протеинкиназы ROR1.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гибридосому, где активные средства, встроенные в BDM, вызывают проявление способностей к иммуносупрессии у композиции, например, если это необходимо в условиях аутоиммунных заболеваний, инфекций, аллергий и трансплантации во избежание пагубной активации и/или чрезмерной реакции иммунной системы субъекта. Этот аспект может быть реализован путем выделения BDM, предоставляющих одно или более иммунодепрессивных средств. В одном варианте осуществления указанные BDM подавляют иммунную реакцию, развивающуюся в результате действия аллогенного/ксеногенного клеточного трансплантата или генной терапии. Как показано в разделе "Примеры", один вариант осуществления включает иммунодепрессивные BDM, выделенные из тромбоцитов и активированных полиморфноядерных нейтрофилов.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гибридосому для доставки терапевтических средств.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, содержащей физически отдельные единицы, подлежащие вводу одной или более дозировками, причем каждая единица содержит предварительно определенное количество по меньшей мере одного фармацевтически активного ингредиента и по меньшей мере один другой ингредиент, выбранный из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Например, настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гибридосомы для направленной доставки одного или более активных средств в ткань или клетку в живом организме. В дополнительном примере настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гибридосомы для доставки одного или более активных средств в ткань или клетку *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять в качестве систем для доставки активного средства, такого как терапевтическое и/или диагностическое средство, в являющуюся мишенью клетку или ткань у животного, такого как млекопитающее, или в организм человека. В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предусматриваются способы введения активного средства в клетку- или ткань-мишень. Частицы согласно настоящему изобретению могут включать широкий спектр терапевтических и/или диагностических средств. В другом аспекте настоящим изобретением предусматривается способ введения терапевтического и/или диагностического средства субъекту. В данном способе гибридосому согласно настоящему изобретению, содержащую терапевтическое и/или диагностическое средство, вводят пациенту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления доставка активного средства, такого как терапевтическое и/или диагностическое средство, может составлять суть терапии.

Термины "терапия" или "лечение" относятся к способу, который предназначен для получения благоприятного изменения состояния индивида, такого как млекопитающее, например человек, часто называемый пациентом, или животное. Благоприятное изменение, например, может включать одно или более из следующего: восстановление функции, уменьшение симптомов, ограничение или замедление прогрессирования заболевания, нарушения или состояния или предупреждение, ограничение или замедление ухудшения состояния, заболевания или нарушения у пациента. Среди прочего, такая терапия обычно охватывает введение активного средства с помощью гибридосомы.

Термин "осуществление лечения" известен в уровне техники и включает предупреждение возникновения заболевания, нарушения или состояния у живого организма, такого как млекопитающее, или у человека, который может быть предрасположен к заболеванию, нарушению и/или состоянию, но у которого еще не было диагностировано его наличие; супрессия заболевания, нарушения или состояния, например, препятствие его прогрессированию; и ослабление заболевания, нарушения или состояния, например, ремиссия заболевания, нарушения и/или состояния. Осуществление лечения заболевания или

состояния включает ослабление по меньшей мере одного симптома конкретного заболевания или состояния, даже если оно не оказывает воздействие на лежащие в основе этого патофизиологические факторы, как, например, лечение боли у субъекта путем введения анальгезирующего средства, даже если такое средство не лечит причину боли.

Как упоминалось выше, гибридосома согласно настоящему изобретению может содержать терапевтические средства, которые можно выбирать в зависимости от типа заболевания, лечение которого было бы желательным. Например, при определенных формах рака или опухолях, таких как лейкоз, лимфома, миелома, карцинома и саркома, а также солидные опухоли и смешанные опухоли, может предполагаться введение одного и того же или, возможно, разных терапевтических средств.

Специалист в данной области также поймет, что гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для различных целей. Способы согласно настоящему изобретению характеризуются многочисленными преимуществами по сравнению со способами из уровня техники. Способы лечения пациента с использованием активных средств применялись с давних пор. Тем не менее, в большинстве способов из уровня техники активное средство обычно доставлялось по всему организму человека или животного, при этом не нацеливаясь на конкретную область, пораженную заболеванием. Таким образом, в способах из уровня техники активное средство равномерно распространяется по всему организму. Одним недостатком способов из уровня техники является то, что не пораженные заболеванием области организма человека или животного также могут подвергаться воздействию активного средства. Более того, только малая часть активного средства может действовать в пораженной заболеванием области.

Как предусматривается настоящим изобретением, гибридосома улучшает вероятность того, что надлежащие количества инкапсулированных материалов (например, терапевтических средств и/или диагностических средств) будут доставляться в клетки- или ткани-мишени, соответственно сводя к минимуму возможные системные неблагоприятные эффекты или токсичность, связанные с необъединенными модулями или их инкапсулированным содержимым. Например, если EDEM (например, iLNP) содержит один или более из ионизируемых липидов или иным образом обогащен ими, фазовый переход в липидном бислое одной или более клеток-мишеней может облегчить доставку инкапсулированных материалов (например, одного или более активных средств, инкапсулированных в липидную наночастицу) в клетки-мишени. Аналогично, в определенных вариантах осуществления соединения, раскрытые в данном документе, можно применять для получения гибридосом, которые характеризуются уменьшенной токсичностью *in vivo*. В определенных вариантах осуществления уменьшенная токсичность зависит от высоких эффективностей трансфекции, связанных с композициями, раскрытыми в данном документе, в результате чего уменьшенное количество такой композиции можно вводить субъекту для достижения необходимого терапевтического ответа или результата.

Гибридосому согласно настоящему изобретению можно сконструировать для облегчения инкапсуляции и высвобождения инкапсулированных материалов (например, одного или более активных средств) в одну или более клеток- и/или тканей-мишеней. Например, если гибридосома содержит один или более из фузогенных липидов или иным образом обогащена ими, фазовый переход и возможное нарушение липидного бислоя в одной или более клетках-мишенях может облегчать доставку инкапсулированных материалов (например, одного или более активных средств, инкапсулированных в гибридосоме).

Аналогично, в определенных вариантах осуществления встраивание липидов с ионизируемыми гидрофильными головными группами в EDEM может служить для того, чтобы стимулировать эндосомное или лизосомное высвобождение содержимого, которое инкапсулировано в гибридосоме. Такого усиленного высвобождения можно достичь с помощью опосредованного протонной губкой механизма разрушения, при котором способность соединения в EDEM может буферизовать закисление эндосомы, что, в свою очередь, стимулирует осмотическое набухание и разрушение эндосомной или лизосомной липидной мембраны и облегчает внутриклеточное высвобождение инкапсулированной в ней нагрузки в клетку-мишень.

В дополнительных вариантах осуществления гибридосома согласно настоящему изобретению может обеспечивать по меньшей мере одно из следующих дополнительных преимуществ для лечения: (1) увеличенное время нахождения в кровотоке у системы для доставки; (2) ослабление поглощения гибридосомы RES при использовании полученного от пациента BDM и необязательно при добавлении стабилизирующих фрагментов; (3) предотвращение преждевременного высвобождения нагрузки изнутри гибридосомы вследствие стабильного инкапсулирования; (4) уменьшенный ответ иммунной системы при введении в организм субъекта вследствие присутствия эндогенных компонентов BDM; (5) повышенный трансцитоз гибридосомы через биологические барьеры (например, эндотелиальный барьер, гематоэнцефалический барьер) в сосудистой сети благодаря эндогенным нацеливающим фрагментам на BDM или экзогенным нацеливающим фрагментам, прикрепленным к EDEM; (6) повышенное накопление гибридосом в пораженной заболеванием области, такой как область опухоли; (7) повышенная интернализация в эндосомы клетки-мишени благодаря эндогенным нацеливающим фрагментам, происходящим из BDM, и дальнейшее эндосомальное высвобождение благодаря фузогенным свойствам, придаваемым EDEM.

Как обсуждается выше, в определенных вариантах осуществления гибридосома согласно настоя-

шему изобретению обеспечивает возможность доставки активного средства преимущественно в пораженную заболеванием область. Такая направленная доставка также может позволить специалисту избежать высоких доз активного средства. Такая направленная доставка может повышать эффективность активного средства. Это, в свою очередь, помогает предотвратить токсические побочные эффекты, которые связаны с введением высоких доз различных активных средств или эффектами, связанными с самим носителем (например, липидов, экзогенных нацеливающих фрагментов). В определенных вариантах осуществления можно осуществлять лечение заболеваний или выявлять их с использованием низких доз активного средства целенаправленным образом, не воздействуя на не вовлеченные области организма.

Настоящим изобретением также предполагается гибридосома, содержащая BDM с эндогенно доступными нацеливающими фрагментами, которые могут облегчать успешную доставку активных средств в типы клеток, о которых из уровня техники известно, что ее тяжело трансфицировать *in vivo* и *in vitro* (например, стволовые клетки и иммунные клетки). Например, гибридосомы, содержащие BDM, полученные из лейкоцитов, могут проявлять усиленное поглощение клетками, тогда как сам EDEM проявляет уменьшенное поглощение клетками.

Гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, мониторинга, предупреждения и/или диагностики ряда заболеваний и состояний (например, воспаления, такого как воспаление, ассоциированное с раком). Определенные варианты осуществления могут включать доставку одного и того же или, возможно, разных терапевтических средств в область, пораженную заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления системы для доставки согласно настоящему изобретению могут быть особенно полезными для применений в онкологии, как, например, для лечения, мониторинга, предупреждения и/или диагностики ракового состояния (например, клетки злокачественной опухоли). В таких вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для доставки активного средства (например, терапевтического и/или диагностического средства) в область, пораженную раком (например, опухоль). Неограничивающие примеры раковых состояний, которые можно вылечить, подвергнуть мониторингу, предупредить и/или диагностику которых можно осуществлять, включают, без ограничения, лейкоз, лимфому, формы рака кожи (в том числе меланомы, базальноклеточные карциномы и плоскоклеточные карциномы), эпителиальные карциномы головы и шеи, рак легкого (в том числе плоскоклеточную или эпидермоидную карциному, мелкоклеточную карциному, аденокарциному и крупноклеточную карциному), рак молочной железы, формы рака, поражающие желудочно-кишечный тракт, злокачественные опухоли щитовидной железы, саркомы кости и мягкой ткани, рак яичника, карциному маточной трубы, рак матки, рак шейки матки, карциному предстательной железы, рак яичка, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак поджелудочной железы и печеночно-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предусматривается способ лечения субъекта с раком, характеризующимся солидными опухолями. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, включающей рак и болезнь Паркинсона.

В дополнительных вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для доставки активного средства в инфицированные клетки. В таких вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, мониторинга, предупреждения и/или диагностики вирусных инфекций.

В некоторых вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для целенаправленного воздействия на пораженную воспалением область у субъекта. Таким образом, в таких вариантах осуществления гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, предупреждения, мониторинга и/или диагностики состояния или заболевания, ассоциированного с воспалением. Типичные состояния включают, без ограничения, следующие: аллергии; астма; болезнь Альцгеймера; диабет; гормональные дисбалансы; аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит и псориаз; остеоартрит; остеопороз; атеросклероз, в том числе заболевание коронарных артерий; васкулит; хронические воспалительные состояния, такие как ожирение; язвы, такие как язва Маржолина; респираторные воспалительные заболевания, вызванные асбестом или сигаретным дымом; воспаления крайней плоти полового члена; воспаления, вызванные вирусами, такими как вирус папилломы человека, гепатит В или С или вирус Эпштейна-Барра; бильгарциоз; воспалительное заболевание органов таза; воспаление эпителия яичников; метаплазия Барретта; гастрит, вызванный *H. pylori*; хронический панкреатит; заражение китайской двуусткой; хронический холецистит и воспалительное заболевание кишечника; ассоциированные с воспалением формы рака, такие как рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак молочной железы; формы рака, поражающие желудочно-кишечный тракт, такие как рак желудка, печеночно-клеточная карцинома, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак носоглотки, рак пищевода, холангиокарцинома, рак желчного пузыря и аногенитальный рак; рак покровных тканей, такой как карцинома кожи; формы рака, поражающие дыхательные пути, такие как бронхиальный рак и мезотелиома; рак, поражающий мочеполовой тракт, такой как фимоз, карцинома полового члена и рак мочевого пузыря; и рак репродуктивной системы, такой как рак яичника. Гибридосому согласно настоящему изобретению можно применять совместно или одновременно с другими известными способами лечения заболеваний, в том числе, без ограничения, химиотерапией

и радиотерапией.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предусматривается способ модуляции экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. Эти способы обычно включают приведение клетки в контакт с гибридной согласно настоящему изобретению, которая связана с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида.

В связанных вариантах осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида у субъекта, включающий обеспечение субъекта гибридной согласно настоящему изобретению, где терапевтическое средство выбрано из siRNA, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способной экспрессировать siRNA, микроРНК или антисмысловый олигонуклеотид, и где siRNA, микроРНК или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, который специфично связывается с полинуклеотидом, который кодирует полипептид, или его комплементарной последовательностью.

Эти способы можно осуществлять посредством приведения гибриды согласно настоящему изобретению в контакт с клетками в течение периода времени, достаточного для того, чтобы произошла внутриклеточная доставка (например, внутрь ядра). Типичные применения включают использование хорошо известных процедур для обеспечения внутриклеточной доставки siRNA для осуществления нокдауна или сайленсинга конкретных клеточных мишеней. В качестве альтернативы применения включают доставку последовательностей ДНК или мРНК, которые кодируют терапевтически полезные полипептиды. Таким образом, предусматривается терапия генетических заболеваний посредством обеспечения продуктов дефектного или отсутствующего гена.

Также настоящим изобретением предусматривается совместная доставка одного или более отдельных инкапсулированных материалов для целенаправленного воздействия на клетки с помощью гибриды, описанной в данном документе. Соответственно, при слиянии двух отдельных EDEM с отдельными активными средствами в одной гибридной конкретный вариант осуществления можно применять для лечения одного нарушения или недостаточности, где каждое такое активное средство функционирует посредством разного механизма действия. Например, гибридная согласно настоящему изобретению может поглощать как EDEM, содержащий инкапсулированный полинуклеотид, предназначенный для деактивации или осуществления "нокдауна" функционирующего ненадлежащим образом эндогенного полинуклеотида и являющегося его продуктом белка или фермента, так и второй EDEM, содержащий инкапсулированный фермент, предназначенный для обеспечения замещения фермента. В определенных вариантах осуществления можно обеспечить слияние EDEM, содержащего диагностические средства, такие как наночастицы золота, с BDM в гибридной для лечения нарушения и определения местоположения пораженных клеток или органов посредством методик диагностической визуализации. В качестве альтернативы конкретные варианты осуществления настоящего изобретения могут облегчать совместную доставку, например, двух отдельных эндогенно продуцируемых полинуклеотидов (например, miRNA), посредством поглощения двух отдельных BDM в идентичный EDEM.

Один вариант осуществления настоящего изобретения является подходящим для лечения заболеваний или нарушений, связанных с недостаточностью белков и/или ферментов внутри клетки-мишени или секрецией их клеткой-мишенью, например, симптомы заболевания можно ослабить путем обеспечения композиций согласно настоящему изобретению (например, муковисцидоз). Нарушения, для которых является полезным настоящее изобретение, включают, без ограничения, такие нарушения, как болезнь Помпе, болезнь Гоше, бета-талассемия, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона, мышечные дистрофии (такие как, например, Дюшенна и Беккера), заболевания, относящиеся к гемофилии, связанная с SMN1 спинальная мышечная атрофия (SMA), боковой амиотрофический склероз (ALS), галактоземия, муковисцидоз (CF), недостаточности галактоцереброзидазы, атаксия Фридрейха, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера и болезнь Ниманна-Пика.

Кроме того, настоящим изобретением предусматривается новая платформа для разработки высокоиммуногенных вакцин, основанная на совместной доставке BDM, способного презентировать антиген, и содержащего адъювант EDEM. Комбинированная доставка адъювантов с антигенпрезентирующими BDM представляет собой перспективную стратегию для терапевтических вакцин для того, чтобы вызвать врожденный иммунный ответ за счет использования главных свойств двух компонентов: (1) сильной адъювантности, обеспечиваемой EDEM и (2) специфического адаптивного иммунного ответа на антиген(антигены), презентруемые BDM и ассоциированные с являющимся мишенью заболеванием. Например, BDM может презентировать любой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как один или более ассоциированных с опухолью антигенов для терапии рака, один или более антигенов патогена для лечения инфекции или любой другой антиген или комбинация антигенов, ассоциированных с другими заболеваниями, в частности, в случае состояний с подавленным иммунитетом и/или в случаях, когда необходимо сильное усиление иммунитета (например, у пожилых людей). Кроме того, настоящим изобретением предусматриваются композиции гибриды, которые индуцируют сильный иммунный ответ, важный для вакцин, таких как вакцины против рака, гепатита, гриппа, малярии и ВИЧ. Настоящее изобретение также является пригодным для любой терапии, при которой может быть полезным презентация комбинации антигенов иммунной системе пациента.

В дополнительном варианте осуществления иммунный ответ можно вызывать путем доставки гибридомеры, которая может включать ассоциированный с заболеванием антиген. (Публикация заявки на патент США № 20120189700; которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В одном варианте осуществления EDEM можно составлять для применения в вакцине, такой как, без ограничения, вакцина против патогена или рака.

В одном варианте осуществления EDEM можно составить для применения в качестве вакцины. В одном варианте осуществления EDEM может инкапсулировать по меньшей мере одну модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и/или мРНК, которая кодирует по меньшей мере один антиген. В качестве неограничивающего примера EDEM может включать по меньшей мере один экзогенный антиген и вспомогательное вещество для лекарственной формы вакцины (см. публикацию международной заявки № WO 2011/150264 и публикацию заявки на патент США № US20110293723, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Лекарственную форму вакцины можно выбрать с помощью способов, описанных в данном документе, известных из уровня техники и/или описанных в публикации международной заявки № WO 2011/150258 и публикации заявки на патент США № US20120027806, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В одном варианте осуществления EDEM может содержать по меньшей мере один адъювант. В другом варианте осуществления EDEM может содержать по меньшей мере одно терапевтическое средство и по меньшей мере один адъювант. В качестве неограничивающего примера EDEM, содержащий адъювант, можно составить с помощью способов, описанных в публикации международной заявки № WO 2011/150240 и публикации заявки на патент США № US20110293700, каждая из которых присутствует в данном документе посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления EDEM может инкапсулировать по меньшей мере один экзогенный ассоциированный с заболеванием антиген, который кодирует пептид, фрагмент или участок из вируса. В качестве неограничивающего примера EDEM могут включать, без ограничения, антигены, описанные в публикациях международных заявок № WO 2012/024621, WO 2012/02629, WO 2012/024632 и публикациях заявок на патент США № US20120064110, US20120058153 и US20120058154, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Гибридомеру согласно настоящему изобретению можно применять для доставки терапевтического средства в клетку или ткань, *in vitro* или *in vivo*. Способы и составы можно легко адаптировать для доставки любого подходящего терапевтического средства для лечения любого заболевания или нарушения, которое будет приемлемым для такого лечения. Способы согласно настоящему изобретению можно практически осуществлять *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, гибридомеру согласно настоящему изобретению также можно применять для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo* с применением способов, которые известны специалистам в данной области. В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гибридомеру согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель. Примеры фармацевтически приемлемых разбавителей включают растворы для внутривенной инъекции (например, солевой раствор или декстрозу). Композиция также может принимать форму крема, мази, геля, суспензии или эмульсии.

Для введения *in vivo* фармацевтические композиции, содержащие гибридомеру согласно настоящему изобретению, предпочтительно вводят парентерально (например, интраартикулярно, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно). В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят внутривенно или внутрибрюшинно посредством болюсной инъекции. Другие пути введения включают местное (через кожу, глаза, слизистые оболочки), пероральное, пульмональное, интраназальное, сублингвальное, ректальное и вагинальное. Более того, можно получать фармацевтическую композиция, подходящую для глазного введения. Такие составы могут иметь форму, например, глазных капель, включающих, например, 0,1/1,0% (вес./вес.) раствор и/или суспензию активного ингредиента во вспомогательном веществе в виде воды или маслянистой жидкости. Такие капли могут дополнительно содержать буферные средства, соли и/или один или более любых остальных дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция в соответствии с вышеизложенным для доставки диагностических средств.

Наряду с доставкой активных средств для лечения, гибридомеру согласно настоящему изобретению может обеспечивать средство для выявления ткани и клеток, пораженных заболеванием или состоянием, а также выявления прогрессировать или рецидива после терапии. Современная неинвазивная визуализация основывается на применении контрастных средств, в которых используются преимущества повышенного обмена веществ и метаболизма аминокислот в опухолях, но они ограничиваются фоновыми помехами и неспецифическим поглощением. Таким образом, настоящим изобретением предусматривается фармацевтическая композиция в соответствии с вышеизложенным для доставки диагностических средств непосредственно к области-мишени, такой как область опухоли и/или область воспаления, для обеспечения возможности ее диагностической визуализации и точной локализации.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается способ получения гибрид-

ного биологически совместимого носителя (гибридосомы), который содержит структурные и биологически активные элементы, происходящие по меньшей мере из одного биологически совместимого модуля для доставки (BDM) и по меньшей мере одного сконструированного модуля для инкапсулирования лекарственного средства (EDEM), содержащего по меньшей мере один регулируемый фузогенный фрагмент, причем указанный способ включает:

(a) обеспечение по меньшей мере одного EDEM, обладающего по меньшей мере одним фузогенным фрагментом, или композицией, содержащей его;

(b) обеспечение по меньшей мере одного BDM или композиции, содержащей его;

(c) приведение в контакт указанного по меньшей мере одного EDEM с указанным по меньшей мере одним BDM при pH ниже 7,4 и при температуре от 0 до 60°C, тем самым объединяя указанный по меньшей мере один EDEM с указанным по меньшей мере одним BDM и получая указанную гибридосому; и необязательно

(d) очистку указанной гибридосомы от неслитых EDEM и/или BDM.

Способ согласно настоящему изобретению обладает несколькими важными характеристиками, которые делают его достаточно применимым к данной области. Настоящим изобретением предусматривается способ получения гибридосомы путем объединения одного или более EDEM и одного или более BDM с получением гибридного компонента, проявляющего характеристики исходных компонентов EDEM и BDM. Объединение EDEM с BDM включает по меньшей мере одну фузогенную частицу, присутствующую в любом из двух компонентов, чью способность к слиянию регулируют путем изменения реакционной среды. В определенных вариантах осуществления EDEM (например, iLNP) селективно проявляют повышенную способность (например, электростатическое взаимодействие) к объединению с BDM. В определенных вариантах осуществления BDM (например, экзосомы) селективно проявляют повышенную способность (например, более высокую текучесть мембраны) к объединению с BDM. Соответственно, в данном документе предусматриваются способы получения гибридосом путем определения условий реакции. Такие способы обычно включают стадию приведения BDM в контакт с EDEM, используемыми в данном документе (например, iLNP), таким образом, чтобы контакт вызывал простую агрегацию и/или разрушение мембраны со смешиванием липидов посредством полуслияния и/или слияния, что в результате приводит к поглощению некоторой части популяций EDEM и BDM в субпопуляцию гибридосом. При этом предусматриваемые способы характеризуются существенными преимуществами благодаря средствам индукции, контроля, ограничения и/или завершения соответствующего механизма объединения. Более того, способ согласно настоящему изобретению позволяет осуществить замену или перегруппировку модульных элементов для получения уместной с терапевтической точки зрения архитектуры.

В одном варианте осуществления водная смесь с EDEM, содержащая предварительно образованные везикулы с определенной морфологией и физическими характеристиками, где один или более липидов имеют или предполагают фузогенные характеристики, добавляют в одну камеру через одно впускное отверстие и водную смесь с собранными BDM добавляют во второе впускное отверстие. Компоненты затем приводят в контакт в общей камере. В одном варианте осуществления указанный контакт усиливается при смешивании исходных композиций посредством диффузии. В предпочтительном варианте осуществления смешивание происходит механически (например, посредством встряхивания). В качестве альтернативы объединение BDM и EDEM можно облегчить посредством контролируемых динамических характеристик жидкости, как, например, в микропотоковом смешивающем устройстве. В таком варианте осуществления EDEM и BDM впрыскивают в отдельные впускные отверстия микропотоковой камеры, и контролируемое смешивание происходит за счет геометрии камеры и профиля потока.

Настоящее изобретение относится к способу получения гибридосомы, где указанный способ обеспечивает контроль над фузогенными свойствами EDEM и BDM. Для получения гибридосомы согласно настоящему изобретению включение реакционной среды, в которой компоненты EDEM и/или BDM приобретают повышенные фузогенные характерные свойства, является предпочтительным вариантом осуществления. В одном варианте осуществления кислая реакция среды повышает суммарный катионный поверхностный заряд EDEM и может одновременно иметь BDM, приобретающие повышенный суммарный анионный поверхностный заряд. В предпочтительном варианте осуществления объединение происходит в кислом буфере с pH от приблизительно 4 до приблизительно 6. Не вдаваясь в какую-либо теорию, в другом варианте осуществления температуру реакционной смеси можно модулировать, чтобы вызвать фазовый переход липида в EDEM из бислоя в гексагональную фазу при одновременном снижении жесткости мембраны в BDM. Температуру реакционной смеси ограничивают приблизительно до 60°C вследствие возможного разрушения составляющих BDM (например, белков). В предпочтительном варианте осуществления температуру реакционной смеси устанавливают на 37°C. В одном варианте осуществления реакционная среда проявляет физиологическую ионную силу. Настоящее изобретение предусматривает применение смесей NaCl или KCl, но не ограничивается ими. В дополнительном варианте осуществления реакционный раствор может иметь присутствующие ионы кальция.

Таким образом, настоящим изобретением предусматривается способ получения гибридосомы, где объединение EDEM и BDM облегчают посредством совместного инкубирования в реагирующей среде в

течение периода времени, включающего, без ограничения, 5, 15, 30 мин, 1, 2, 5 ч или более. В одном предпочтительном варианте осуществления совместное инкубирование происходит в течение приблизительно 1 ч.

В конкретных вариантах этого способа среду смешивания изменяют для ограничения соединения модулей. В целом, соединение EDEM и BDM контролируют по ряду параметров, которые могут включать концентрацию частиц, суммарный поверхностный заряд, плотность заряда, pH, ионную силу, концентрации добавок и температуру. Способы изменения среды смешивания хорошо известны из уровня техники. Например, без ограничения, добавление растворов с более высокими буферными емкостями или диализ смесей с модулями можно применять для изменения свойств реакционного раствора. В одном предпочтительном варианте осуществления колонки для обессоливания можно использовать для изменения свойств раствора.

Настоящее изобретение также относится к способу получения гибридом, где способ необязательно может включать стадию очистки этих гибридом от избытка отдельных модулей. Для получения гибридом согласно настоящему изобретению преимущественным вариантом осуществления является включение стадии очистки. В случае, когда желательной является очистка гибридом, очистку можно осуществлять с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или другой среды, которая является подходящей для образования градиента плотности. Тем не менее, понятно, что также можно использовать другие способы очистки, такие как хроматография, фильтрация, разделение фаз, осаждение или абсорбция. Способы очистки включают, например, очистку посредством центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или очистку через колонку для гель-хроматографии. Градиент сахарозы может находиться в диапазоне от приблизительно 0 до приблизительно 60% сахарозы, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 30% сахарозы. Буфер, в котором создают градиент сахарозы, может представлять собой любой водный буфер, подходящий для хранения фракции, содержащей комплексы, и предпочтительно буфер, подходящий для введения гибридом в клетки и ткани. Альтернативные методики разделения могут включать, без ограничения, изоэлектрическое фокусирование и/или иммуноаффинную хроматографию. Например, EDEM, содержащие ионизируемые липиды, проявляют суммарный катионный поверхностный заряд, и их можно разделить посредством электрофореза. В одном варианте осуществления настоящего изобретения очистку гибридом можно осуществлять с помощью методик последовательной очистки. Например, с помощью первой иммуноаффинной хроматографией, основывающейся на аффинности к поверхностным молекулам BDM, за которой следует вторая иммуноаффинная хроматография, основывающаяся на аффинности к молекулам PEG, можно последовательно отделять гибридомы от избытка BDM и EDEM. Дополнительные методики разделения могут охватывать фракционирование в потоке с асимметричным полем течения в сочетании со светорассеянием под несколькими углами для фракционирования везикул реагирующего вещества и продукта.

EDEM, применяемые в способе согласно настоящему изобретению, облегчают или усиливают инкапсулирование и высвобождение инкапсулированных материалов (например, активного средства) в один или более целевых BDM (например, посредством проникновения в липидные мембраны BDM или слияния с ними). В определенных вариантах осуществления структурные характеристики EDEM и BDM, описанных в данном документе, демонстрируют высокие эффективности слияния. Термин "эффективность слияния" относится к относительному количеству гибридом, полученных из EDEM и BDM, которые являются объектом слияния. В определенных вариантах осуществления структурные характеристики EDEM и BDM, описанных в данном документе, демонстрируют высокие эффективности слияния, таким образом повышая вероятность того, что надлежащие количества инкапсулированных материалов (например, активного средства) и эндогенного биологического материала будут объединены в гибридоме, и, следовательно, сводя к минимуму возможные системные побочные эффекты или токсичность, связанные с соединением или их инкапсулированным содержимым.

В определенных вариантах осуществления составы EDEM имеют регулируемые характерные свойства для обеспечения получения гибридомы, компонентом которой является такой модуль (например, совместимость с мембраной). Например, встраивание ионизируемых липидов, вспомогательных липидов, модифицированных PEG липидов, pH-чувствительных полимеров и/или pH-активируемых проникающих в клетку пептидов в EDEM, раскрытый в данном документе, может контролировать способность к слиянию такого модуля (или гибридомы, компонентом которой является такой модуль) с липидной мембраной одного или более целевых BDM, тем самым усиливая, например, контроль над соединением EDEM-BDM. Не вдаваясь в конкретную теорию, относительное молярное отношение липидов iLNP друг к другу основывается на характеристиках выбранных липидов, природе целевого BDM, характеристиках инкапсулированных материалов и характеристиках предполагаемой мишени доставки (например, клетки, ткани или органа). Дополнительные факторы, которые необходимо учитывать, включают, например, токсичность, размер, заряд, pKa, способность к слиянию и насыщенность алкильной цепи выбранных липидов.

В определенных вариантах осуществления содержание ионизируемого липида в композициях EDEM, применяемых в данном документе, характеризуется одним или более свойствами, которые наделяют такие модули преимуществами по сравнению с субъединицами других классов. Например, в опре-

деленных вариантах осуществления EDEM, применяемые в данном документе, позволяют контролировать и адаптировать свойства объединения (например, поверхностный заряд). В частности, соединения, раскрытые в данном документе, могут характеризоваться определенной и регулируемой катионной природой, а также способностью к объединению с потенциально противоположно заряженными BDM. Такие способности могут включать, например, контролируемое образование ионных пар, способности к слиянию и/или стимуляцию высвобождения инкапсулированных материалов (например, активных средств) в полученную композицию.

В определенных вариантах осуществления составы EDEM имеют регулируемые характерные свойства для обеспечения совместимости мембран между EDEM и BDM. Например, адаптированное встраивание вспомогательных липидов в EDEM, раскрытый в данном документе, может обеспечивать совместимую жесткость мембраны такого модуля для облегчения объединения с липидной мембраной одного или более целевых BDM. В частности, относительное молярное соотношение липидов и стеролов, таких как холестерин можно подбирать таким образом, чтобы они были подобны характеристикам целевого BDM. Дополнительные факторы, которые следует учитывать, включают, например, получаемую в результате жесткость гибридомы, компонентом которой является такой модуль, для обеспечения взаимодействия с клеткой- или тканью-мишенью.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения BDM имеют регулируемые характерные свойства для обеспечения совместимости мембран между EDEM и BDM. Например, высокое содержание компонентов мембраны BDM, таких как, без ограничения, сфингомиелин, насыщенные жирные кислоты, встроенные в фосфолипиды, и холестерин, может приводить к более высокой жесткости, чем у клетки-донора, из которой был получен BDM. Одновременно, поскольку компоненты мембраны BDM могут отличаться от плазматической мембраны клеток, из которых получен BDM, что приводит к более высокой жесткости, BDM могут проявлять повышенную стабильность во время процесса производства. Тем не менее, предполагается, что при кислом pH среды (например, приблизительно pH 5) мембрана BDM согласно настоящему изобретению проявляет более низкую жесткость (и более высокую способность к слиянию) и может обеспечивать возможность объединения с мембраной EDEM.

В определенных вариантах осуществления встраивание ионизируемых липидов, например, с одной или более алкиламино-группами или фрагментами в применяемые EDEM (например, в качестве головной группы) может дополнительно стимулировать разрушение мембраны BDM за счет использования их способности к слиянию. Это может основываться не только на оптимизированной  $pK_a$  и, следовательно, pH-зависимой катионной природе липида, но также на оптимизированной температуре фазового перехода, стимулирующей переход из фазы бислоя в высокофузогенную обратную гексагональную фазу  $H_{II}$  (Semple et al., 2010). Считается, что результатом является стимуляция образования ионных пар между ионизируемыми липидами в их катионном состоянии и анионными липидами, тем самым нарушая структуру мембраны BDM и перенося содержимое в гибридому.

EDEM, применяемые в данном документе, можно применять для получения фармацевтических композиций, которые облегчают или усиливают инкапсулирование и высвобождение инкапсулированных материалов (например, активных средств) в один или более целевых BDM (например, посредством проникновения в липидные мембраны BDM или слияния с ними). Например, если композиция на основе липидов (например, iLNP) содержит один или более из ионизируемых липидов или иным образом обогащена ими, фазовый переход в липидном бислое одного или более BDM может облегчить доставку инкапсулированных материалов (например, активных средств, инкапсулированных в липидную наночастицу) в одну или более гибридом.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения контроль над общим количеством ионизируемых липидов внутри EDEM может служить для контроля структурных характеристик гибридом, раскрытых в данном документе. Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения физические характеристики EDEM являются пропорциональными содержанию ионизируемых липидов. Например, EDEM с малым диаметром могут иметь более низкое общее содержание ионизируемых липидов по сравнению с EDEM с большим диаметром. Следовательно, один или более из EDEM, раскрытых в данном документе, могут объединяться с идентичным BDM до тех пор, пока не будут достигнуты нейтральный суммарный поверхностный заряд и, таким образом, ограниченный размер.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения EDEM можно производить для инкапсулирования ферментных и биологически активных каталитических соединений, которые при интеграции в гибридому способны взаимодействовать с одним или более соединениями, происходящими из BDM. Например, можно производить EDEM, содержащие рибонуклеазы, способные к разрушению любых эндогенных полинуклеотидов, переносимых в гибридому с помощью BDM.

Следующие примеры, которые дополнительно описывают настоящее изобретение, представлены с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом.

Пример 1.

Получение iLNP в виде сконструированных и инкапсулирующих лекарственное средство модулей.

Материалы и способы для примеров 1-4.

## А) Химические вещества.

1,2-Дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] (амин-PEG-DSPE), [1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил)] (NBD-PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[малеимид-(полиэтиленгликоль)-2000] (mal-PEG-DSPE), дистеароил-фосфатидилхолин (DSPC), 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний-пропан (DODAP), N-пальмитоил-сфингозин-1-сукцинил[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG-Cer) и холестерин приобретали у Avanti Polar Lipids (Алабастер, Алабама). Процедуры синтеза 1,2-дилинолеилокси-3-диметиламинопропана (DLinDMA) и PEG-липидов были описаны ранее (Heyes, Palmer, Bremner, & MacLachlan, 2005).

## В) Получение составов с iLNP с помощью экструзии.

Получение предварительно образованных везикул.

В зависимости от желаемых свойств везикулы ионизируемый катионный липид (DLinDMA или DODAP), DSPC, холестерин и PEG-липид (PEG-s-DMG или PEG-Cer) растворяли в этаноле в соответствующем молярном отношении (например, 40:17,5:40:2,5). Для образования везикул липидный состав перемешивали в водный буфер с низким pH (50 мМ ацетат, pH 4) при перемешивании с помощью вихревой мешалки до достижения конечной концентрации примерно 10 мМ и соотношения этанола и водной среды 3:7. Полученные многослойные везикулы затем экструдировали через два установленных друг за другом поликарбонатных фильтра Nuclepore™ (Whatman) с размером пор 80 или 100 нм с использованием мини-экструдера (Avanti) при комнатной температуре.

## Инкапсулирование олигонуклеотида в предварительно образованные везикулы.

Инкапсулирование олигонуклеотида осуществляли с использованием ранее описанного способа с предварительно образованной везикулой (Mauger et al., 2001). В целом, олигонуклеотид растворяли в водном растворе, соответствующем раствору с экструдированными везикулам (50 мМ ацетат, pH 4, 30% этанол), с последующим добавлением по каплям к однослойным везикулам при смешивании с помощью вихревой мешалки. Инкапсулирование плазмиды, siRNA и shRNA осуществляли при весовом соотношении плазмиды и липида 1:30 и весовом соотношении РНК и липида 1:16 соответственно. Смесь затем инкубировали при 37°C в течение 30 мин с последующим удалением остаточного этанола и заменой буфера посредством длительного диализа против PBS (pH 7,4) при 4°C. Неинкапсулированные shRNA и плазмиду удаляли с помощью анионообменной спин-колонки (Pierce - Thermo Fisher Scientific Inc.), уравновешенной с PBS (pH 7,4). Эффективность инкапсулирования олигонуклеотида определяли по оптическому поглощению при 260 нм (Spectramax M5e, Molecular Devices) после растворения нагруженных везикул в объемном соотношении 1:5 в кислом изопропанол (10% HCl).

## Инкапсуляция белков в iLNP.

В сравнении с вышеизложенным протоколом iLNP, инкапсулирующие бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma Aldrich) и гемоглобин человека (Sigma Aldrich), получали путем заблаговременного растворения белка в водном буфере (50 мМ ацетат натрия, pH 5,5) до достижения конечной концентрации 1,5 и 1 мг/мл соответственно, с последующим добавлением по каплям этанольного раствора (конечное содержание EtOH 20%) смеси липидов (молярное соотношение DlinDMA: DSPC: Chol: PEG-Cer составляет 40:17,5:40:2,5) при смешивании с помощью вихревой мешалки. Этот раствор инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Липидные везикулы, инкапсулирующие BSA, экструдировали, как описано выше. Удаление несвязанного белка, остаточного этанола и замену буфера осуществляли посредством длительного диализа (300 кДа MWCO, Spectrumlabs) против PBS (pH 7,4, 4°C). Эффективность инкапсулирования белка определяли посредством набора для анализа белка BCA™ Protein Assay Kit (Pierce - Thermo Fisher Scientific Inc.) после растворения iLNP с использованием 10% Triton X-100 (Sigma Aldrich). Длительное удаление несвязанного белка отслеживали по удержанию детергента в ходе время количественного определения белка.

## Инкапсуляция малых молекул в iLNP.

Аналогично вышеизложенному протоколу iLNP, инкапсулирующие карбоксифлуоресцеин, получали путем заблаговременного растворения малой молекулы в водном буфере (25 мМ ацетат натрия, pH 5,5) до достижения конечной концентрации 1 мМ с последующим добавлением по каплям этанольного раствора (конечное содержание EtOH 20%) смеси липидов (молярное соотношение DODAP: DSPC: Chol: PEG-Cer составляет 40:17,5:40:2,5) при смешивании с помощью вихревой мешалки. Этот раствор инкубировали при 37°C в течение 1 ч с последующей экструзией, как описано выше. Удаление малых молекул, остаточного этанола и замену буфера осуществляли посредством длительного диализа (300 кДа MWCO, Spectrumlabs) против PBS (pH 7,4, 4°C).

## Инкапсуляция наночастиц Au в iLNP.

Вследствие нестабильности наночастиц Au в ионном буфере инкапсуляцию 20 нм наночастиц Au (Nanos Inc.) осуществляли посредством содержания наночастиц Au в растворе в деионизированной воде при весовом соотношении золота и липида 1:20. Как описано выше, добавляли этанольную смесь липидов, раствор экструдировали и буфер заменяли на PBS посредством диализа. В PBS несвязанные наночастицы Au агрегируются и осаждаются. Присутствие инкапсулированных наночастиц золота отслеживали

по оптическому поглощению Au-iLNP в УФ и видимой области спектра при длине волны для плазмонного резонанса около 525 нм, а также с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ). Повышение оптического поглощения в УФ и видимой области спектра при длине волны 450 нм по сравнению с пустыми везикулами использовали для определения концентраций золота, как описано ранее (Haiss, Thanh, Aveyard, & Fernig, 2007). Как показано на фиг. 1, спектры оптического поглощения в УФ и видимой области как у исходных наночастиц золота, так и у Au-iLNP показывают характерный пик поверхностного плазмонного резонанса при длине волны примерно 550 нм. Подробнее, эффективность инкапсуляции 30% для Au-iLNP и 26% для Au-ДНК-iLNP определяли по считыванию относительного повышения оптического поглощения при длине волны 450 нм по сравнению с пустыми iLNP и ДНК-iLNP. Фотографии, полученные с помощью электронной микроскопии, приведенные на фиг. 2, служили доказательством присутствия инкапсулированных наночастиц золота.

С) Получение состава с iLNP с помощью микропотоковой системы.

Получение нагруженных siRNA липидных наночастиц при использовании микропотоковой системы для быстрого смешивания.

Липидные наночастицы получали в микропотоковой системе Nanoassemblr™ (Precision NanoSystems) в соответствии с инструкциями производителя. В зависимости от желаемого состава этанольный раствор, подобный раствору в подходе с предварительно образованными везикулами, состоящий из DLinDMA, холестерина, DSPC и PEG-липида в соответствующем молярном соотношении (например, 40:40:18:2), получали при концентрациях общих липидов 10 мМ. Более того, водный раствор siRNA с весовым соотношением siRNA и липида 1:16 готовили в 25 мМ ацетатном буфере при pH 4,0. В зависимости от общего полученного объема шприцы на 1 и 3 мл использовали для создания входящего потока с общей скоростью потока 12 мл/мин. Для каждого состава водный раствор siRNA смешивали с этанольно-липидным раствором при соотношении скоростей потоков 3:1 (Aq:Et) при комнатной температуре. Продукт затем подвергали диализу против PBS для удаления остаточного этанола, а также для повышения pH до 7,4 и несвязанные siRNA удаляли, как описано для способа с использованием предварительно образованных везикул, приведенным выше.

Пример 2.

Выделение внеклеточных везикул (EV) в качестве биологически совместимых модулей для доставки.

Экзосомы.

Экзосомы выделяли из надосадочной жидкости линий клеток лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL-ехо) и глиобластомы (GBM-ехо) с помощью процедур дифференциального центрифугирования, которые ранее описаны They et al. (Théry, Amigorena, Raposo, & Clayton, 2006). Экзосомы затем измеряли в отношении содержания в них белка с использованием набора для анализа белков BCA™ Protein Assay Kit (Pierce - Thermo Fisher Scientific Inc.) и аликвоты экзосом хранили при -80°C. Для дополнительной очистки осадок экзосом растворяли в PBS, наслаивали поверх сахарозной подушки с использованием стандартных протоколов.

Микровезикулы.

Образцы микровезикул, полученных из тромбоцитов человека и активированных полиморфноядерных нейтрофилов (PLT-MV и PMN-MV), выделяли из полученных от людей проб. Вкратце, PLT-MV выделяли с помощью дифференциального центрифугирования концентратов тромбоцитов, полученных при переливании крови от здоровых доноров, как описано выше (Sadallah, Eken, Martin, & Schifferli, 2011). PMN-MV очищали, как недавно опубликовано (Eken, Sadallah, Martin, Treves, & Schifferli, 2013); PMN выделяли из свежей лейкоцитарной пленки из крови от здорового донора. Их активировали формил-метионил-лейцил-фенилаланином и выделившиеся из клеток микровезикулы выделяли посредством дифференциального центрифугирования.

Пример 3.

Модификация поверхности iLNP путем связывания пегилированных липидов с Fab'-фрагментами, фрагментами антител, пептидами и гликозаминогликанами

Полученную конструируемой совместимость iLNP демонстрировали посредством конъюгирования восстановленного антитела, Fab' фрагмента, слитого пептида и гликозаминогликана с пегилированным липидом, заякоренным в мембрану iLNP. По сравнению с составом из примера 1 0,5 мол.% пегилированных липидов заменяли модифицированными PEG липидами с малеимидной группой или аминогруппой на дистальном конце PEG. Конъюгирование осуществляли в соответствии со стандартными протоколами на основе реакций между (1) малеимидными группами на дистальных концах PEG и свободными тиольными группами восстановленного антитела, Fab' фрагмента или тиолированными на конце пептидами; (2) аминогруппами на дистальных концах PEG и активированными карбоксильными группами на гликозаминогликановой цепи гликозаминогликана (GAG).

Способы.

Fab'-фрагмент.

Вначале, F(ab)<sub>2</sub> фрагменты антител к CD38 восстанавливали 2-меркаптоэтиламина (MEA) (Pierce -

Thermo Fisher Scientific Inc.) с использованием пяти из конечных концентраций, упомянутых в инструкциях поставщика. 60 мкг F(ab)<sub>2</sub> инкубировали с 10 mM MEA в реакционном буфере (1 mM EDTA, PBS) в течение 90 мин при 37°C. MEA удаляли путем замены буфера на реакционный буфер с использованием спин-колонки на обессоливания Zeba™ (Pierce - Thermo Fisher Scientific Inc.). Нагруженные siRNA iLNP немедленно добавляли (соотношение mal:Fab' составляет 2:1) и инкубировали на встряхиваемом планшете при 4°C в течение ночи. Несвязанные антитела/фрагменты разделяли на колонке с сефарозой CL-4B, уравновешенной PBS (pH 7,4). Фракции, содержащие Fab'-фрагменты, выявляли в результате считывания оптического поглощения при 280 нм, объединяли и концентрировали в фильтрующей центрифуге с порогом отсечения 10 кДа (Amicon® Ultra-0.5, Merck Millipore). Гель-электрофорез (SDS-PAGE) при невозможности восстановления условий с использованием 10% акриламида проводили для подтверждения целостности Fab'-фрагментов после процесса восстановления F(ab)<sub>2</sub> до Fab'.

IgG-антитело.

IgG-антитела восстанавливали дитиотреитолом (DTT) (Sigma). Перед реакцией связывания антитело восстанавливали 25 mM DTT в течение 1 ч при 4°C в PBS. Восстановленное Ab отделяли от избытка DTT при использовании спин-колонки для обессоливания с порогом отсечения 40 кДа Zeba™ (Pierce - Thermo Fisher Scientific Inc.), уравновешенной PBS (pH 7,4). Конъюгирование (соотношение tal:антитело составляет 1:4) осуществляли в PBS (pH 7,4) в течение ночи 4°C. Несвязанные антитела удаляли на колонке с сефарозой CL-2. Конъюгирование антитела определяли по считыванию оптического поглощения при 280 нм, как описано для Fab'-фрагментов.

Пептид.

26-Аминокислотный пептид-аналог мелиттина с N-концевым цистеином конъюгировали с pDNA-iLNP посредством смешивания с тиолированным пептидом при молярном отношении пептида к малеимиду 1:1 и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре.

Гликозаминогликаны.

Гликозаминогликаны (MW 5 кДа) конъюгировали с аминогруппой на дистальных концах PEG посредством традиционной реакции связывания EDC-сульфо-NHS. Вначале гликозаминогликаны активировали с помощью EDC/NHS (соотношение EDC:COOH составляет 1:1, соотношение EDC/NHS составляет 1:1) в DIW в течение 1 ч с последующим добавлением iLNP (соотношение гликозаминогликан:амин составляет 5:1) в PBS (pH 8,2). Реакцию продолжали в течение 2 ч, а за этим следовал диализ против PBS (pH 7,4) при комнатной температуре с порогом отсечения 10 кДа для удаления несвязанных гликозаминогликанов.

Успешное конъюгирование дополнительно определяли путем измерения гидродинамического диаметра с помощью DLS. Как можно увидеть в таблице, сравнение гидродинамического диаметра (Dh) с помощью DLS, средний диаметр iLNP увеличивался после связывания с IgG, слитыми пептидами, Fab'-фрагментами и гликозаминогликанами.

Пример 4. Характеристика iLNP и EV, секретируемых *in vivo*.

После созревания iLNP и выделения EV, как описано в примерах 1-3, распределения по размеру для iLNP и EV записывали с помощью DLS (Zetasizer NS, Malvern) и NTA (LM20, Nanosight) с использованием стандартных протоколов. Как показано в таблице, средние размеры возрастали с инкапсулированием нагрузки или модификацией поверхности iLNP. Благодаря контролируемым условиям синтеза можно получить iLNP с небольшим коэффициентом полидисперсности (PDI), что также отражается в отчетливом мономодальном распределении по размеру в результате NTA. В виде секретируемых везикул экзосомы характеризуются присущей полидисперсностью. Как показано на фиг. 3, подход с использованием одиночных частиц в анализе NTA выявляет мономодальное распределение по размеру для пустых iLNP и субпопуляций GBM-echo с разными размерами.

## Определение размера iLNP и экзосом, а также эффективности инкапсулирования нагрузки

Образцы	DLS <sup>a</sup>		NTA <sup>b</sup>		Инкапсулированная нагрузка	
	D <sub>v</sub> (нм)	PDI	D (нм)	Среднеквадратичная ошибка		
<i>Пустые iLNP</i>						
2,5% PEG	66,8	0,167	84,4 ± 1,6	65,5 ± 1,9	-	5
10% PEG	70,4	0,058	-	-	-	
Ионизируемый липид DODAP	121,2	0,098	-	-	-	
<i>iLNP с олигонуклеотидами</i>						
pDNA GFP	89,3	0,210	99,0 ± 4,1	85,0 ± 4,9	60,4% <sup>c</sup>	
shRNA	71,6	0,074	80,2 ± 0,8	30,0 ± 2,0	86,9% <sup>c</sup>	
siRNA	128,0	0,056	-	-	66,3% <sup>c</sup>	
siRNA (микропотоковое устройство)	83,0	0,270	-	-	93,0% <sup>c</sup>	
<i>iLNP с модифицированной поверхностью</i>						
0,5% PEG-Mal (пустые)	81,2	0,213	-	-	-	10
0,5% PEG-Mal (pDNA)	108,4	0,194	-	-	63,8% <sup>c</sup>	
0,5% PEG-Mal (siRNA)	111,0	0,049	-	-	83,43% <sup>c</sup>	
0,5% PEG-NH <sub>3</sub> (siRNA)	129,1	0,088	-	-	77,8% <sup>c</sup>	
IgG-Mal Conj. (пустые)	108,2	0,281	-	-	-	
Пептид-Mal Conj. (pDNA)	116,6	0,345	-	-	-	
Fab'-Mal Conj. (siRNA)	126,4	0,052	-	-	-	
GAG-NH <sub>3</sub> Conj. (siRNA)	189,3	0,248	-	-	-	
<i>iLNP с белками</i>						
Бычий сывороточный альбумин	155,9	0,210	-	-	0,599 мг/мл <sup>f</sup>	
Гемоглобин	202,5	0,274	-	-	0,080 мг/мл <sup>f</sup>	
<i>iLNP с наночастицами</i>						
20 нм NP золота	104,2	0,083	-	-	6,98x10 <sup>11</sup> N/мл <sup>g</sup>	
20 нм NP золота + pDNA	96,1	0,155	-	-	6,06x10 <sup>11</sup> N/мл <sup>g</sup>	
<i>Малые молекулы</i>						
Карбоксифлуоресцин	83,6	0,106	-	-	-	
<i>Экзосомы</i>						
Экзосомы GBM	127,7	0,250	128,3 ± 4,7	59,6 ± 4,8	-	
В-клеточные экзосомы	126,0	0,100	186 <sup>e</sup>	69 <sup>e</sup>	-	

<sup>a</sup> результаты представляют среднее значение от 3 экспериментов

<sup>b</sup> результаты представляют среднее значение ± SE от трех фрагментов из 1800 кадров

<sup>c</sup> A260 UV-Vis (после разрушения с использованием

HCl-IPrOH)

<sup>d</sup> A280 UV-Vis, полученные от неконъюгированных

фракций

<sup>e</sup> анализ белков BCA (после разрушения детергентом)

<sup>f</sup> A450 UV-Vis (только золото)

<sup>g</sup> результаты представляют 900

кадров

20

## Пример 5. Контролируемое иницирование взаимодействия BDM и EDEM.

Изучали, будет ли взаимодействие между iLNP и экзосомами индуцироваться изменением pH среды. Как показано на фиг. 4, средний диаметр iLNP/экзосомы в растворе увеличивается в буфере для слияния (10 mM MES, pH 5,5, 145 mM NaCl, 5 mM KCl), тогда как никакого значительного изменения не проявлялось при pH 7,4. Поскольку комплексная природа измерений DLS делает сложной точное определение наличия взаимодействий между двумя субъединицами, фокус делали на взаимодействии между липидными мембранами как экзосом, так и iLNP.

Помимо изменений размера смешивание липидов между двумя мембранами представляет собой дополнительный способ определения факта слияния. В ходе процесса слияния липиды из двух мембран диспергируются в новообразованной мембране. Смешивание липидов отслеживали по повышению флуоресценции, являющейся результатом разбавления липофильного самозатухающего родаминового красителя (R18). Экзосомы (20 мкг белка) метили 1 мкл этанольного раствора хлорида октадецилпроламида В (R18) (Biotium) (1 mM) в MES буфере (10 mM MES, pH 5,5, 145 mM NaCl, 5 mM KCl). Этот раствор инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Невстроившийся R18 удаляли при использовании колонки для обессоливания Zebaspin® (порог отсечения 40 кДа), уравновешенной MES буфером для слияния (10 mM MES, pH 5,5, 145 mM NaCl, 5 mM KCl). Меченные R18 экзосомы (5 мкг общего белка) суспендировали в соответствующем буфере в кварцевой кювете с перемешиванием и флуоресценцию образца измеряли с помощью спектрофотометра LS55 (Perkin Elmer) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны испускания 590 нм. После периода времени уравновешивания, составляющего 3 мин, немеченные iLNP (30 мкг общего липида) добавляли к экзосомам и флуоресценцию отслеживали в течение дополнительных 30 мин. Максимальное разведение R18 получали путем добавления Triton X-100 для разрушения мембран. Степень смешивания липидов измеряли как разницу уравновешенной флуоресценции от самих экзосом и выражали в виде % от максимального возобновления флуоресценции после разрушения экзосом детергентом. Аналогично экзосомам образцы микровезикул (0,25 мкг общего белка в PLT-MV и 1,2 мкг общего белка в PMN-MV) метили этанольным раствором R18 с последующим удалением несвязанного красителя и отслеживанием повышения флуоресценции, как упоминалось выше.

При слиянии немеченных iLNP и меченных R18 экзосом родамин, встроившийся в мембрану экзосомы, диспергировался в немеченных частях липосомальной мембраны, приводя в результате к уменьшенному близкому самозатуханию, и, следовательно, флуоресценция снижалась пропорционально степени слияния мембран. Как показано на фиг. 5, быстрое повышение флуоресценции происходило при pH 5,5, медленное и постоянное повышение флуоресценции при pH 6,6, тогда как смешивание липидов затруднялось при pH 7,6. Подтверждая то, что катионная природа iLNP, а не изменение pH, была движущей силой смешивания липидов, на фиг. 6 показано, что добавление липосом с 0% DLinDMA (DSPC/Chol/PEG) приводило к отсутствию возобновления флуоресценции. Для того чтобы исключить фузогенное свойство, специфичное в отношении ионизируемого липида DLinDMA, потенциально являющегося движущей силой смешивания липидов, получали iLNP, в которых DLinDMA заменяли ионизируемым липидом DODAP. Смешивание липидов наблюдали при добавлении этих DODAP-iLNP к ме-

ченным R18 экзосомам (фиг. 7). Кроме того, выполняли аналогичные эксперименты при повышении содержания PEG-липидов в iLNP с 2,5 мол.% к 10 мол.% (фиг. 8) и варьировании температуры (фиг. 9).

Пример 6. Взаимодействие BMD и EDEM, исследуемое на отдельных частицах.

Затем исследование фокусировалось на взаимодействии между экзосомами и iLNP на уровне отдельных частиц. Временные рамки появления частиц, которые содержали смесь экзосомального белка и липосомальных мембран, количественно определяли на установке для флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCCS). В препарате для измерений FCCS мембраны iLNP метили липофильным соединением Bodipy<sup>TM</sup> (630/650), тогда как экзосомальные поверхностные белки метили посредством конъюгирования со сложным эфиром NHS Bodipy<sup>TM</sup> (493/502). Как экзосомы, так и iLNP затем смешивали в буфере для слияния при сравнимых количествах частиц и регистрировали появление коррелирующих колебаний интенсивности по обоим каналам. Синхронизированные сигналы на обоих детекторах представляют либо агрегированные, либо слитые экзосомы и iLNP, тогда как отдельные частицы генерировали независимые во времени сигналы, на фиг. 10 показано повышение со временем степени взаимной корреляции (9) при смешивании экзосомы-Bodipy<sup>TM</sup> (493) и iLNP-Bodipy<sup>TM</sup> (630). Наблюдали отсутствие корреляции между зеленым и красным каналами непосредственно после смешивания двух частиц. За период времени 8 мин степень взаимной корреляции у отдельных частиц повышалась с 0 до примерно 70%, это означало, что около 70% от общего количества флуоресцентных вспышек меченных зондом частиц проявляли экзосомальные поверхностные белки и липосомальные мембраны.

Минимальную выявляемую степень взаимной корреляции определяли с использованием контрольной смеси из двух гидрофильных красителей (488 и 633). В качестве положительных контролей использовали меченные двумя метками комплементарные нити ДНК (488/633) IBA (IBA GmbH) для получения максимальной достижимой степени взаимной корреляции.

Пример 7. Слияние фузогенных EDEM и BDM с образованием гибридосом.

Для исключения возможности простой агрегации, нарушения структуры или ложно-положительных результатов в анализах слияния, обусловленных обменом липидов, средний размер и распределение по размеру в смеси iLNP/экзосом без нагрузки в буфере с pH 5,5 регистрировали в разные моменты времени с использованием DLS и NTA. Такие же экспериментальные условия использовали для отслеживания среднего значения размера в течение периода 10 ч. Как показано на фиг. 11, в течение первого часа смешивания средний размер частиц быстро возрастал и оставался практически без изменений в течение следующих 9 ч. В случае агрегации противоположно заряженные везикулы были способны непрерывно агрегировать в структурированные под действием электростатических сил образования, при этом в данном случае дело обстоит не так. Дополнительным индикатором исключения агрегации является степень увеличения диаметра. Объем двух слитых сфер масштабно увеличивался с радиусом таким образом  $V \propto r^3$ , что в результате слияние 85 и 130 нм сфер приводило к 141 нм частице. С другой стороны, при агрегации радиус увеличивался линейно с каждой дополнительной сферой, присоединяемой к агрегату. Это будет подтверждаться большим увеличением диаметра в диапазоне величин, кратных диаметру субъединицы. Это дополнительно подкрепляется тем, что, как показано на фиг. 12, смесь siRNA-iLNP и MCL-exos в буфере для слияния (хранится при комнатной температуре) не проявляла значительного повышения среднего диаметра в течение периода 9 дней.

Для исключения того, что изменение среднего размера или гауссова распределения по размеру, выявляемые с помощью DLS, не являются артефактом усредненных субпопуляций, оценивали распределение по размеру у экзосом, iLNP и продуктов слияния на основании измерений отдельных частиц с помощью NTA. Перед анализом iLNP и экзосомы разводили в буфере для слияния (20000-кратно для iLNP и 0,01 мг экзосомального белка на 1 мл). Для реакции слияния экзосомы и iLNP инкубировали в соотношении 1:1 и каждые 2 мин производили запись данных от образца, взятого из реакционной смеси. За измерение записывали кинофрагмент из 1800 кадров. Данные анализировали с использованием пакета аналитического программного обеспечения NTA Analytical Software suite версии 3.0 с автонастройками нерезкости, минимальной длины трека и минимального ожидаемого размера частицы.

Мониторинг распределения по размеру в реакциях слияния в динамике (фиг. 13) показал, что после 3 мин смешивания 50-90 нм популяция iLNP значительно уменьшалась, а субпопуляция с 90-125 нм увеличивалась. В течение временного промежутка 18 мин распределение по размеру проявляло пик при размере частиц 144,2 нм, и можно заключить, что повышение способности к слиянию у EDEM в присутствии BMD приводит к появлению частиц, которые проявляют определенное распределение по размеру. Эти отдельные профили распределения по размеру у экзосом, iLNP и новообразованных частиц изображены на фиг. 14. Популяцию новообразованных везикул назвали "гибридосомами".

Четко определенные распределения по размеру на фиг. 14 или длительная стабильность диаметра образованных везикул, представленные на фиг. 11 и 12, являются показателями уменьшенного суммарного поверхностного заряда после слияния. В результате последующие слияния затруднились, и система характеризуется петлей самопроизвольной обратной связи.

Пример 8. Опосредованный гибридосомой перенос гена приводит к экспрессии GFP.

Для демонстрации функциональности опосредованной гибридосомой доставки генетической на-

грузки гибриdosомы получали из экзосом клеток линии GBM и iLNP, инкапсулирующих плазмиду GFP. Экспрессию репортера GFP в клетках GBM, трансфицированных исследуемыми составами, анализировали с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Клетки (50000 клеток, посеянных днем ранее) трансфицировали iLNP (500 нг рDNA GFP на лунку) и загружали гибриdosомами (5 мкг общего белка/500 нг рDNA GFP на лунку). Гибриdosомы получали перед трансфекцией путем смешивания экзосом с рDNA-iLNP в буфере для слияния в течение 30 мин. Для исключения того, что трансфекция является результатом случайной интернализации iLNP вследствие индуцированного экзосомой эндоцитоза, клетки также подвергали совместной трансфекции с неслитыми iLNP (500 нг рDNA GFP на лунку) и экзосомами (5 мкг общего белка на лунку). После периода трансфекции, составлявшего 0,5, 1, 2 или 24 ч, клетки дважды промывали PBS, добавляли свежую среду и клетки культивировали в течение 72 ч. Число клеток, экспрессирующих GFP, анализировали с помощью проточной цитометрии (см. фиг. 15). Гибриdosомы показывали более высокие уровни трансфекции по сравнению с рDNA-iLNP или неслитыми рDNA-iLNP, которые подвергали совместной трансфекции с экзосомой.

Пример 9. Очистка гибриdosом.

Чтобы исключить помехи от неслитых iLNP в экспериментах с трансфекцией, их отделяли от гибриdosом посредством центрифугирования в непрерывном градиенте плотности сахарозы. Для определения плотности рDNA-iLNP их центрифугировали на непрерывных 0-55% (вес./об.) градиентах плотности сахарозы (190000 г, 14 ч) и колонку подвергали фракционированию. Плотность фракций сахарозы определяли с помощью рефрактометра, а наличие частиц анализировали по подсчету фотонов в DLS. Данные показали максимальную плотность 1,05 г/мл для рDNA-iLNP (см. фиг. 16).

Центрифугирование смесей для слияния рDNA-iLNP/экзосом (весовое соотношение белка и плазмиды 1:0,1) на соответствующем градиенте сахарозы давало отчетливую опалесцирующую полосу, содержащую неслитые iLNP сверху градиента. Фракции сахарозы, которые соответствовали частицам с плотностями 1,06-1,08, 1,09-1,18 и 1,19-1,25 г/мл, объединяли и сахарозу удаляли посредством диализа против PBS.

Способность этих фракций к трансфекции GFP отслеживали путем инкубирования с клетками (72 ч, 50000 клеток/лунка) и анализа числа клеток, экспрессирующих GFP, с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 17 и 16, все фракции приводили в результате к экспрессии GFP.

рDNA-гибриdosомы (частицы с плотностью ниже 1,05 г/мл) собирали, сахарозу удаляли путем диализа и их повторно исследовали в независимых исследованиях трансфекции. Клетки (50000 клеток) трансфицировали рDNA-гибриdosомами (2,5 мкг белка/лунку на основе анализа ВСА объединенной фракции) в течение 0,5, 1, 2 или 24 ч. По прошествии указанных периодов времени трансфекции клетки дважды промывали PBS и добавляли свежую культуральную среду. Число клеток, экспрессирующих GFP, после культивирования в течение 72 ч анализировали с помощью проточной цитометрии (см. фиг. 18).

Пример 10. Экзогенные нацеливающие фрагменты на гибриdosомах.

Вышеприведенные iLNP с модифицированной IgG поверхностью использовали для получения гибриdosом с фрагментами IgG на поверхности. Аналогично обогащению загруженными плазмидой гибриdosомами в примере 9, IgG, прикрепленные к iLNP, смешивали с полученными из GBM экзосомами в буфере для слияния в течение 30 мин (весовое соотношение липида и экзосомального белка составляет 6:1) и неслитые iLNP отделяли в градиенте сахарозы. Слой частиц был видимым при плотности 1,12-1,14 г/мл ( $R_f=0,62$  по сравнению с  $R_f=0,36$  для загруженных плазмидой гибриdosом). Фракции с плотностью ниже 1,08 г/мл объединяли и остаточную сахарозу удаляли посредством диализа против PBS. Гель-электрофорез (SDS-PAGE) в невозстанавливающих условиях с использованием 10% акриламида проводили для подтверждения присутствия как IgG, так и экзосомального белка.

Клеточную линию GBM (50000 клеток/лунку, посеянных днем ранее) трансфицировали очищенными в градиенте сахарозы IgG гибриdosомами (содержание белка 1,4 мкг/лунку, как определено с помощью анализа ВСА).

После 24 ч инкубирования клетки промывали, и, как показано на фиг. 19, проточная цитометрия определяла приблизительно 80% клеток, положительных в отношении меченного вторичного антитела к IgG.

Пример 11. Разные EDEM для разнообразных гибриdosом.

Возможность получения отличающихся гибриdosом посредством варьирования нагрузки EDEM или модификации его поверхности определяли с помощью двух типов анализов слияния.

Анализ с R18 проводили, как изложено в примере 5. Вкратце, слияние определяли путем смешивания разных видов iLNP, приведенных в примере 1, с мечеными R18 экзосомами, полученными из клеток линии GBM в буфере для слияния. Слияния с iLNP, инкапсулирующими олигонуклеотиды, белок и наночастицы золота (наночастицы золота сами по себе или инкапсулированные совместно с рDNA), показаны на фиг. 20-22. Слияние между экзосомами и iLNP с модификацией поверхности пептидом и IgG показано на фиг. 23.

Анализ с пиреном использовали для определения слияния MCL-экзосом с загруженными siRNA iLNP. Эти siRNA-iLNP получали путем экструзии или с помощью микропоточкового чипа для быстрого

смешивания (как изложено в примере 1).

Этот анализ основывается на повышении флуоресценции мономера (при длине волны примерно 400 нм) вследствие разбавления пиреновых эксимеров при слиянии меченных мембран с немеченными мембранами. Экзосомы (35 мкг общего белка) в 100 мкл PBS метили 1 мкл 2,5 мМ этанольного раствора 1-пирендодекановой кислоты (Life Technologies) в течение 30 мин. при 37°C. Избыток 1-пирендодекановой кислоты удаляли с помощью двукратного осаждения и промывания MES буфером (0,2 М MES, 150 мМ NaCl, pH 5,5) посредством ультрацентрифугирования при 100000 g в течение 60 мин. После удаления несвязанного пирена меченные экзосомы (10 мкг общего белка/лунка) суспендировали в MES буфере (0,2 М MES 150 мМ NaCl, pH 5,5) в 96-луночной планшете. Повышение флуоресценции мономера после добавления немеченных iLNP (5 мкг общих липидов) регистрировали при 37°C с использованием Synergy HT Microplate Reader (Biotek). Как показано на фиг. 24, повышение сигнала от мономера происходит, как только экзосомы смешиваются с iLNP, полученными посредством экструзии (ext) и с использованием микропотокового чипа (mf).

Пример 12.

Внеклеточные везикулы в качестве биологически совместимых модулей для доставки для разнообразных гибридов.

Слияние между микровезикулами, секретируемыми различными типами клеток, и разными iLNP определяли с помощью анализа слияния с использованием R18.

Как показано в примере 2, микровезикулы человека выделяли из тромбоцитов (PLT-MV) и полиморфноядерных нейтрофилов (PMN-MV).

Аналогично примеру 5 образцы микровезикул (0,25 мкг общего белка в PLT-MV и 1,2 мкг общего белка в PMN-MV) метили этанольным раствором R18 с последующим удалением несвязанного красителя. Повышение флуоресценции отслеживали после добавления разных видов iLNP.

Как показано на фиг. 25, смешивание iLNP с PMN-MV в буфере для слияния приводило в результате к возобновлению флуоресценции R18. pH-зависимое взаимодействие iLNP с PMN-MV определяли, если добавление iLNP при pH 7,4 приводило к отсутствию возобновления флуоресценции. Смешивание с pDNA-iLNP и BSA-iLNP приводило в результате к возобновлению флуоресценции R18.

Как показано на фиг. 26, смешивание PLT-MV и пустых iLNP является pH-зависимым и подобно таковому для пустых iLNP и экзосом. PMN- и PLT-MV представляют особый интерес в качестве BDM вследствие их противовоспалительных и иммунодепрессивных свойств. Было показано, что PMN-MV могут ингибировать высвобождение цитокинов (фактора некроза опухолей  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, интерлейкина 8, интерлейкина 10 и интерлейкина 12p70) и снижать активность активирующей иммунную систему рецепторов (CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-DP, HA-DQ и HA-DR) в полученных из моноцитов дендритных клетках человека (Sadallah, Eken, & Schifferli, 2011).

Пример 13. Клеточное поглощение гибридов в труднотрансфицируемых клетках.

Флуоресцентную микроскопию использовали для определения клеточного поглощения гибридов труднотрансфицируемой лимфоцитарной клеточной линией (Jekol). Гибриды получали из MCL-ехо и меченных NBD iLNP (состав iLNP DlinDMA:Chol:DSPC:PEG-S-DMG:NBD-PC 40:40:17,5:2:0,5). MCL-Ехо (2 мкг общего белка на лунку) смешивали с мечеными NBD iLNP (1 мкг общих липидов на лунку) в реакционном буфере (10 мМ MES, pH 6,0, 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl) и инкубировали на шейкере в течение 30 мин. при 37°C.

Гибридами и iLNP трансфицировали клетки-мишени в течение 1 ч, а затем дважды промывали PBS для удаления связанных с поверхностью и неинтернализированных везикул. Клетки затем ресуспендировали в PBS и флуоресцентные изображения получали при идентичных настройках инструмента. Среднюю интенсивность флуоресценции красителя в мембране iLNP на клетку определяли с помощью анализа изображения на находящемся в свободном доступе программном обеспечении ImageJ. Как показано на фиг. 27, клетки Jekol (n=160) проявляли почти в 7 раз более высокую среднюю интенсивность флуоресценции красителя в мембране iLNP спустя 1 ч трансфекции гибридами, чем при трансфекции iLNP самими по себе.

### Библиография

- Bao, G., Mitragotri, S., & Tong, S. (2013). Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15, 253-82. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071812-15240.
- Belliveau, N.M, Huft, J., Lin, P.J., Chen, S., Leung, A.K., Leaver, T.J., ..., Cullis, P.R. (2012). Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 7(May), e37. doi: 10.1038/mtna.2012.28.
- Eken, C., Sadallah, S., Martin, P.J., Treves, S., & Schifferli, J.A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218(3), 382-92. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.021.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., & Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 347-57. doi: 10.1038/nrd3978.
- Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., & Fernig, D.G. (2007). Determination of size and concentration of

gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215-21. doi: 10.1021/ac0702084.

Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., & MacLachlan, I. (2005). Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107(2), 276-87. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.06.014.

Marcus, M.E., & Leonard, J.N. (2013). FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals*, 6(5), 659-680. doi: 10.3390/ph6050659.

Maurer, N., Wong, K.F., Stark, H., Louie, L., McIntosh, D., Wong, T., ..., Cullis, P.R. (2001). Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. *Biophysical Journal*, 80(5), 2310-26. doi:10.1016/S0006-3495(01)76202-9.

Sadallah, S., Eken, C., Martin, P.J., & Schifferli, J.A. (2011). Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *Journal of Immunology*, 186(11), 6543-52. doi: 10.4049/jimmunol.1002788.

Sadallah, S., Eken, C., & Schifferli, J.A. (2011). Ectosomes as immunomodulators. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), 487-95. doi:10.1007/s00281-010-0232-x.

Sample, S.C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A.P., Mui, B.L., Cho, C.K., ..., Hope, M.J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*, 28(2), 172-6. doi:10.1038/nbt.1602.

Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 3, Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(1), 940-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гибридного биологически совместимого носителя (гибридосомы), при этом указанный способ включает:

(а) обеспечение первой везикулы, содержащей мембрану и одно или более терапевтических и/или диагностических средств, инкапсулированных в указанной первой везикуле, при этом указанная первая везикула была получена *in vitro*, при этом указанная первая везикула выбрана из группы, включающей наночастицы на основе липидов (LNP), липосомы, стабилизированные полимером LNP, церасомы, сфингосомы, ниосомы, полимеросомы, стабилизированные синтетическими наночастицами LNP, гибридные наночастицы по типу ядро-оболочка на основе липида-полимера, природные полученные из мембраны LNP и природные покрытые мембраной LNP, и при этом указанная первая везикула содержит по меньшей мере один фузогенный фрагмент, который обеспечивает возможность или усиливает разрушение мембраны или смешивание липидов между мембраной и липидным бислоем, при этом по меньшей мере один фузогенный фрагмент является ионизируемым катионным липидом, содержащим по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу так, что липид становится положительно заряженным при pH около или ниже физиологического pH и нейтральным при pH около или выше физиологического pH;

(б) обеспечение второй везикулы, содержащей липидный бислой, которая продуцируется *in vivo* и высвобождается во внеклеточную среду; и

(с) приведение в контакт указанной первой везикулы с указанной второй везикулой при pH ниже 7,4 и при температуре от 0 до 60°C, тем самым объединяя указанную первую везикулу с указанной второй везикулой и получая указанную гибридосому.

2. Способ по п.1, где приведение в контакт осуществляют в буфере, характеризующемся pH от 4 до 6.

3. Способ по п.1, где приведение в контакт осуществляют при температуре реакционной смеси 37°C.

4. Способ по п.1, где ионизируемый катионный липид выбран из группы, включающей 1,2-дидолилеил-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дидолилеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA), гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA), 1,2-диолеил-3-диметиламмонийпропан (DODAP), N-(4-карбоксибензил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеоилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), YSK05, 4-(((2,3-бис-(олеоилокси)пропил)-(метил)амино)метил)бензойную кислоту (DOBAT), N-(4-карбоксибензил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеоилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), 3-(((2,3-бис-(олеоилокси)пропил)-(метил)амино)пропановую кислоту (DOPAT), N-(2-карбоксипропил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеоилокси)пропан-1-аминий (DOMPAQ), N-(карбоксиметил)-N,N-диметил-2,3-бис-(олеоилокси)пропан-1-аминий (DOAAQ) и Alny-100, 3-(диметиламино)пропил(12Z,15Z)-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-генэйкоза-12,15-диеноат (DMAP-BLP).

5. Способ по п.1, где указанная первая везикула содержит нацеливающий фрагмент, где нацеливающий фрагмент выбран из группы, включающей антитела, белки, аптамеры, олигонуклеотиды и полисахариды.

6. Способ по п.1, где указанная первая везикула содержит модифицированный PEG-липид, в частности, выбранный из группы, включающей

PEG-фосфолипид, модифицированный PEG-фосфатидилэтаноламин (PEG-PE),

модифицированные PEG-церамиды, модифицированные PEG диалкиламины,

модифицированные PEG-диацилглицеролы, полиэтиленгликольдипальмитоилглицерол (PEG-DPG),

модифицированные PEG-диалкилглицеролы,

(метоксиполиэтиленгликоль)димиристоксилглицерол (PEG-s-DMG),

PEG-диалкилоксипропил (DAA),

R-3-[(ω-метоксиполи(этиленгликоль)-2000)карбамоил]-1,2-димиристолоксипропил-3-амин (PEG-c-DMG) и

N-ацетилгалактозамин-((R)-2,3-бис-(октадецилокси)пропил-1-(метоксиполи(этиленгликоль)-2000)пропилкарбамат) (GalNAc-PEG-DSG).

7. Способ по п.1, где указанная вторая везикула получена из:

(a) опухолевой клетки ракового пациента или пациента с предраковым состоянием или из линии опухолевых или раковых клеток;

(b) клеток глиобластомы или клетки лимфомы из клеток мантийной зоны;

(c) патогена, выбранного из группы, включающей клетку, выбранную из группы, включающей В-клетки, антигенпрезентирующие клетки, лимфоциты, тромбоциты, нейтрофилы, активированные полиморфноядерные нейтрофилы и лейкоциты;

(d) бактериального патогена, амёбного патогена, паразитарного патогена или грибкового патогена или

(e) инфицированной патогеном клетки.

8. Способ по п.1, где указанная вторая везикула выбрана из группы, включающей экзосому, микро-везикулу или апоптозное тельце, мембранные частицы, мембранные везикулы, экзосомообразные везикулы, экзосомообразные везикулы, эктосомы или экзовезикулы.

9. Способ по п.1, где указанные одно или более терапевтических средств выбраны из:

(a) лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли;

(b) терапевтического средства на основе антитела и/или

(c) пептида, белка и нуклеиновой кислоты.

10. Способ по п.1, где указанные одно или более терапевтических средств являются нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, включающей малую интерферирующую РНК (siRNA), бессмысловую РНК, микроРНК (miRNA), малую или короткую РНК, образующую шпильку (shRNA), направляющую РНК (gRNA), РНК со сгруппированными регулярно разделенными промежутками короткими палиндромными повторами (crRNA), транс-активирующую РНК со сгруппированными регулярно разделенными промежутками короткими палиндромными повторами (tracrRNA), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, плазмиды, бессмысловые нуклеиновые кислоты и рибозимы.

11. Способ по п.1, где указанная первая везикула содержит модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и/или мРНК, которая кодирует по меньшей мере один антиген.

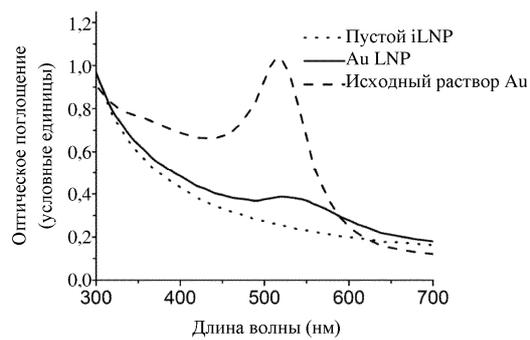
12. Способ по п.1, где указанная вторая везикула содержит ассоциированный с заболеванием антиген, выбранный из ассоциированного с опухолью антигена и ассоциированного с патогеном антигена.

13. Способ по п.1, где указанные одно или более диагностических средств выбраны из радиоактивного изотопа, выбранного из  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{130}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{88}\text{Y}$  и  $^{90}\text{Y}$ .

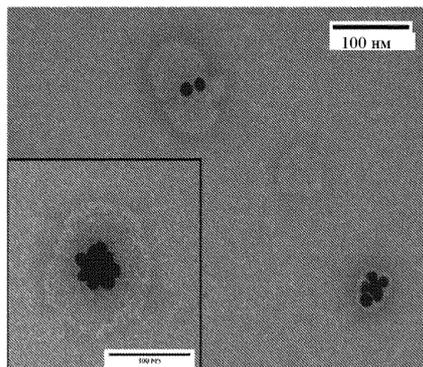
14. Способ по п.1, где указанные одно или более диагностических средств выбраны из квантовой точки и наночастицы металла, выбранной из наночастицы золота или серебра.

15. Гибридный биологически совместимый носитель, полученный при помощи способа по любому из предыдущих пунктов.

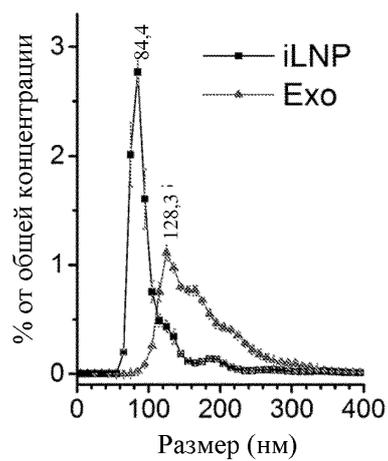
16. Способ доставки терапевтического или диагностического средства в клетку, включающий приведение в контакт указанной клетки с гибридомом по п.15.



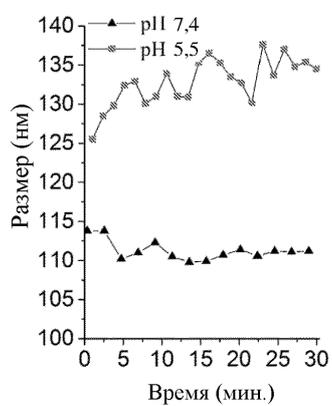
Фиг. 1



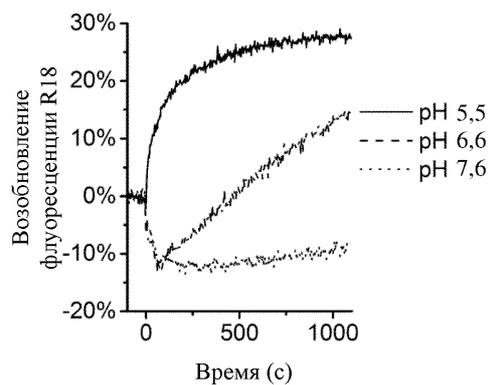
Фиг. 2



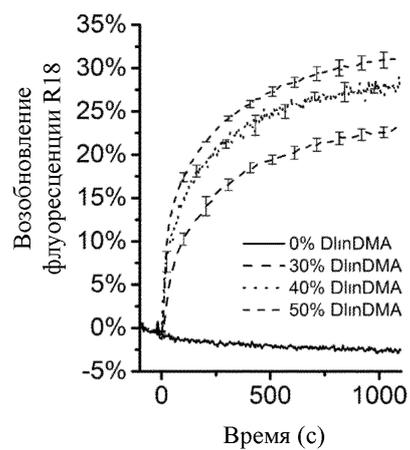
Фиг. 3



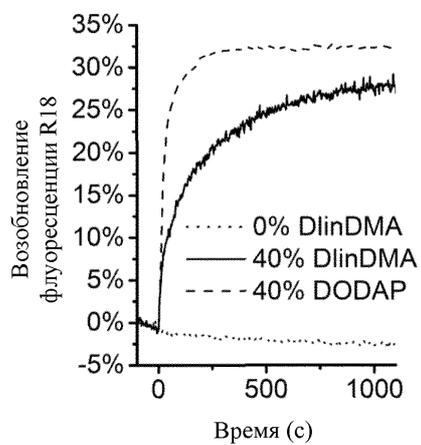
Фиг. 4



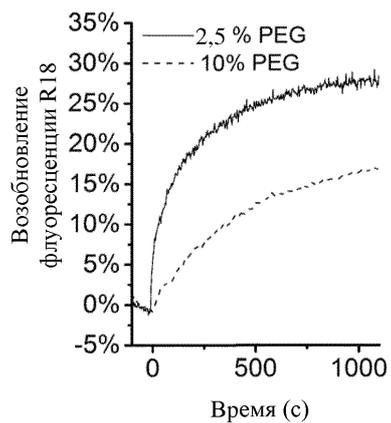
Фиг. 5



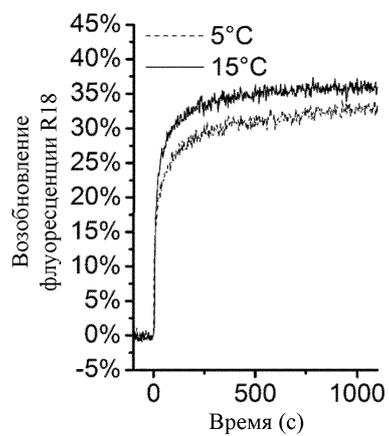
Фиг. 6



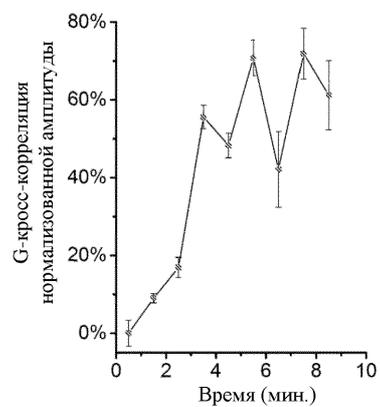
Фиг. 7



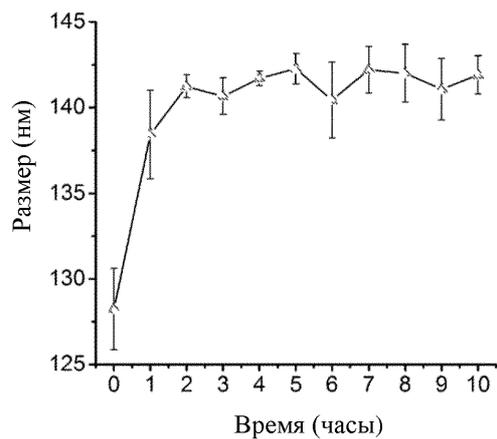
Фиг. 8



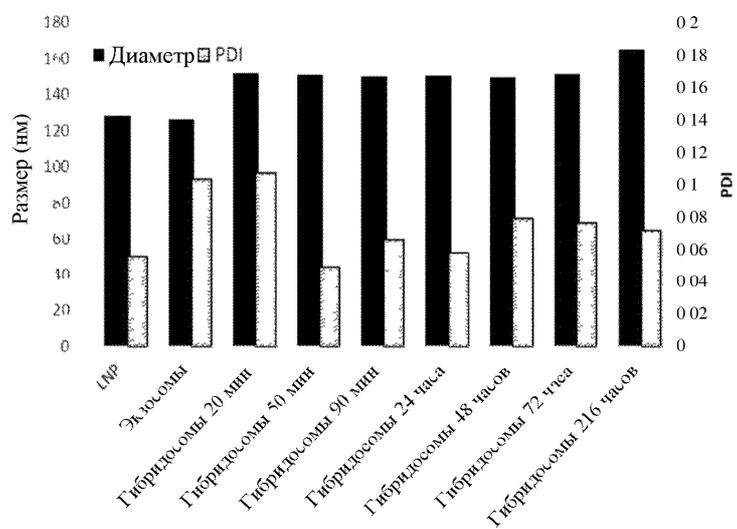
Фиг. 9



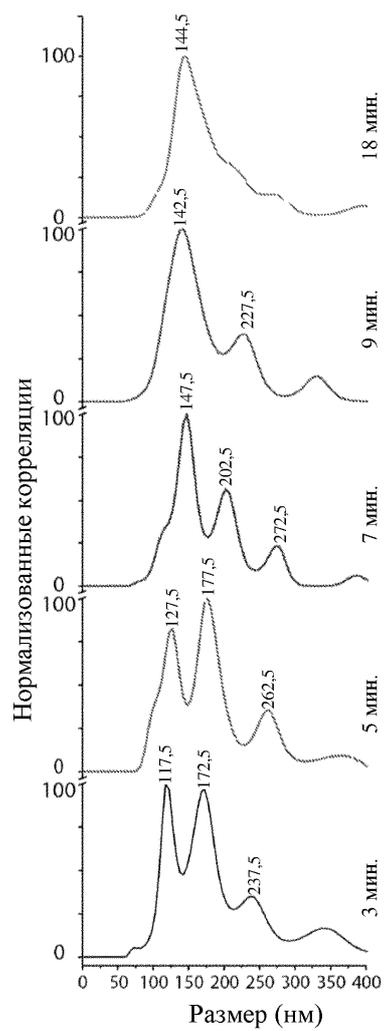
Фиг. 10



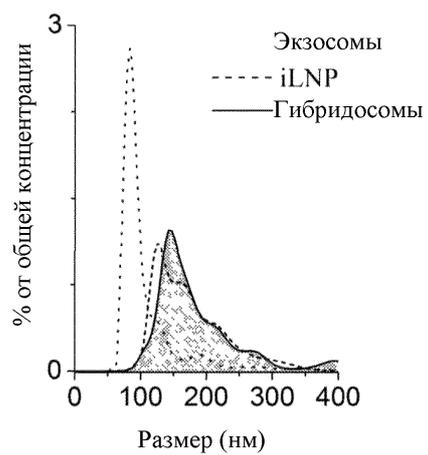
Фиг. 11



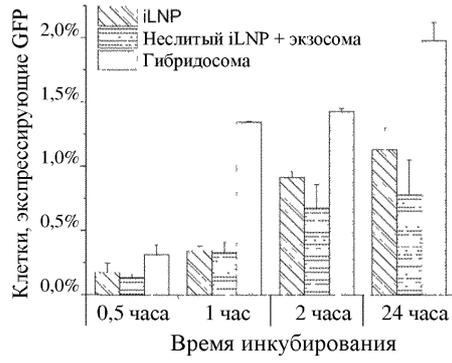
Фиг. 12



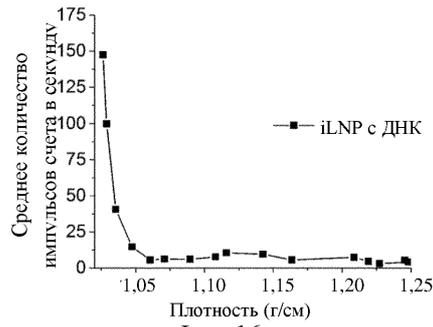
Фиг. 13



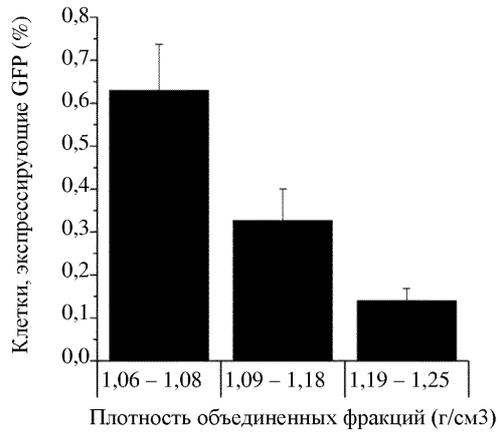
Фиг. 14



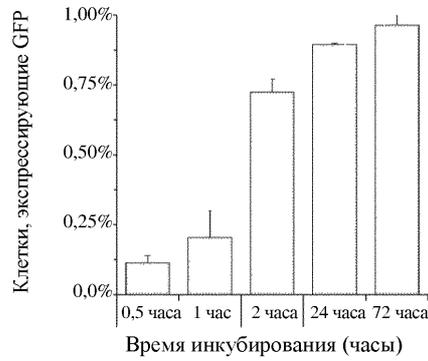
Фиг. 15



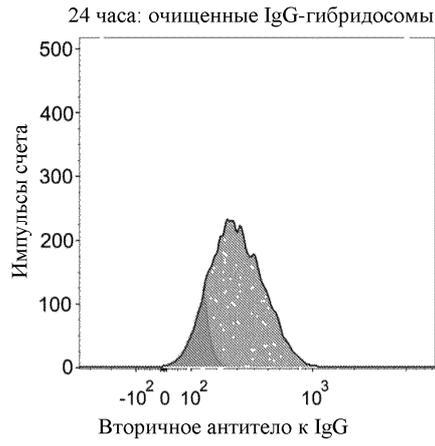
Фиг. 16



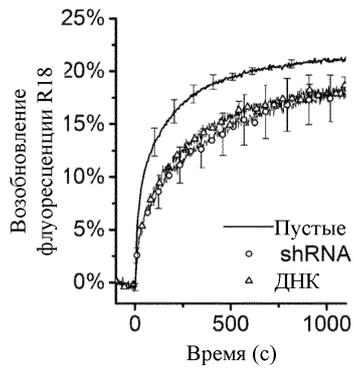
Фиг. 17



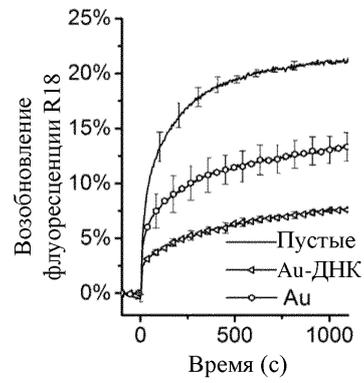
Фиг. 18



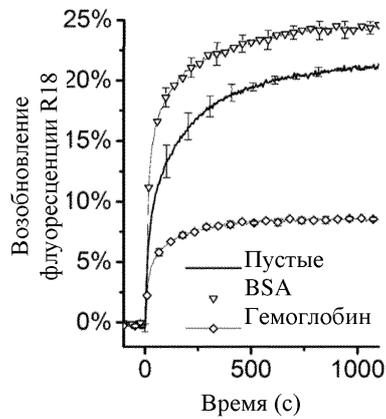
Фиг. 19



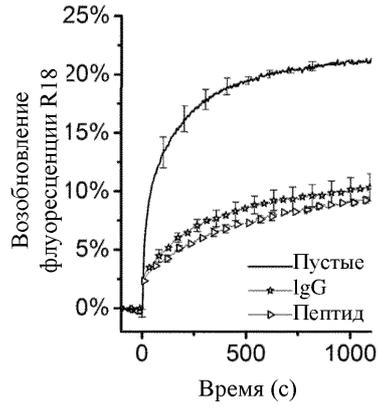
Фиг. 20



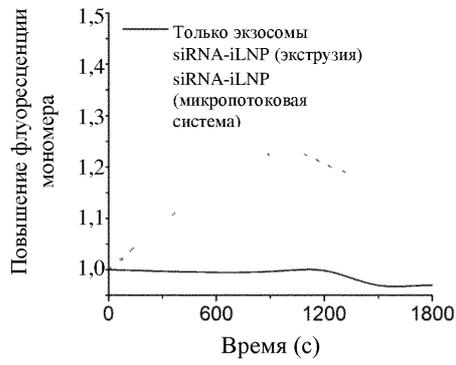
Фиг. 21



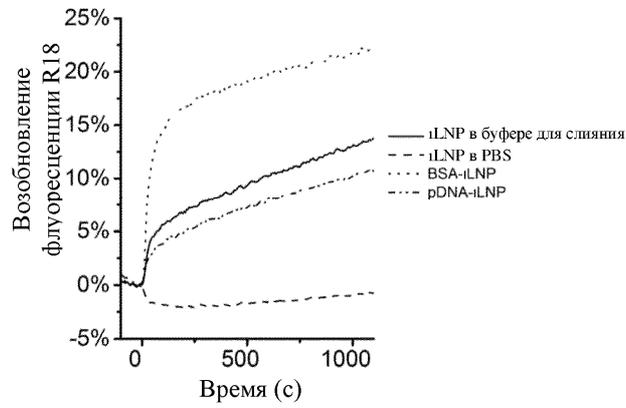
Фиг. 22



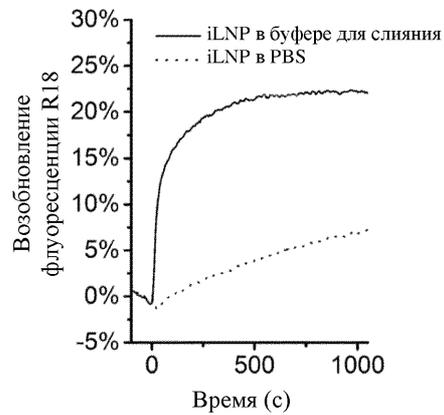
Фиг. 23



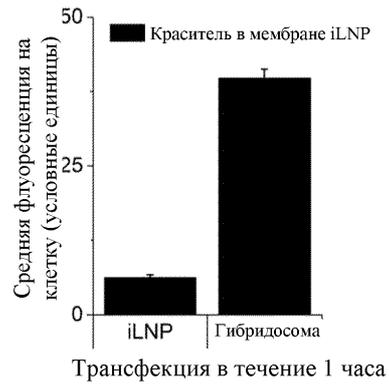
Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27