

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091486** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.08

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.12

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ**

(31) **62/629,563**

(32) **2018.02.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/017731**

(87) **WO 2019/157535 2019.08.15**

(71) Заявитель:
**КОДИАК БАЙОСАЙЕНСЕС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:

**Сатьянараянан Срирам, Уильямс
Дуглас Е., Бурзын Даля, Боутин
Адам Томас, Камеркар Сушрут (US)**

(74) Представитель:

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

(57) В настоящем документе раскрыты композиции и способы, включающие внеклеточные везикулы, содержащие нуклеиновую кислоту, нацеленную на гены, что приводит к поляризации опухолеассоциированных макрофагов. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы и композиции для увеличения поляризации макрофагов с целью лечения онкологического заболевания.

202091486
A1

202091486
A1

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к композициям и способам, включающим внеклеточные везикулы, несущие нуклеиновую кислоту, нацеленную на гены, что приводит к поляризации опухолеассоциированных макрофагов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Иммуноterapia представляет собой лечение заболевания путем индукции, усиления или подавления иммунного ответа. Иммуноterapia рака обычно имеет меньше побочных эффектов, чем традиционная терапия рака, такая как химиотерапия и лучевая терапия. В одном из подходов иммуноterapia рака использовали для стимуляции атаки раковых клеток собственными макрофагами пациента. Наблюдаются различные проявления фенотипов макрофагов, например, они могут стимулировать развитие рака или могут обладать противоопухолевой активностью. Фенотип M2 (или «альтернативно активированные макрофаги») обычно демонстрирует виды активности, стимулирующие развитие рака, такие как подавление иммунной системы, и генерирует активность ремоделирования внеклеточного матрикса и тканей. Фенотип M1 (или «классически активированные макрофаги») обычно демонстрирует противораковые виды активности, такие как фагоцитоз опухолевых клеток и стимуляция адаптивного иммунитета, обеспечивая возможность распознавания опухолевых клеток и атаки на них. Существует потребность в усовершенствовании способов и композиций для иммуномодуляции, способствующих поляризации макрофагов (то есть их превращению в фенотип M1).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Аспекты изобретения охватывают внеклеточную везикулу, содержащую один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1. В некоторых аспектах изобретение охватывает внеклеточную везикулу, представляющую собой экзосому, содержащую один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1.

[0004] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, например экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту, например ингибирующую РНК, например антисмысловую РНК, малую интерферирующую РНК (миРНК), малую шпилечную РНК (мшРНК), микроРНК, длинную некодирующую РНК (днкРНК), первичную микроРНК (перв-микроРНК) или предшественника микроРНК (пре-микроРНК) или, например, антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или, например, иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1–6.

[0005] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, например экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом иммуномодулирующие (компоненты), например нуклеиновая кислота, например ингибирующая РНК, например антисмысловая РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК, или, например, антисмысловый олигонуклеотид (ASO), или, например, иммуномодулирующий компонент, представляющий собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1–6, ингибируют по меньшей мере один ген-мишень макрофага, например, по меньшей мере один ген, выбранный из группы, состоящей из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы, СЕВР/β, Рi3Kγ и PKM2, например STAT3, STAT6, СЕВР/β, Рi3Kγ, KRAS и HIF1-альфа, например STAT3, например KRAS.

[0006] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, например экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на STAT3.

[0007] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, например экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на KRAS.

[0008] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, *например* экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибирующую РНК, *например* антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК, нацеленную на KRAS, *например* на человеческий KRAS дикого типа или на человеческий KRAS, а также мышинный KRAS^{G12D}.

[0009] В любом из вышеописанных аспектов внеклеточная везикула, *например* экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, *например* нуклеиновую кислоту, ингибирующую РНК, антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК, или пре-микроРНК, или ASO, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и при этом макрофаг представляет собой оседлый в опухоли макрофаг (*например*, в опухоли поджелудочной железы).

[0010] В любом из вышеописанных аспектов внеклеточная везикула, *например* экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, *например* нуклеиновую кислоту, ингибирующую РНК, антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК, или пре-микроРНК, или ASO, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и дополнительно содержит дополнительный иммуномодулирующий компонент, *например* низкомолекулярное лекарственное средство, антитело или его активный фрагмент, *например* ингибитор контрольной точки иммунного ответа, который связывается с CTLA-4, PD-1 или PD-L1, или ингибитор, который связывается с CSF1-R, или терапевтический белок, или его активный фрагмент.

[0011] В любом из вышеописанных аспектов внеклеточная везикула, *например* экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, *например* нуклеиновую кислоту, ингибирующую РНК, антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК, или пре-микроРНК, или ASO, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа М2 в фенотип М1, и дополнительно содержит дополнительный иммуномодулирующий компонент, *например* антитело или его активный фрагмент, *например* ингибитор контрольной точки иммунного ответа, который связывается с CTLA-4, PD-1 или PD-L1, или ингибитор, который связывается с CSF1-R, причем антитело или его активный фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR), по меньшей мере на 95% идентичные CDR ипилимумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR ниволумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR цемиплимаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR пембролизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR атезолизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR авелумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR дурвалумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR пексидартиниба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR PLX7486, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR ARRY-382, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR JNJ-40346527, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR BLZ945, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR эмактзумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR AMG820, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR IMC-CS4, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR кабирализумаба, или при этом антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактзумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба, или при этом антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, которое конкурирует за связывание с антителом, выбранным из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактзумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба.

[0012] В любом из вышеописанных аспектов, в котором внеклеточная везикула, *например* экзосома, содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, *например* нуклеиновую кислоту, ингибирующую РНК, антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК, или пре-микроРНК, или ASO, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа М2 в фенотип М1, и дополнительно содержит дополнительный иммуномодулирующий компонент, *например* антитело или его активный фрагмент, *например* ингибитор контрольной точки иммунного ответа, который связывается с CTLA-4, PD-1 или PD-L1, или ингибитор, который связывается с CSF1-R, причем антитело или его активный фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR), по меньшей мере на 95% идентичные CDR ипилимумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR ниволумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR цемиплимаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR пембролизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR атезолизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR авелумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR дурвалумаба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR пексидартиниба, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR PLX7486, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR ARRY-382, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR JNJ-40346527, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR BLZ945, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR эмактзумаба, или по меньшей мере на 95%

мере на 95% идентичные CDR AMG820, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR IMC-CS4, или по меньшей мере на 95% идентичные CDR кабирализумаба, или при этом антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба, или при этом антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, которое конкурирует за связывание с антителом, выбранным из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба, она дополнительно содержит PTGFRN или его фрагмент, и при этом антитело или его фрагмент может быть необязательно слито с PTGFRN или его фрагментом.

[0013] В любом из вышеописанных аспектов сравнение проводят с использованием анализа, выбранного из группы, состоящей из анализа поглощения внеклеточной везикулы, анализа экспрессии гена-мишени, анализа экспрессии нижестоящего гена, анализа высвобождения цитокинов и анализа белка клеточной поверхности макрофага.

[0014] В любом из вышеописанных аспектов макрофаг M2 представляет собой опухолеассоциированный макрофаг, выбранный из группы, состоящей из макрофагов типа M2a, M2b и M2c.

[0015] В любом из вышеописанных аспектов макрофаг M1 демонстрирует повышенную секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 и CXCL11, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации, и/или демонстрирует сниженную секрецию иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-10, TGF β , PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации, и/или демонстрирует повышенную экспрессию опухолеассоциированного антигена по сравнению с макрофагом M2 до поляризации, и/или усиливает стимуляцию Т-клеток CD8⁺ и/или естественных клеток-киллеров по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.

[0016] В аспектах изобретение охватывает фармацевтическую композицию, которая содержит внеклеточную везикулу, *например* экзосому, содержащую один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1.

[0017] В некоторых аспектах изобретение охватывает способ лечения заболевания (*например*, онкологического заболевания, *например*, рака поджелудочной железы) у пациента (*например*, человека), нуждающегося в этом, включающий введение внеклеточной везикулы (*например*, путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного, внутрибрюшинного и внутриопухолевого введения) по любому из описанных выше аспектов, *например*, экзосомы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов (*например*, ингибирующую РНК, нацеленную на протоонкоген (*например*, KRAS)), которая при контакте с макрофагом избирательно реполяризует макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по любому из описанных выше аспектов, или включающий введение фармацевтической композиции, содержащей внеклеточную везикулу по любому из описанных выше аспектов, *например* экзосому, которая содержит один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по любому из описанных выше аспектов.

[0018] В некоторых аспектах изобретение охватывает описанные выше способы лечения и дополнительно включает применение второго вида терапии, *например* хирургического лечения, химиотерапии, лучевой терапии, криотерапии, гормональной терапии или иммунотерапии.

[0019] В некоторых аспектах изобретение охватывает способы модулирования экспрессии генов в макрофаге, включающие контактирование макрофага с внеклеточной везикулой, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, которые ингибируют по меньшей мере один ген, и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по сравнению с контактированием макрофага с эквимоллярным (-и) количеством (-ами) только иммуномодулирующих компонентов.

[0020] В некоторых аспектах способы модулирования экспрессии генов в макрофаге включают контактирование макрофага *ex vivo* или *in vitro* с внеклеточной везикулой, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, которые ингибируют по меньшей мере один ген, и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по сравнению с контактированием макрофага с эквимоллярным (-и) количеством (-ами) только иммуномодулирующих компонентов.

[0021]

[0022] В некоторых аспектах способы модулирования экспрессии генов в макрофаге включают контактирование макрофага *in vivo* с внеклеточной везикулой (*например*, посредством введения внеклеточной везикулы субъекту, *например*, субъекту-человеку, *например*, путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного, внутривнутрибрюшинного и внутривнутрипухолового введения), содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, которые ингибируют по меньшей мере один ген, и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по сравнению с контактированием макрофага с эквимоллярным (-и) количеством (-ами) только иммуномодулирующих компонентов.

[0023] В некоторых аспектах субъект в раскрытых выше способах модулирования экспрессии генов в макрофаге страдает заболеванием, выбранным из онкологического заболевания (*например*, рака поджелудочной железы) и фиброза.

[0024] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, используемая в любом из раскрытых выше способов модулирования экспрессии генов в макрофаге, представляет собой экзосому, а иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту, *например*, ингибирующую РНК, такую как, *например*, антисмысловая РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК.

[0025] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, используемая в любом из раскрытых выше способов модулирования экспрессии генов в макрофаге, представляет собой экзосому, а иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту, *например* ASO.

[0026] В некоторых аспектах внеклеточная везикула, используемая в любом из раскрытых выше способов модулирования экспрессии генов в макрофаге, представляет собой экзосому, а иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту, *например* антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1–6, или антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1–6, и при этом по меньшей мере один ген выбран из группы, состоящей из KRAS, HRAS, NRAS,

HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы, СЕВР/β, РiЗКγ и РКМ2, или из группы, состоящей из: STAT3, STAT6, СЕВР/β, РiЗКγ, KRAS и HIF1-альфа, или представляет собой STAT3, или представляет собой KRAS и, если это KRAS, то иммуномодулирующий компонент может необязательно представлять собой ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа.

[0027] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения рака поджелудочной железы у субъекта, включающий: введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа; при этом лечение увеличивает процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов с превращением фенотипа М2 в фенотип М1 до большего уровня, чем наблюдаемый у пациента, которого лечат с применением ингибирующей РНК, нацеленной на человеческий KRAS^{G12D}.

[0028] В некоторых аспектах в изобретении предложен описанный выше способ лечения рака поджелудочной железы у субъекта, в котором процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов определяют с помощью анализа *ex-vivo* оседлых в опухоли макрофагов, полученных из образца опухоли.

[0029] В данном документе предложены композиции и способы, включающие внеклеточные везикулы, выбранные, обогащенные или сконструированные с одним или более иммуномодулирующих компонентов, которые могут модифицировать активность макрофагов, стимулируя переключение фенотипа макрофагов с М2 на фенотип М1 (поляризация макрофагов) и укрепляя иммунную систему пациента для борьбы с онкологическим заболеванием.

[0030] Соответственно, в первом аспекте в данном документе предложена внеклеточная везикула, содержащая один или более иммуномодулирующих компонентов, например, молекулы нуклеиновых кислот, которые ингибируют по меньшей мере один ген в клетке-мишени. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой макрофаг, и ингибирование гена увеличивает поляризацию макрофагов с превращением фенотипа М2 в фенотип М1 по сравнению с эквивалентным количеством только иммуномодулирующего (-их) компонента (-ов). В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК. В определенных вариантах осуществления ингибирующая РНК представляет собой антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один ген выбран из группы, состоящей из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы, СЕВР/β, РiЗКγ и РКМ2. В определенных вариантах осуществления ген представляет собой KRAS. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа. В определенных вариантах осуществления ингибирующая РНК также нацелена на мышинный Kras^{G12D}. В определенных вариантах осуществления макрофаг является оседлым в опухоли макрофагом. В определенных вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит дополнительный иммуномодулирующий компонент. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, антитело или терапевтический белок. В определенных вариантах осуществления антитело является

ингибитором контрольной точки иммунного ответа. В определенных аспектах в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из вышеупомянутых внеклеточных везикул.

[0031] В определенных аспектах в настоящем документе описан способ лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту внеклеточных везикул или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, тем самым осуществляя лечение заболевания у пациента. В определенных вариантах осуществления заболевание является онкологическим заболеванием. В определенных вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой состояние фиброза. В некоторых вариантах осуществления состояние фиброза представляет собой фиброз легких, фиброз печени или фиброз поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления фиброз печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит или НАСГ. В определенных вариантах осуществления пациент является человеком. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на протоонкоген. В определенных вариантах осуществления протоонкоген представляет собой человеческий KRAS. В определенных вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления способы дополнительно включают проведение по меньшей мере второго вида терапии. В определенных вариантах осуществления второй вид терапии включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию.

[0032] В определенных вариантах осуществления клетка-мишень макрофаг M2 представляет собой опухолеассоциированный макрофаг, выбранный из группы, состоящей из макрофагов типа M2a, M2b и M2c. В определенных вариантах осуществления макрофаг M1 демонстрирует повышенную секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 и CXCL11, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации. В определенных вариантах осуществления макрофаг M1 демонстрирует сниженную секрецию иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-10, TGF β , PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации. В определенных вариантах осуществления макрофаг M1 демонстрирует повышенную экспрессию опухолеассоциированного антигена по сравнению с макрофагом M2 до поляризации. В определенных вариантах осуществления макрофаг M1 усиливает стимуляцию Т-клеток CD8⁺ и/или естественных клеток-киллеров по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.

[0033] В определенных аспектах в настоящем документе описан способ лечения рака поджелудочной железы у субъекта, включающий введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа; при этом лечение увеличивает процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 до большего уровня, чем наблюдаемый у пациента, которого лечат с применением ингибирующей РНК, нацеленной на человеческий KRAS^{G12D}.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На **ФИГ. 1** показаны уровни экспрессии генов Stat 3, Stat 6, Cebp β -1, Pi3K γ , CEBP β -2 и Kras после трансфекции повышенными количествами миРНК, нацеленных на каждый из генов.

[0035] На **ФИГ. 2** показана экспрессия Arg1 после трансфекции повышенными количествами миРНК, нацеленных на Stat 3, Stat 6, Cebp β -1, Pi3K γ , CEBP β -2 и Kras, соответственно. В качестве контроля использовали макрофаги, трансфецированные скремблированной миРНК.

[0036] На **ФИГ. 3** показано поглощение экзосомы, определенное по общей интенсивности флуоресценции в клетке зеленого флуоресцентного белка (GFP) в шести субпопуляциях макрофагов (M0, M1, M2a, M2c, M2++ и TAM).

[0037] На **ФИГ. 4** показано поглощение макрофагами M2 или M0 свободных антисмысловых олигонуклеотидов (свободн.-ASO) и экзосом, нагруженных ASO (экзо-ASO), по результатам измерения общей интенсивности флуоресценции.

[0038] На **ФИГ. 5A** показано поглощение экзосомы макрофагами *in vivo* после внутрибрюшинной инъекции интактным мышам 1×10^{11} или 1×10^{12} экзосом, содержащих GFP. На **ФИГ. 5B** показано обновление нативной экзосомы и экзо-ASO опухолевыми клетками и макрофагами *in vivo* после инъекции одной дозы нативной немеченой экзосомы или меченого Cy5 экзо-ASO мышам, несущим опухоль B16F10.

[0039] На **ФИГ. 6** показана экспрессия Stat 3 в M2-поляризованных мышинных клетках RAW264.7 после инкубации с 5 мкМ свободного меченого холестерина ASO или с экзосомами, нагруженными меченым холестерином ASO, в количестве 1×10^5 или 1×10^6 . Было проведено исследование пяти меченных холестерином ASO, нацеленных на STAT3: ASO 4.1, двухцепочечной химической структуры MOE; ASO 5.1 и ASO 5.2, одноцепочечной химической структуры O-метила; ASO 5.3 и ASO 5.4, одноцепочечной химической структуры MOE. В качестве отрицательного контроля использовали необработанные поляризованные макрофаги и поляризованные макрофаги, инкубированные с немодифицированными экзосомами. В качестве положительного контроля использовали макрофаги, трансфецированные миРНК Stat 3.

[0040] На **ФИГ. 7** показан уровень транскрипта Arg1 в M2-поляризованных мышинных клетках RAW264.7 после инкубации с 5 мкМ свободного меченого холестерина ASO или с экзосомами, нагруженными меченым холестерином ASO, в количестве 1×10^5 или 1×10^6 . Было проведено исследование пяти меченных холестерином ASO, нацеленных на STAT3: ASO 4.1, двухцепочечной химической структуры MOE; ASO 5.1 и ASO 5.2, одноцепочечной химической структуры O-метила; ASO 5.3 и ASO 5.4, одноцепочечной химической структуры MOE. В качестве отрицательного контроля использовали необработанные поляризованные макрофаги и поляризованные макрофаги, инкубированные с немодифицированными экзосомами. В качестве положительного контроля использовали макрофаги, трансфецированные миРНК Stat 3.

[0041] На **ФИГ. 8A** показана экспрессия STAT3 в M2-поляризованных мышинных клетках RAW264.7 после инкубации с высокой дозой (4 мкМ) ASO или высокой (4 мкМ) и низкой (0,4 мкМ) дозами экзо-ASO для STAT3. На **ФИГ. 8B** показана экспрессия KRAS в M2-поляризованных мышинных клетках RAW264.7

после инкубации с высокой дозой (4 мкМ) ASO или экзо-ASO для KRAS. **На ФИГ. 8С** показана экспрессия C/EBP β в M2-поляризованных мышинных клетках RAW264.7 после инкубации с высокой (4 мкМ) и низкой (0,4 мкМ) дозами ASO или экзо-ASO для C/EBP β .

[0042] **На ФИГ. 9А** показан уровень транскрипта STAT3 в первичных макрофагах человека, полученных от трех отдельных доноров после обработки различными дозами STAT3 свободного ASO или STAT3 экзо-ASO. Представлены показатели IC50 для каждого вида обработки и кратность улучшения для экзо-ASO STAT3 по сравнению со свободным ASO STAT3. **На ФИГ. 9В** показан уровень CD163 в первичных макрофагах человека, полученных от трех отдельных доноров после обработки различными дозами свободного ASO STAT3 или экзо-ASO STAT3. Представлены показатели IC50 для каждой обработки и кратность улучшения для экзо-ASO STAT3 по сравнению со свободным ASO STAT3.

[0043] **На ФИГ. 10** показана экспрессия гена-мишени в макрофагах человека фенотипа M2 после обработки 4 мкМ свободного ASO или экзо-ASO для HIF1 α , Pi3K γ , CEBP β , STAT6 и STAT3 соответственно. В качестве контроля использовали необработанные макрофаги человека фенотипа M2 и макрофаги человека фенотипа M2, обработанные с использованием 4 мкМ скремблированного экзо-ASO.

[0044] **На ФИГ. 11** показана экспрессия CD163 в макрофагах человека фенотипа M2 после обработки 4 мкМ свободного ASO или экзо-ASO для HIF1 α , Pi3K γ , CEBP β , STAT6 и STAT3 соответственно. В качестве контроля использовали необработанные макрофаги человека фенотипа M2 и макрофаги человека фенотипа M2, обработанные с использованием 4 мкМ скремблированного экзо-ASO.

[0045] **На ФИГ. 12А** показана индукция IL-12 после обработки с использованием 4 мкМ свободного ASO STAT3, 4 мкМ экзо-ASO STAT3, 4 мкМ скремблированного экзо-ASO, нативных экзосом или C188-9, низкомолекулярного ингибитора STAT3, в присутствии или при отсутствии LPS. **На ФИГ. 12В** показана индукция IL-23 после обработки с использованием 4 мкМ свободного ASO STAT3, 4 мкМ экзо-ASO STAT3, 4 мкМ скремблированного экзо-ASO, нативных экзосом или C188-9, низкомолекулярного ингибитора STAT3, в присутствии или при отсутствии LPS.

[0046] **На ФИГ. 13А** показан уровень транскрипта STAT3 после обработки немодифицированными экзосомами (только внеклеточные везикулы [BB]) и соответствующими концентрациями свободного ASO Stat 3 и экзо-ASO Stat 3. **На ФИГ. 13В** показан уровень транскрипта CD163 после обработки немодифицированными экзосомами (только BB) и соответствующими концентрациями свободного ASO Stat 3 и экзо-ASO Stat 3. **На ФИГ. 13С** показан уровень транскрипта TGF β после обработки немодифицированными экзосомами (только BB) и соответствующими концентрациями свободного ASO Stat 3 и экзо-ASO Stat 3. **На ФИГ. 13D** показан уровень транскрипта STAT6 после обработки немодифицированными экзосомами (только BB) и соответствующими концентрациями свободного ASO Stat 3 и экзо-ASO Stat 3.

[0047] **На ФИГ. 14** показан уровень экспрессии TGF β после обработки экзосомами, загруженными ASO против STAT3 (обе химические структуры: MOE и LNA), STAT6 (химическая структура MOE) и CEBP β (химическая структура MOE), соответственно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] Поляризация макрофагов — это процесс, посредством которого макрофаги приобретают различные функциональные программы в ответ на сигналы из их микроокружения. Эта способность связана с их многочисленными функциями в организме: они являются мощными эффекторными клетками врожденной иммунной системы, но также важны для удаления клеточного дебриса, эмбрионального развития и восстановления тканей.

[0049] Фенотипы макрофагов в целом делятся на 2 группы: M1 (классически активированные макрофаги) и M2 (альтернативно активированные макрофаги). Эта широкая классификация основана на исследованиях *in vitro*, в которых культивированные макрофаги обрабатывали молекулами, стимулировавшими переключение их фенотипа в конкретное состояние. Макрофаги фенотипа M1 являются провоспалительными, важными для прямой защиты хозяина от патогенного микроорганизма, например, фагоцитоза и секреции провоспалительных цитокинов и микробицидных молекул. Макрофаги фенотипа M2 имеют совершенно противоположную функцию: регулирование фазы разрешения воспаления и восстановление поврежденных тканей. См., например, Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445–455; Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Neilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. Многие солидные опухоли характеризуются миелоидным клеточным инфильтратом, часто включающим макрофаги фенотипа M2, известные как опухолеассоциированные макрофаги (TAM). Макрофаги M2 (такие как TAM) экспрессируют высокие уровни фосфорилированных STAT3 и STAT6, которые стимулируют экспрессию метаболического фермента аргиназы (Arg1). TAM опосредуют ряд видов активности, стимулирующих опухоль, таких как, например, стимуляция подвижности раковых клеток, образование метастазов и ангиогенез, и при этом образование TAM зависит от факторов микроокружения, которые присутствуют в развивающейся опухоли. TAM продуцируют иммуносупрессивные цитокины, такие как, например, IL-10, TGF β , PGE2, и очень небольшое количество NO или ROI, и низкие уровни воспалительных цитокинов (IL-12, IL-1 β , TNF α , IL-6). По сравнению с «классически активированными» макрофагами M1, под влиянием TAM уменьшается презентация опухолеассоциированных антигенов, а также стимуляция противоопухолевых функций T- и NK-клеток. В отличие от макрофагов M1, TAM не способны лизировать опухолевые клетки. https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 Таким образом, нацеливание на TAM и другие макрофаги M2 обеспечивает новую терапевтическую стратегию против онкологического заболевания, что было продемонстрировано посредством доставки агентов для изменения набора и распределения TAM, истощения существующих TAM или индукции повторного обучения TAM с превращением из фенотипа M2 в фенотип M1.

[0050] Экзосомные терапевтические средства по настоящему изобретению оказывают избирательное влияние на макрофаги M2 для стимулирования микроокружения оседлых в ткани макрофагов с целью лечения таких заболеваний, как онкологическое заболевание и фиброз, путем «реполяризации» aberrантных макрофагов в фенотип M1 в контексте этого заболевания. Экзосомы, описанные в настоящем документе являются точно сконструированными с различными биологически активными молекулами на поверхности экзосомы или внутри просвета экзосомы с созданием кандидатов, задействующих пути, которые реполяризуют макрофаги с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 для лечения заболеваний человека.

[0051] Опухлеассоциированные M2-реполяризованные макрофаги или TAM могут эффективно подавлять пролиферацию и эффекторную функцию Т-клеток и способствовать росту опухоли. Также сообщалось об обратной реверсии TAM в фенотип M1 с использованием антитела, которое истощает макрофаги, направленные против рецептора CSF-1. В ходе клинических испытаний успех этих подходов был ограничен из-за узкого терапевтического окна и отсутствия специфичности вследствие нацеливания на все макрофаги, а не только на aberrантные макрофаги M2, как планировалось. Ожидается, что такое массовое истощение макрофагов приведет к увеличению риска инфицирования и другим проблемам безопасности. Экзосомы по настоящему изобретению более избирательно нацелены на макрофаги M2 из-за естественного тропизма экзосом к макрофагам и изменения баланса функции в направлении желаемого фенотипа M1. Эти экзосомы реполяризуют макрофаги, что приводит к выработке желаемого спектра воспалительных цитокинов, необходимых для противоопухолевых иммунных ответов. Как показано в приведенных ниже примерах, экзосомы перепрограммировали иммуносупрессивные макрофаги M2 в фенотип M1 *in vitro*.

[0052] В дополнение к иммуносупрессии, индуцированной в микроокружении опухоли, поляризованные макрофаги M2 секретируют большие количества трансформирующего фактора роста бета или TGF β , важного цитокина, участвующего в клеточной передаче сигналов, который индуцирует накопление фибробластов, приводящее к отложению коллагена и ремоделированию тканей, что в конечном итоге приводит к фиброзу тканей. В доклинических исследованиях моделей фиброза легких было показано, что перепрограммирование этих макрофагов M2 для снижения выработки TGF β путем нацеливания на ключевые сигнальные молекулы, такие как STAT3, обладает благоприятной активностью. Использовались несколько низкомолекулярных подходов к нацеливанию на STAT3, но отсутствие специфичности ингибирования только в пределах aberrантных M2-макрофагов не позволило этому подходу к лечению воплотиться в жизнь. Некоторые описанные в настоящем документе экзосомы избирательно нацелены на ключевые пути в макрофагах M2, что позволяет им оказывать целевое воздействие на STAT3 и другие клеточные пути при синдромах фиброза легких и других тканей.

[0053] В настоящем документе раскрыты внеклеточные везикулы, используемые для модуляции макрофагов иммунной системы. Эти внеклеточные везикулы содержат один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом ингибируют по меньшей мере один ген-мишень макрофага, тем самым увеличивая поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по сравнению с эквивалентным (-и) количеством (-ами) одного или более иммуномодулирующих компонентов. Также предложены способы получения внеклеточных везикул и способы использования этих внеклеточных везикул для лечения онкологических заболеваний и других заболеваний, связанных с иммунной системой, таких как, например, состояния фиброза.

[0054] Перед более подробным описанием настоящего изобретения необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно же, могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0055] Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не

указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

[0056] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, также можно использовать при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее будут описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

[0057] Все публикации и патенты, процитированные в этом описании, включены в него путем ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально указаны для включения путем ссылки и включены в настоящий документ путем ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются эти публикации.

[0058] Следует отметить, что если в контексте явно не указано иное, употребление в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число. Аналогично, термин «по меньшей мере один» включает ссылки на множественное число (*т. е.*, если в контексте явно не указано иное, эквивалентен фразе «один или более»). Следует также отметить, что в формулу изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как «исключительно», «только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования отрицательного признака.

[0059] Термин «около», когда он используется для изменения числовых значений, предназначен для охвата изменений в заявленных значениях, функционально эквивалентных заявленным значениям для целей практического применения описанной технологии, что может быть легко определено специалистом в данной области техники. В определенных вариантах осуществления термин «около» включает изменения на +/- 5%, +/- 10%, +/- 20%, +/- 30%, +/- 40% или +/- 50% от заявленных значений.

[0060] Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отличительные компоненты и признаки, которые могут быть легко отделены или объединены с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления без отступления из объема или сущности настоящего изобретения. Любой процитированный способ может быть осуществлен в указанном порядке событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0061] В ходе дальнейшего описания предмета изобретения системы предмета изобретения для практического применения в способах изобретения будут обсуждаться более подробно, после чего последует обзор связанных способов.

[0062] Используемый в данном документе термин «внеклеточная везикула» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы включают все связанные с мембраной везикулы, которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. Обычно внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различные макромолекулярные грузы, которые могут находиться во внутреннем пространстве, располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. Груз может содержать нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В качестве примера и без ограничения внеклеточные везикулы включают апоптотические тела, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым или косвенным воздействием (*например*, путем серийного выдавливания или обработки щелочными растворами), пузырьковые органеллы и везикулы, продуцируемые живыми клетками (*например*, прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов и/или культивируемых клеток. Виды внеклеточных везикул включают экзосомы и нановезикулы, как описано, *например*, в совместном патенте США № 10,195,290, включенном в настоящий документ путем ссылки для всех целей.

[0063] Используемый в данном документе термин «экзосома» относится к полученной из клетки небольшой везикуле (диаметром от 20 до 300 нм, более предпочтительно от 40 до 200 нм), содержащей мембрану, которая охватывает внутреннее пространство и которая генерируется из клетки прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной. Экзосома — это вид внеклеточной везикулы. Экзосома содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например*, терапевтический агент), приемник (*например*, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (*например*, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (*например*, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Экзосома может быть получена из клетки-производителя и выделена из клетки-производителя на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0064] Используемый в данном документе термин «нановезикула» относится к полученной из клетки небольшой (диаметром от 20 до 250 нм, более предпочтительно от 30 до 150 нм) везикуле, содержащей мембрану, охватывающую внутреннее пространство, которая генерируется из клетки путем прямой или косвенной манипуляции таким образом, что нановезикула не будет произведена клеткой-производителем без манипуляции. Подходящие манипуляции с клеткой-производителем включают, без ограничений, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. Производство нановезикул в некоторых случаях может привести к разрушению клетки-производителя. Предпочтительно, популяции нановезикул по существу не содержат везикул, полученных из клеток-производителей путем прямого отщепления от плазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с плазматической мембраной. Нановезикула — это вид внеклеточной везикулы. Нановезикула содержит липид или жирную кислоту и полипептид и необязательно содержит полезную нагрузку (*например*, терапевтический агент), приемник (*например*, нацеливающий фрагмент), полинуклеотид (*например*, нуклеиновую кислоту, РНК или ДНК), сахар (*например*, простой сахар, полисахарид или гликан) или другие молекулы. Сразу после получения нановезикулы из клетки-производителя в результате манипуляций она может быть выделена из клетки-производителя на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0065] Используемый в данном документе термин «фенотип M2» относится к макрофагам, которые проявляют один или более видов активности, стимулирующих опухоль, или экспрессируют маркеры, которые, как известно в данной области техники, связаны с фенотипом M2, такие как, без ограничений, снижение или отсутствие стимуляции Т-клеток CD8⁺ и/или естественных клеток-киллеров; отсутствие фагоцитоза опухолевых клеток; секреция и/или экспрессия цитокинов, ассоциированных с M2 (*например*, IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24); секреция и/или экспрессия факторов роста (*например*, VEGF-A, VEGF-C, EGF и TGF-β); секреция и/или экспрессия метастатических ферментов (*например*, матриксных металлопротеиназ MMP2, MMP9, цистеиновых катепсиновых протеаз); секреция/экспрессия иммуносупрессивных факторов (*например*, аргиназы I (ArgI), которая выводит субстрат L-аргинин из индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS)); экспрессия маркеров клеточной поверхности YM1, FIZZ1, дектина-1, MGL, экспрессия микроРНК, ассоциированных с M2 (*например*, микроРНК146а, микроРНК let 7b и микроR-223) (*см.*, *например*, публикации Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20; и Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520–5299 и приведенные в них ссылки, каждая из которых включена путем ссылки для всех целей) и/или снижение экспрессии/секреции M1-ассоциированных факторов или снижение M1-ассоциированных активностей, перечисленных ниже, по сравнению по меньшей мере с одним эталонным образцом, где эталонный образец содержит популяцию M1-активированных макрофагов. Активация M1 *in vitro* вызывается обработкой лигандами TLR, такими как бактериальный липополисахарид (LPS), типичный для грамотрицательных бактерий, и липотейхоевая кислота (LTA), типичная для грамположительных бактерий, , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или комбинация LPS и интерферона-гамма (IFN-γ). *См.* публикации Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173; Krausgruber, Thomas, *et al.* "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nature immunology* 12.3 (2011): 231-238 and Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6 (March), 1–13, и приведенные в них ссылки, каждая из которых включена путем ссылки для всех целей.

[0066] Используемый в данном документе термин «фенотип M1» относится к макрофагам, которые проявляют противоопухолевые виды активности или экспрессируют маркеры, которые, как известно в данной области техники, связаны с фенотипом M1, такие как, без ограничений, стимуляция Т-клеток CD8⁺ и/или естественных клеток-киллеров, фагоцитоз опухолевых клеток, секреция и/или экспрессия цитокинов, ассоциированных с M1 (*например*, INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 и CXCL11), экспрессия микроРНК, ассоциированных с M1 (*например*, микроРНК155, микроR-33) (*см.*, *например*, публикации Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20; и Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520–5299, и приведенные в них ссылки, каждая из которых включена путем ссылки для всех целей) и/или снижение экспрессии/секреции

M2-ассоциированных факторов или снижение M2-ассоциированных активностей, перечисленных выше, по сравнению по меньшей мере с одним эталонным образцом, где эталонный образец содержит популяцию M2-активированных макрофагов. M2-активация *in vitro* вызывается обработкой цитокинами IL-4 и IL-13 (см., например, публикацию Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520–529, включенную путем ссылки для всех целей).

[0067] Используемый в данном документе термин «поляризация макрофага» относится к изменению фенотипа макрофага с M2 на M1 и/или относится к увеличению процента популяции макрофагов, обнаруженных у пациента (например, макрофагов, ассоциированных с опухолью, или циркулирующих макрофагов), проявляющих фенотип M1 по сравнению с по меньшей мере одним эталонным образцом (например, с образцом, полученным от того же пациента перед получением тестируемого образца, или по сравнению с историческими данными). См., например, публикации Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173; Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969; и Xue, J., Schmidt, S. V. and Schultze, J. L. (2014), Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2)L 274-288, каждая из которых включена путем ссылки для всех целей.

[0068] Термин «доставка внеклеточных везикул» относится к введению и локализации внеклеточных везикул в целевой ткани, клетке и/или органе субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть доставлен в цитоплазму клетки-мишени. В других вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент доставляется к мембране клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления мембрана внеклеточной везикулы сливается с мембраной клетки-мишени.

[0069] Используемый в данном документе термин «клетка-продуцент» относится к любой клетке, из которой может быть выделена внеклеточная везикула. Клетка-продуцент представляет собой клетку, которая служит источником внеклеточной везикулы. Клетка-продуцент может иметь с внеклеточной везикулой общий белковый, липидный, сахарный компонент или компонент в виде нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент является модифицированной или синтетической клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент является культивированной или изолированной клеткой. В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой клеточную линию. В некоторых вариантах осуществления линия клеток-продуцентов представляет собой клеточную линию почек эмбриона человека. В некоторых вариантах осуществления линия клеток-продуцентов представляет собой клеточную линию HEK293SF. В некоторых других вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой первичную клетку. В некоторых конкретных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой иммунную клетку, такую как, например, В-лимфоцит, Т-лимфоцит, дендритная клетка, тучная клетка, макрофаг, естественная клетка-киллер (НК-клетка), антигенпрезентирующая клетка, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (Treg-клетка).

[0070] Используемый в данном документе термин «мембрана» представляет собой пограничный слой, который отделяет внутреннее пространство от внешнего пространства, содержащий одно или более биологических соединений, обычно липидов и, необязательно, полипептиды и/или углеводы. В некоторых

вариантах осуществления мембрана содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления мембрана содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины. В некоторых из этих вариантов осуществления мембрана дополнительно содержит один или более полипептидов и/или один или более полисахаридов, таких как гликан. Внеклеточная везикула содержит мембрану, как определено в данном документе.

[0071] Используемый в данном документе термин «иммуномодулирующий компонент» относится к терапевтическому агенту, который действует на мишень (*например*, на ген-мишень, в том числе, в качестве примера, но не ограничения, на KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназу, глутаминазу, СЕВР/β, Pi3Kγ и PKM2), контактирующую с агентом, и модифицирует иммунную клетку (*например*, макрофаг или другие иммунные клетки). Иммуномодулирующий компонент, который может быть введен во внеклеточную везикулу и/или в клетку-продуцент, включает терапевтические агенты, такие как полинуклеотид, например ингибирующая нуклеиновая кислота (*например*, антисмысловой олигонуклеотид (ASO), миРНК, микроРНК, антисмысловая РНК, мшРНК, днкРНК, перв-микроРНК и пре-микроРНК), агонист, антагонист, антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент, модуляторы ингибиторов контрольной точки иммунного ответа или лиганды ингибиторов контрольной точки иммунного ответа, поверхностные антигены и их производные и/или цитокины и их производные. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту (*например*, антисмысловой олигонуклеотид (ASO), миРНК, микроРНК, антисмысловую РНК, мшРНК, днкРНК, перв-микроРНК и пре-микроРНК). См., *например*, публикации Weiss, B. (ed.): *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature*. **411** (6836): 494–988; Bartel DP (January 2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell*. **116** (2): 281–97; Paddison, PJ; Caudy, AA; Bernstein, E; Hannon, GJ; Conklin, DS (15 April 2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells". *Genes & Development*. **16** (8): 948–58; Ma L, Bajic VB, Zhang Z (June 2013). "On the classification of long non-coding RNAs". *RNA Biology*. **10** (6): 925–33; и Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (март 2003). "A uniform system for microRNA annotation". *RNA*. **9** (3): 277–9, каждая из которых включена в настоящий документ для всех целей.

[0072] В контексте данного документа фраза «молекула нуклеиновой кислоты, которая оказывает ингибирующее действие» или «ингибирующая нуклеиновая кислота» относится к любой нуклеиновой кислоте, которая при введении в клетку таким образом, чтобы она взаимодействовала с геном-мишенью, приводит к ингибированию экспрессии или активности этого гена-мишени. Молекула нуклеиновой кислоты, которая оказывает ингибирующее действие, *т. е.* ингибирующая нуклеиновая кислота, может представлять собой ДНК, или ингибирующую РНК (*например*, миРНК, микроРНК, антисмысловую РНК, мшРНК, днкРНК, пре-микроРНК или мРНК), при этом указанная РНК является одноцепочечной, двухцепочечной или содержит как одноцепочечные, так и двухцепочечные области. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой

олигонуклеотид (ASO). ASO может представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, РНК или гибрид ДНК/РНК. См., например, публикацию Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997, включенную в настоящий документ путем ссылки для всех целей. «Экзо ASO» представляет собой ASO, который физически связан с внеклеточной везикулой, такой как, например, экзосома, через взаимодействия с мембраной везикулы (например, как это происходит с ASO, полученными из холестерина или жирных ацилов), или путем нагрузки в просвет везикулы, используя такие методы, как электропорация или генная инженерия клетки-производителя, например, путем трансфекции или трансдукции с введением в клетку-производитель конструкции, которая кодирует желаемый ASO, с последующим выделением внеклеточных везикул из сконструированной клетки-производителя.

[0073] Термин «приемник» относится к молекуле, которая направляет внеклеточную везикулу к мишени и/или стимулирует взаимодействие внеклеточной везикулы с мишенью у субъекта. В некоторых вариантах осуществления приемник представляет собой полипептид, также иногда называемый в настоящем документе «полипептидом-приемником». В некоторых вариантах осуществления приемник способен увеличивать концентрацию иммуномодулирующего компонента в ткани субъекта, например, путем направленной миграции в ткань-мишень субъекта. Примеры приемников включают, без ограничений, примеры, приведенные в таблице 3.

[0074] Термин «мишень» может относиться к гену, активность которого должна модулироваться иммуномодулирующим компонентом настоящего изобретения (*т. е.* к гену-мишени). В определенных вариантах осуществления ген-мишень ингибируется молекулой нуклеиновой кислоты, связанной с внеклеточными везикулами (*т. е.* связанной с поверхностью мембраны, интеркалированной внутри липидного бислоя или инкапсулированной внутри закрытого объема везикулы), такими как, например, ингибирующий ASO. Примеры генов-мишеней включают, без ограничений, KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCARI, A2AB, IDO, TDO, аргиназу, глутаминазу, СЕВР/β, Рi3Kγ и РKM2. Термин «мишень» может также относиться к клетке, на которую направлены внеклеточные везикулы настоящего изобретения (*т. е.* к клетке-мишени). В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой иммунную клетку (например, макрофаг). В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку или плюрипотентную стволовую клетку. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой циркулирующий макрофаг. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой оседлый в опухоли макрофаг (*т. е.* макрофаг, расположенный в микроокружении опухоли, в ткани опухоли или вблизи поверхности опухоли). Кроме того, термин «мишень» может также относиться к белку на клетке-мишени, активность которого модулируется при контакте с иммуномодулирующим компонентом по настоящему изобретению, или к белку, который действует как лиганд для связывания внеклеточных везикул по настоящему изобретению (*т. е.* к целевому белку). Таким образом, в определенных вариантах осуществления целевой белок находится на клетке-мишени и взаимодействует с внеклеточной везикулой.

[0075] Термин «терапевтический агент» или «терапевтическая молекула» включает соединение или молекулу, которые, при наличии в эффективном количестве, оказывают желаемый терапевтический эффект, фармакологический и/или физиологический эффект на субъекта, нуждающегося в этом. Он включает любое

соединение, *например* низкомолекулярное лекарственное средство или биологическое средство (*например*, полипептидное лекарственное средство или лекарственное средство на основе нуклеиновой кислоты), которое при введении субъекту оказывает измеримое или передаваемое воздействие на субъекта, *например*, ослабляет или уменьшает симптом заболевания, расстройства или состояния.

[0076] Используемый в данном документе термин «ингибитор контрольной точки иммунного ответа» или «ингибитор контрольной точки» относится к терапевтическому агенту, который стимулирует активность иммунных клеток путем уменьшения иммуносупрессивных путей передачи сигнала контрольной точки, которые подавляют иммунные клетки (*например*, агенты, ингибирующие PD-1/PD-L1 (такие как ниволумаб, цемиплимаб и пембролизумаб, нацеленные на PD-1, и атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, каждый из которых нацелен на PD-L1) и CTLA-4/B7-1/B7-2, *например* ипилимумаб). См., *например*, Pardoll DM (March 2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nature Reviews. Cancer*. 12 (4): 252–64.

[0077] Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, независимо от того, является ли он природным или частично или полностью синтезированным, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывает и распознает антиген. При применении термина «антитело» он включает в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мышцы-человека, мышцы-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например*, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. Типичные композиции антител включают антитела, которые ингибируют CTLA-4, *например*, ипилимумаб, антитела, которые ингибируют PD-1, такие как, *например*, ниволумаб, цемиплимаб и пембролизумаб, антитела, которые ингибируют PD-L1, такие как, *например*, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, и антитела, которые ингибируют CSFR1, такие как, *например*, пексидартиниб, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаб, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаб. В контексте настоящего документа термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагментам интактного иммуноглобулина и любой части полипептида, включая антигенсвязывающие области, обладающие способностью специфически связываться с антигеном. *Например*, антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой F(ab')₂-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент или scFv-фрагмент, но не ограничивается ими. Fab-фрагмент имеет один антигенсвязывающий участок и содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную область CH1 тяжелой цепи. Fab'-фрагмент отличается от Fab-фрагмента тем, что Fab'-фрагмент дополнительно включает в себя шарнирную область тяжелой цепи, включая по меньшей мере один остаток цистеина на С-конце CH1-области тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент образуется в результате соединения остатков цистеина Fab'-фрагмента дисульфидной связью в шарнирной области. Fv-фрагмент представляет собой минимальный фрагмент антитела, имеющий только переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, и при этом рекомбинантный метод получения Fv-фрагмента хорошо известен в данной области техники.

Двухцепочечные Fv-фрагменты могут иметь структуру, в которой переменные области тяжелой цепи связаны с переменными областями легкой цепи нековалентной связью. Одноцепочечные Fv (scFv)-фрагменты, как правило, могут иметь димерную структуру, как в двухцепочечных Fv-фрагментах, в которых переменные области тяжелой цепи ковалентно связаны с переменными областями легкой цепи через пептидный линкер, или переменные области тяжелой и легкой цепи непосредственно связаны друг с другом на С-конце. Антигенсвязывающий фрагмент может быть получен с использованием протеазы (например, целое антитело расщепляют папаином с получением Fab-фрагментов и расщепляют пепсином с получением F(ab')₂-фрагментов), а также может быть получен генетическим рекомбинантным методом. Фрагмент доменного антитела dAb состоит из домена VH. Молекулы одноцепочечных антител могут содержать полимер, состоящий из ряда отдельных молекул, например димер, тример или другие полимеры.

[0078] Фраза «молекула нуклеиновой кислоты» относится к одноцепочечному или двухцепочечному полимеру, состоящему из дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований. Она включает хромосомную ДНК и самореплицирующиеся плазмиды, векторы, мРНК, тРНК, миРНК, микроРНК и *т. п.* Молекула нуклеиновой кислоты может быть рекомбинантной, и при введении нуклеиновой кислоты в клетку могут экспрессироваться экзогенные полипептиды. Термин охватывает химически модифицированные нуклеиновые кислоты, такие как те, которые описаны, *например*, в публикации Selvam C, Mutisya D, Prakash S, Ranganna K, Thilagavathi R. "Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends," *Chem Biol Drug Des.* 2017 Nov;90(5):665-678, закрытые нуклеиновые кислоты (LNA), как описанные, *например*, в публикации Petersen M, Wengel J (February 2003). "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics". *Trends Biotechnol.* 21 (2): 74–81; и другие типы клинически значимых, химически модифицированных нуклеиновых кислот, таких как те, которые описаны, *например*, в публикациях Summerton, J; Weller, D (1997). "Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties". *Antisense & Nucleic Acid Drug Development.* 7 (3): 187–195; Goodchild, J (2011). Therapeutic oligonucleotides. *Methods in Molecular Biology.* 764. pp. 1–15, включенных в настоящий документ путем ссылки для всех целей.

[0079] Термин «агонист» относится к молекуле, которая связывается с рецептором и активирует рецептор с получением биологического ответа. Рецепторы могут быть активированы либо эндогенным, либо экзогенным агонистом. Неограничивающие примеры эндогенного агониста включают гормоны и нейромедиаторы. Неограничивающие примеры экзогенных агонистов включают различные классы соединений, включая малые молекулы, антитела, синтетические пептиды *и т. п.* Агонист может быть полным, частичным или обратным агонистом.

[0080] Термин «антагонист» относится к молекуле, которая при связывании с рецептором скорее блокирует или ослабляет опосредованный агонистом ответ, а не вызывает сам биологический ответ. Многие антагонисты достигают своей эффективности, конкурируя с эндогенными лигандами или субстратами в структурно определенных участках связывания на рецепторах. Неограничивающие примеры антагонистов включают альфа-блокаторы, бета-блокаторы и блокаторы кальциевых каналов. Антагонист может быть конкурентным, неконкурентным или неконкурентоспособным антагонистом.

[0081] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к одному или более соединений, описанных в настоящем документе, таких как, *например*, внеклеточная везикула, смешанная с одним или более других химических компонентов, таких как фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества, или суспендированная в них. Одной целью фармацевтической

композиции является облегчение введения препаратов внеклеточных везикул субъекту. Термин «фармацевтически приемлемый» и его грамматические варианты относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, которые можно вводить или наносить субъекту, не вызывая нежелательных физиологических эффектов такой степени, при которой нельзя вводить композицию. Термин «вспомогательное вещество» или «носитель» относится к инертному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» охватывает все вещества, одобренные регулирующим органом федерального правительства США или перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, включая людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены вспомогательные вещества и носители, которые являются применимыми при приготовлении фармацевтической композиции и, как правило, безопасными, нетоксичными и желательными.

[0082] Используемые в данном документе термины «выделить», «выделенный» и «выделение» или «очищать», «очищенный» и «очищение», а также «извлеченный» и «извлекать» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию приготовления (*например*, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных внеклеточных везикул, которые прошли один или более процессов очистки, *например*, отбор или обогащение желаемого препарата внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления выделение или очистка, используемые в настоящем документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) внеклеточных везикул из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых вариантах осуществления выделенная композиция внеклеточных везикул не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других вариантах осуществления композиция выделенных внеклеточных везикул содержит такое количество и/или концентрацию желаемых внеклеточных везикул, которое является приемлемым количеством и/или концентрацией или превышает приемлемое количество и/или концентрацию. В других вариантах осуществления композиция выделенных внеклеточных везикул обогащена по сравнению с исходным материалом (*например*, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых вариантах осуществления препараты выделенных внеклеточных везикул по существу не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых вариантах осуществления препараты выделенных внеклеточных везикул являются на 100% свободными, на 99% свободными, на 98% свободными, на 97% свободными, на 96% свободными или на 95% свободными от каких-либо загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. «По существу свободная от остаточных биологических продуктов» может также означать, что композиция внеклеточных везикул не содержит обнаруживаемых клеток-продуцентов и что в ней обнаруживаются только внеклеточные везикулы.

[0083] Термины «введение» и его варианты относятся к введению субъекту композиции, такой как внеклеточная везикула или агент, и включают одновременное и последовательное введение одной или более дополнительных композиций или агентов по любой схеме, соответствующей получению терапевтического эффекта. Время введения дозы может быть выбрано с целью достижения постоянных уровней вводимого агента в организме субъекта (например, уровней в плазме) или для эпизодического воздействия, *например*, для снижения токсичности или предотвращения десенсibilизации. Способы достижения этих результатов хорошо известны практикующим специалистам в данной области на основании известных фармакокинетических принципов, изложенных, *например*, в публикации Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Macmillan Publishing Co. 13th Ed.). Введение композиции или агента субъекту осуществляется любым подходящим путем, включая введение перорально, в легкие, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно или подкожно), ректально, внутривнутрилимфатически, интратекально, периокулярно, внутривнутриопухолево или наружно. Введение включает самостоятельное введение самому себе или введение другим лицом. Подходящий путь введения обеспечивает выполнение композицией или агентом намеченной функции. Например, если подходящим путем введения является внутривенный путь, композицию или агент вводят в вену субъекта.

[0084] Используемый в данном документе термин «модулировать», «модулирование», «модифицировать» и/или «модулятор» по существу относится к способности изменять путем увеличения или уменьшения, *например*, прямо или косвенно содействуя/стимулируя/повышая или блокируя/ингибируя/снижая определенную концентрацию, уровень, экспрессию, функцию или поведение, *например*, для действия в качестве антагониста или агониста. В некоторых случаях модулятор может увеличивать и/или уменьшать определенную концентрацию, уровень, активность или функцию по сравнению с контролем или по сравнению со средним уровнем активности, который обычно ожидается, или по сравнению с контрольным уровнем активности. Термины «ингибирование», «подавление», «модуляция» используются здесь для описания изменений в экспрессии или активности гена-мишени по сравнению с условиями без применения иммуномодулирующего (-их) компонента (-ов). Ингибирование относится к устранению или по существу к устранению экспрессии или активности гена. Подавление означает уменьшение, но не полное устранение или существенное устранение экспрессии или активности гена. Модуляция означает любое изменение, увеличение или уменьшение экспрессии или активности гена.

[0085] Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для достижения желаемого эффекта, *например* количество, достаточное для модуляции состояния у субъекта.

[0086] Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое эффективно для ослабления симптома заболевания. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактику можно рассматривать как терапию.

[0087] Процент «идентичности» между нуклеотидной последовательностью и эталонной последовательностью определяется как процентная доля одиночных нуклеотидов в нуклеотидной последовательности, которые идентичны единичным нуклеотидам в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности

нуклеотидной последовательности может быть осуществлено различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA или MUSCLE. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для получения дополнительной информации об алгоритме BLAST см. Mount, D. W. (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9.

[0088] Процент «идентичности» между полипептидной последовательностью и эталонной последовательностью определяется как процент аминокислотных остатков в полипептидной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть осуществлено различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA или MUSCLE. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для получения дополнительной информации об алгоритме BLAST см. Mount, D. W. (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9.

[0089] Используемый в данном документе термин «по существу» или «существенный» относится, например, к присутствию, уровню или концентрации объекта в конкретном пространстве, влиянию одного объекта на другой объект или к эффекту лечения. Например, активность, уровень или концентрация объекта увеличивается существенно, если происходит увеличение в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз по сравнению с исходным уровнем. Активность, уровень или концентрация объекта также существенно увеличиваются, если происходит увеличение на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% по сравнению с исходным уровнем.

[0090] Термин «*in vivo*» относится к процессам, которые происходят в живом организме.

[0091] Используемый в данном документе термин «млекопитающее» включает как людей, так и млекопитающих, не являющихся людьми.

[0092] Сокращения, используемые в этой заявке, включают следующие: «мРНК» относится к матричной РНК; «микроРНК» относится к микро РНК; «миРНК» относится к малой интерферирующей РНК; «антисмысловая РНК» относится к одноцепочечной РНК, являющейся комплементарной РНК, которая может дополнительно содержать нуклеотиды ДНК и часто относится к антисмысловому олигонуклеотиду или «ASO»; «мшРНК» относится к малой или короткой шпилечной РНК; «днкРНК» относится к длинной некодирующей РНК; и «дцДНК» относится к двухцепочечной ДНК.

Композиции

[0093] Аспекты предмета раскрытия включают композиции, способные регулировать работу иммунной системы. Композиция содержит внеклеточную везикулу, содержащую клеточную мембрану и по меньшей мере один иммуномодулирующий компонент, связанный с клеточной мембраной или заключенный внутри закрытого объема, связанного с мембраной. Вложение внутрь связанного с мембраной объема может быть осуществлено с использованием методов, включающих электропорацию, лиофилизацию или с помощью конструирования клеток-продуцентов (таких как, *например*, клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) и мезенхимальные стволовые клетки (MSC)) для введения конструкции, кодирующей иммуномодулирующий компонент, такой как нуклеиновая кислота (кодирующая ASO) или белок. Связь с клеточной мембраной включает связывание с внутренним или наружным липидным листком мембраны и трансмембранную вставку в липидный бислой. В некоторых случаях связь с мембраной достигается с использованием белка (*например*, каркасного белка или его фрагмента), такого как, *например*, отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN); базигин (BSG); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (IGSF2); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов (IGSF3); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов (IGSF8); интегрин бета-1 (ITGB1); интегрин альфа-4 (ITGA4); тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2); и класса белков-переносчиков АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4, которые были выявлены на поверхности экзосом как высокообогащенные (как описано в совместном патенте США № 10,195,290) и которые могут обеспечить элемент слитого белка, включающий каркас и иммуномодулирующий компонент. Такие внеклеточные везикулы и иллюстративные методики подробно описаны в совместном патенте США № 10,195,290, включенном в настоящий документ путем ссылки для всех целей. Как описано в совместном патенте США № 10,195,290, сконструированные на поверхности экзосомы могут быть получены химическими и/или физическими методами, такими как ПЭГ-индуцированное слияние и/или ультразвуковое слияние с введением этих каркасных белков (и их фрагментов) в экзосомы или клетки-продуценты. Между экзогенным терапевтическим белком и каркасным белком может быть создан комплекс. Альтернативно, слитый белок может быть получен путем конъюгирования каркасного белка и экзогенного терапевтического белка, такого как, *например*, иммуномодулирующий белок, и получения с помощью вышеупомянутых химических и/или физических методов сконструированной экзосомы, содержащей на поверхности комплекс или гибридный белок. Нативный полноразмерный или биологически активный фрагмент терапевтического белка может быть перенесен на поверхность экзосом путем конъюгирования с каркасным белком. Такие экзосомы также могут быть получены из клетки-продуцента, которая содержит экзогенную последовательность, вставленную в геном клетки. *Например*, экзогенная последовательность может быть вставлена в геномный участок, расположенный на 3'- или 5'-конце геномной последовательности, кодирующей PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или переносчик АТФ. *Например*, экзогенная последовательность может быть вставлена в геномную последовательность, кодирующую PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или переносчик АТФ. Связь с клеточной мембраной охватывает связывание иммуномодулирующего компонента с внутренней или внешней поверхностью мембраны, закрепление иммуномодулирующего компонента внутри липидного бислоя или распространение иммуномодулирующего компонента по липидному бислою. Иммуномодулирующий

компонент может быть привязан к каркасному белку или экспрессирован в виде слитого белка с каркасным белком, как описано в совместном патенте США № 10,195,290.

Внеклеточная везикула

[0094] В различных вариантах осуществления композиция содержит внеклеточную везикулу. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу клеточного происхождения, содержащую мембрану, которая окружает внутреннее пространство, как описано в совместном патенте США № 10,195,290.

[0095] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула может представлять собой связанную с мембраной везикулу, которая имеет меньший диаметр, чем клетка, из которой она получена. В некоторых вариантах осуществления наибольший размер внеклеточной везикулы составляет приблизительно 20–1000 нм, например, приблизительно 20–100 нм, 20–200 нм, 20–300 нм, 20–400 нм, 20–500 нм, 20–600 нм, 20–700 нм, 20–800 нм, 20–900 нм, 30–100 нм, 30–200 нм, 30–300 нм, 30–400 нм, 30–500 нм, 30–600 нм, 30–700 нм, 30–800 нм, 30–900 нм, 40–100 нм, 40–200 нм, 40–300 нм, 40–400 нм, 40–500 нм, 40–600 нм, 40–700 нм, 40–800 нм, 40–900 нм, 50–150 нм, 50–500 нм, 50–750 нм, 100–200 нм, 100–500 нм или 500–1000 нм.

[0096] В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула является нановезикулой. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой апоптотическое тело. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой фрагмент клетки. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу, полученную из клетки путем прямой или косвенной манипуляции. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулярную органеллу. В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой везикулу, продуцируемую живыми клетками.

[0097] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула получена из живого организма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула получена из неживого организма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула получена из эксплантированной ткани. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула получена из эксплантированного органа. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула получена из культивированных клеток. В некоторых из этих вариантов осуществления, в которых внеклеточная везикула генерируется в системе культивирования клеток, внеклеточную везикулу дополнительно выделяют (*например*, путем отделения внеклеточной везикулы от культивированных клеток). Разделение может быть достигнуто путем осаждения. Например, внеклеточная везикула может иметь удельную плотность в диапазоне 0,5–2,0, 0,6–1,0, 0,7–1,0, 0,8–1,0, 0,9–1,0, 1,0–1,1, 1,1–1,2, 1,2–1,3, 1,4–1,5, 1,0–1,5, 1,5–2,0 и 1,0–2,0 кг/м³. Разделение может быть также достигнуто путем аффинной очистки. Например, внеклеточная везикула может быть очищена путем связывания популяции, содержащей внеклеточные везикулы, со смолой, причем указанная смола содержит множество лигандов, которые обладают специфической аффинностью к одному или более белкам на поверхности внеклеточной везикулы. Белки могут представлять собой тетраспаннин (*например*, CD63, CD81, CD9), член суперсемейства белков/иммуноглобулинов EWI (*например*, PTGFRN, IGSF8, IGSF3), интегрин

(например, ITGB1, ITGA4), белок-переносчик АТФ (например, АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4), SLC3A2, BSG или CD98hc.

[0098] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула содержит липиды или жирные кислоты и полипептиды. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит сахар. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит полинуклеотид.

[0099] В различных вариантах осуществления мембрана внеклеточной везикулы имеет внутреннюю поверхность и внешнюю поверхность и окружает внутреннее пространство. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит полезную нагрузку, например иммуномодулирующий компонент, описанный в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка заключена во внутреннее пространство. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка отображается на внешней поверхности внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка охватывает мембрану внеклеточной везикулы. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка содержит нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. Способы получения внеклеточных везикул с полезными нагрузками включают электропорацию, лиофилизацию и генную инженерию клеток-производителей, из которых могут быть выделены внеклеточные везикулы. См., например, совместный патент США № 10,195,290 и информацию выше. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула дополнительно содержит приемник, т. е. нацеливающий фрагмент, который может быть специфичным в отношении органа, ткани или клетки, как описано в совместном патенте США № 10,195,290. Используются слитые белки, имеющие нацеливающий фрагмент. Например, слитые белки могут содержать переносчик АТФ, RTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или их фрагмент или вариант, и нацеливающий фрагмент. Нацеливающий фрагмент может быть использован для нацеливания экзосомы на конкретный орган, ткань или клетку для лечения с использованием экзосомы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и далее включают одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₁₂, Fv, dAb и Fd, антитела и связанные с антителами полипептиды. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты также включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию.

Экзосома

[00100] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В определенных вариантах осуществления экзосома представляет собой небольшую связанную с мембраной везикулу, секретируемую клетками-производителями.

[00101] В некоторых вариантах осуществления наибольший размер экзосомы из клетки-продуцента составляет приблизительно 20–300 нм, например, приблизительно 20–290 нм, 20–280 нм, 20–270 нм, 20–260 нм, 20–250 нм, 20–240 нм, 20–230 нм, 20–220 нм, 20–210 нм, 20–200 нм, 20–190 нм, 20–180 нм, 20–170 нм, 20–160 нм, 20–150 нм, 20–140 нм, 20–130 нм, 20–120 нм, 20–110 нм, 20–100 нм, 20–90 нм, 20–80 нм, 20–70 нм, 20–60 нм, 20–50 нм, 20–40 нм, 20–30 нм, 30–300 нм, 30–290 нм, 30–280 нм, 30–270 нм, 30–260 нм, 30–250 нм, 30–240 нм, 30–230 нм, 30–220 нм, 30–210 нм, 30–200 нм, 30–190 нм, 30–180 нм, 30–170 нм, 30–160 нм, 30–150 нм, 30–140 нм, 30–130 нм, 30–120 нм, 30–110 нм, 30–100 нм, 30–90 нм, 30–80 нм, 30–70 нм, 30–60 нм, 30–50 нм, 30–40 нм, 40–300 нм, 40–290 нм, 40–280 нм, 40–270 нм, 40–260 нм, 40–250 нм, 40–240 нм, 40–230 нм, 40–220 нм, 40–210 нм, 40–200 нм, 40–190 нм, 40–180 нм, 40–170 нм, 40–160 нм, 40–150 нм, 40–140 нм, 40–130 нм, 40–120 нм, 40–110 нм, 40–100 нм, 40–90 нм, 40–80 нм, 40–70 нм, 40–60 нм, 40–50 нм, 50–300 нм, 50–290 нм, 50–280 нм, 50–270 нм, 50–260 нм, 50–250 нм, 50–240 нм, 50–230 нм, 50–220 нм, 50–210 нм, 50–200 нм, 50–190 нм, 50–180 нм, 50–170 нм, 50–160 нм, 50–150 нм, 50–140 нм, 50–130 нм, 50–120 нм, 50–110 нм, 50–100 нм, 50–90 нм, 50–80 нм, 50–70 нм, 50–60 нм, 60–300 нм, 60–290 нм, 60–280 нм, 60–270 нм, 60–260 нм, 60–250 нм, 60–240 нм, 60–230 нм, 60–220 нм, 60–210 нм, 60–200 нм, 60–190 нм, 60–180 нм, 60–170 нм, 60–160 нм, 60–150 нм, 60–140 нм, 60–130 нм, 60–120 нм, 60–110 нм, 60–100 нм, 60–90 нм, 60–80 нм, 60–70 нм, 70–300 нм, 70–290 нм, 70–280 нм, 70–270 нм, 70–260 нм, 70–250 нм, 70–240 нм, 70–230 нм, 70–220 нм, 70–210 нм, 70–200 нм, 70–190 нм, 70–180 нм, 70–170 нм, 70–160 нм, 70–150 нм, 70–140 нм, 70–130 нм, 70–120 нм, 70–110 нм, 70–100 нм, 70–90 нм, 70–80 нм, 80–300 нм, 80–290 нм, 80–280 нм, 80–270 нм, 80–260 нм, 80–250 нм, 80–240 нм, 80–230 нм, 80–220 нм, 80–210 нм, 80–200 нм, 80–190 нм, 80–180 нм, 80–170 нм, 80–160 нм, 80–150 нм, 80–140 нм, 80–130 нм, 80–120 нм, 80–110 нм, 80–100 нм, 80–90 нм, 90–300 нм, 90–290 нм, 90–280 нм, 90–270 нм, 90–260 нм, 90–250 нм, 90–240 нм, 90–230 нм, 90–220 нм, 90–210 нм, 90–200 нм, 90–190 нм, 90–180 нм, 90–170 нм, 90–160 нм, 90–150 нм, 90–140 нм, 90–130 нм, 90–120 нм, 90–110 нм, 90–100 нм, 100–300 нм, 110–290 нм, 120–280 нм, 130–270 нм, 140–260 нм, 150–250 нм, 160–240 нм, 170–230 нм, 180–220 нм или 190–210 нм.

[00102] В особенно предпочтительных вариантах осуществления экзосома из клетки-продуцента, описанная в настоящем документе, имеет наибольший размер приблизительно 30–100 нм. В другом предпочтительном варианте осуществления экзосома из клетки-продуцента имеет наибольший размер приблизительно 20–300 нм. В другом предпочтительном варианте осуществления экзосома из клетки-продуцента имеет наибольший размер приблизительно 40–200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 90% экзосом имеет наибольший размер 20–300 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 95% экзосом имеет наибольший размер 20–300 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 99% экзосом имеет наибольший размер 20–300 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 90% экзосом имеет наибольший размер 40–200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 95% экзосом имеет наибольший размер 40–200 нм. В другом варианте осуществления популяция экзосом, описанная в настоящем документе, представляет собой популяцию, в которой 99% экзосом имеет наибольший размер 40–200 нм. В других предпочтительных вариантах осуществления размер

экзосомы или популяции экзосом, описанных в настоящем документе, измеряют в соответствии с методами, описанными *ниже*.

[00103] В некоторых вариантах осуществления экзосома генерируется клеткой-продуцентом. В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит одну или более молекул, полученных из клетки-продуцента. В некоторых вариантах осуществления экзосому генерируют в системе культивирования клеток и выделяют (*например*, путем отделения экзосомы от клетки-продуцента). Разделение может быть достигнуто путем осаждения. Например, экзосома может иметь удельную плотность в диапазоне 0,5–2,0, 0,6–1,0, 0,7–1,0, 0,8–1,0, 0,9–1,0, 1,0–1,1, 1,1–1,2, 1,2–1,3, 1,4–1,5, 1,0–1,5, 1,5–2,0 и 1,0–2,0 кг/м³. Разделение может быть также достигнуто путем аффинной очистки. Например, внеклеточная везикула может быть очищена путем связывания популяции, содержащей внеклеточные везикулы, со смолой, причем указанная смола содержит множество лигандов, которые обладают специфической аффинностью к одному или более белкам на поверхности внеклеточной везикулы. Один или более белков на поверхности внеклеточной везикулы могут представлять собой тетраспанин (*например*, CD63, CD81 и/или CD9), член суперсемейства белков/иммуноглобулинов EWI (*например*, PTGFRN, IGSF8 и/или IGSF3), интегрин (*например*, ITGB1 и/или ITGA4), белок-переносчик АТФ (*например*, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 и/или ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc. Белок может дополнительно иметь активность в качестве иммуномодулирующего компонента, отображаемого на поверхности экзосом, необязательно посредством слияния с полипептидным фрагментом, который обладает желаемой фармакологической активностью, таким как, *например*, антитело, фрагмент антитела, scFv и *т. д.* с активностью ингибирования контрольной точки. Такие антитела известны в данной области техники, *например* ипилимумаб, нацеленные на CTLA-4, ниволумаб, цемиплимаб и пембролизумаб, нацеленные на PD-1, а также атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, каждый из которых нацелен на PD-L1 (*см.*, *например*, публикацию Pardoll DM (март 2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nature Reviews. Cancer*. 12 (4): 252–64, включенную в настоящий документ путем ссылки.

[00104] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы имеет внутреннюю поверхность и внешнюю поверхность. В определенных вариантах осуществления внутренняя поверхность обращена к внутреннему ядру экзосомы. В определенных вариантах осуществления внешняя поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными телами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или клетки-мишени.

[00105] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины. В некоторых вариантах осуществления липид и жирная кислота могут представлять собой один или более из перечисленных в таблице 1.

[00106] В определенных вариантах осуществления экзосома содержит липидный бислои, состоящий из внутреннего листка и наружного листка. Состав внутреннего и наружного листка можно определить с помощью анализов распределения через бислои, известных в данной области техники, *см.* *например*, Kuipers *et al.* *Biochim Biophys Acta* 1985 819:170. В некоторых вариантах осуществления композиция наружного листка содержит приблизительно 70–90% холиновых фосфолипидов, приблизительно 0–15% кислых фосфолипидов и приблизительно 5–30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых вариантах осуществления

композиция внутреннего листка содержит приблизительно 15–40% холиновых фосфолипидов, приблизительно 10–50% кислых фосфолипидов и приблизительно 30–60% фосфатидилэтаноламина.

[00107] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы дополнительно содержит один или более полипептидов. В определенных вариантах осуществления экзосома содержит один или более полипептид, выбранный из следующего списка, включая, без ограничений, спектрин, миозиноподобный полипептид, белок band 3, SLC4A1, актин, актиноподобный полипептид, глицеральдегид 3-Р дегидрогеназа (G3PD), тетраспанины (*например*, CD63, CD81 и/или CD9), белки Alix и TSG101, интегрины (*например*, ITGB1 и/или ITGA4), селектины, CR1, TNFR1, протеолитические ферменты, гликозилфосфатидилинозит (GPI)-связанные белки или гистоны, члены суперсемейства белков/иммуноглобулинов EWI (*например*, PTGFRN, IGSF8 и/или IGSF3), белки-переносчики АТФ (*например*, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 и/или ATP2B4), SLC3A2, BSG или CD98hc). В определенных вариантах осуществления экзосома содержит по меньшей мере один полипептид, выбранный из таблицы 2.

[00108] В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит полипептиды на своей поверхности. В некоторых вариантах осуществления экзосома модифицирована, чтобы содержать один или более полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент модифицирована, чтобы содержать один или более полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент естественным образом содержит один или более полипептидов, и полученные из нее экзосомы также содержат полипептиды. Уровни любого желаемого поверхностного маркера могут быть изменены непосредственно на экзосоме (*например*, путем приведения комплекса в контакт с полипептидами, полученными рекомбинантным способом, чтобы вызвать вставку или конъюгирование с мембраной комплекса). Альтернативно или дополнительно уровни любого желаемого поверхностного маркера могут быть изменены непосредственно на клетке-продуценте (*например*, путем приведения комплекса в контакт с полипептидами, полученными рекомбинантным способом, чтобы вызвать вставку или конъюгирование с мембраной клетки). Альтернативно, клетка-продуцент может быть модифицирована путем трансдукции экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку-продуцент для экспрессии желаемого поверхностного маркера. Поверхностный маркер может уже естественным образом присутствовать в клетке-продуценте, и в этом случае экзогенная конструкция может привести к сверхэкспрессии маркера и повышению концентрации маркера в клетке-продуценте или на ней. Альтернативно, экспрессируемый естественным образом поверхностный маркер может быть удален из клетки-продуцента (*например*, путем индуцирования сайленсинга гена в клетке-продуценте). Полипептиды могут придавать экзосомам различные функциональные возможности (*например*, специфические способности нацеливания, функции доставки (*например*, молекулы слияния), ферментативные функции, увеличение или уменьшение периода полужизни *in vivo* и *m. n.*). В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают, без ограничений, CD47, CD55, CD49, CD40, CD133, CD59, глипикан-1, CD9, CD63, CD81, интегрины, селектины, лектины и кадгеринины.

[00109] В конкретных вариантах осуществления экзосомы содержат на своей поверхности один или более полипептидов, причем указанные полипептиды выбраны из группы белков, которые были недавно обнаружены в большом количестве на поверхности экзосом (подробно описано в совместной заявке на патент США 62/550,543 и PCT/US2018/048026, включенной в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте). Группа полипептидов включает регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN); базигин (BSG); член суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3); член суперсемейства иммуноглобулинов 8

(IGSF8); интегрин бета-1 (ITGB1), интегрин альфа-4 (ITGA4), тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2) и класс белков-переносчиков АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4)).

[00110] В различных вариантах осуществления один или более полипептидов на поверхности экзосомы содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены из природных источников или частично или полностью синтезированы. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из этих вариантов осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых других вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb и Fd. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент scFv или (scFv)₂. В некоторых других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Нанотело[®] (однодоменное антитело). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело. В различных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мезотелином.

[00111] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат на своей поверхности слитый белок, представляющий собой (1) белок PTGFRN или его фрагмент или (2) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PD-1, PD-1L, CSF1-R или другим иммуномодулирующим компонентом.

[00112] В некоторых вариантах осуществления мембрана экзосомы дополнительно содержит один или более полисахаридов, таких как гликан.

[00113] В некоторых вариантах осуществления экзосома доставляет к мишени полезную нагрузку (терапевтический агент). Полезная нагрузка представляет собой терапевтический агент, который действует на мишень (*например*, на клетку-мишень), контактирующую с экзосомой. В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой иммуномодулирующий компонент, *например* ингибирующую РНК. Контактное взаимодействие может происходить *in vitro* или в организме субъекта. Полезные нагрузки, которые могут быть введены в экзосому и/или клетку-продуцент, включают терапевтические агенты, такие как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие обнаруживаемый фрагмент или токсин, которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые имеют регуляторную функцию, такие как микроРНК, дцРНК, днкРНК или миРНК), аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие обнаруживаемый фрагмент или токсин, которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарства и токсины) и их комбинации. В определенных вариантах осуществления экзосома доставляет более одного терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления терапевтические агенты представляют собой одну или более нуклеиновых кислот, ингибирующих один или более генов-мишеней. В определенных вариантах осуществления терапевтические агенты содержат антитело и нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах осуществления терапевтические агенты содержат нуклеиновую кислоту и малую молекулу. В

определенных вариантах осуществления терапевтический агент содержит ингибитор CSF1R, такой как кандидаты для клинического применения пексидартиниб, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаб, AMG820, IMC-CS4 и другие, описанные, *например*, в публикациях Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53; *см. также, например*, Patel S, Player MR (2009). "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". *Curr Top Med Chem*. 9: 599–610, кабирализумаб (кабира; FPA-008) который представляет собой моноклональное антитело и проходит испытания в ранних клинических исследованиях метастатического рака поджелудочной железы (*см.* информацию об исследовании фазы I/II по изучению увеличения и расширения дозы кабирализумаба (кабира; FPA-008), антитела к CSF1R при теносиновиальной гигантоклеточной опухоли (TGCT, диффузный пигментный виллезнодулярный синовит D-PVNS; исследование применения кабирализумаба в виде монотерапии или вместе с ниволумабом при поздней стадии злокачественного новообразования или при распространенном злокачественном новообразовании; и публикацию Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer, ноябрь 2017). В определенных вариантах осуществления терапевтический агент содержит ингибитор контрольной точки иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки иммунного ответа представляет собой антитело, такое как, *например*, ипилимумаб, нацеленный на CTLA-4, ниволумаб, цемиплимаб и пембролизумаб, нацеленные на PD-1, и атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, каждый из которых нацелен на PD-L1

[00114] Экзосома может взаимодействовать с клеткой-мишенью посредством слияния мембран и доставлять полезные нагрузки (например, терапевтические агенты) в составе экзосомы на поверхность или в цитоплазму клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления происходит слияние мембран между экзосомой и плазматической мембраной клетки-мишени. В других вариантах осуществления происходит слияние мембран между экзосомой и эндосомальной мембраной клетки-мишени.

[00115] В некоторых вариантах осуществления экзосома содержит полипептид-приемник. Полипептид-приемник может быть синтетическим. В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник вводят в клетку-продуцент (*например*, вводят в клетку-продуцент экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид-приемник) или рекомбинантный полипептид-приемник производится за пределами клетки-продуцента (*например*, синтезируется системой экспрессии белка). В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник (*например*, полипептид, полученный рекомбинантным способом) вводят непосредственно в экзосому (*например*, после выделения экзосомы из клетки-продуцента). В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник может находиться на поверхности экзосом. В некоторых вариантах осуществления полипептид-приемник способен нацеливать экзосому на специфическую мишень (*например*, на такую мишень, как патогенный микроорганизм, метаболит, белок, полипептидный комплекс или клетка, такая как нефункциональная клетка или раковая клетка), которая циркулирует в системе кровообращения субъекта, например в крови, или на мишень, которая находится в ткани (такой как ткань, пораженная заболеванием).

[00116] В некоторых вариантах осуществления экзосома является синтетической. Иными словами, после извлечения из клетки-продуцента в экзосомы вносятся модификации для добавления дополнительных компонентов. Например, экзосома может содержать полезную нагрузку, такую как, *например*,

терапевтический полипептид, нуклеиновая кислота (например, ДНК или РНК) или другой полинуклеотид, полисахарид или гликан, липид или жирная кислота, большой биопрепарат, малая молекула или токсин, не обнаруживаемый в экзосомах после извлечения из клетки-продуцента. В некоторых вариантах осуществления экзосома модифицирована (*например*, путем введения полезной нагрузки или проведением модификации состава комплекса иным образом, например, путем изменения содержания белка, липидов или гликанов в мембране). Например, сначала экзосомы выделяют из клетки-продуцента, а затем по желанию модифицируют, тем самым создавая синтетические экзосомы. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент является модифицированной. Например, в клетку-продуцент может быть введена экзогенная нуклеиновая кислота, экзогенный полипептид, или малая молекула, или токсин. Альтернативно или дополнительно клетка-продуцент может быть модифицирована иным образом (*например*, путем модификации содержимого клетки или мембраны, например, путем изменения содержания в клеточной мембране липидов или гликанов). Экзосомы, полученные из модифицированных клеток-продуцентов, содержат одну или более модификаций клетки-продуцента. При помощи этого процесса получают синтетические экзосомы. В некоторых вариантах осуществления и клетку-продуцент и экзосому, выделенную из клетки-продуцента, модифицируют так, как описано в настоящем документе.

Нановезикула

[00117] В различных вариантах осуществления внеклеточная везикула является нановезикулой. В определенных вариантах осуществления нановезикула представляет собой полученную из клетки небольшую везикулу, содержащую мембрану, охватывающую внутреннее пространство, которая генерируется из клетки путем прямой или косвенной манипуляции таким образом, что нановезикула не будет произведена клеткой без указанной манипуляции. Подходящие манипуляции с клеткой включают, без ограничений, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации и в некоторых случаях могут приводить к разрушению клетки-продуцента.

[00118] В различных вариантах осуществления наибольший размер нановезикулы составляет приблизительно 20–250 нм, например, приблизительно 20–100 нм, 20–150 нм, 20–200 нм, 30–100 нм, 30–150 нм, 30–200 нм, 30–250 нм, 40–100 нм, 40–150 нм, 40–200 нм, 40–250 нм, 50–100 нм, 50–150 нм, 50–200 нм, 50–250 нм, 100–200 нм или 150–250 нм.

[00119] В различных вариантах осуществления нановезикула получена из клетки-продуцента. В определенных вариантах осуществления нановезикула генерируется из клетки-продуцента путем прямой или косвенной манипуляции. Подходящие манипуляции включают, без ограничений, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. В некоторых из этих вариантов осуществления манипуляция может привести к разрушению клетки-продуцента. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления популяция нановезикул по существу не содержит везикул, полученных из клеток-продуцентов путем прямого отщепления от плазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с плазматической мембраной.

[00120] В некоторых вариантах осуществления нановезикулу выделяют из клетки-продуцента на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В определенных вариантах осуществления выделение может быть достигнуто путем осаждения. Например, нановезикула может иметь

удельную плотность в диапазоне 0,5–2,0, 0,6–1,0, 0,7–1,0, 0,8–1,0, 0,9–1,0, 1,0–1,1, 1,1–1,2, 1,2–1,3, 1,4–1,5, 1,0–1,5, 1,5–2,0 и 1,0–2,0 кг/м³.

[00121] В различных вариантах осуществления нановезикула содержит липиды или жирные кислоты и полипептиды. В определенных вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит сахар. В определенных вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит приемник. В некоторых вариантах осуществления нановезикула дополнительно содержит полезную нагрузку. В некоторых из этих вариантов осуществления полезная нагрузка содержит нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации.

Иммуномодулирующий компонент

[00122] В одном аспекте внеклеточная везикула, например экзосома, содержит по меньшей мере один иммуномодулирующий компонент, который усиливает поляризацию макрофага с превращением фенотипа M2 в фенотип M1. В одном аспекте увеличение превращения фенотипа M2 в фенотип M1 оценивают по отношению к контрольному образцу, включающему популяцию макрофагов M2. В одном аспекте увеличение достигается с помощью внеклеточных везикул настоящего изобретения больше или равно увеличению, достигаемому эквивалентным количеством одного иммуномодулирующего компонента. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой полинуклеотид, который увеличивает поляризацию макрофагов. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой нуклеиновую кислоту, которая ингибирует по меньшей мере один ген, такой как, *например*, протоонкогены и другие типы генов, ингибирование которых увеличивает поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, включая, в качестве примера, но не ограничения, следующие гены: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназу, глутаминазу, СЕВР/β, Рi3Kγ и PKM2. В определенных вариантах осуществления рассматриваются комбинации полинуклеотидных и белковых иммуномодулирующих компонентов, включая белковые иммуномодулирующие компоненты, такие как, *например*, антитела или фрагменты антител, нацеленные на PD-1, PD-L1, CTLA-4 (такие как, *например*, ипилимумаб, нацеленный на CTLA-4, ниволумаб, цемплимаб и пембролизумаб, нацеленные на PD-1, и атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, каждый из которых нацелен на PD-L1), ингибиторы CSF1R (такие как, *например*, кандидаты для клинического применения пексидартиниб, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаб, AMG820 и IMC-CS4 и другие, описанные *например*, в публикации Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53; *см. также, например*, Patel S, Player MR (2009). "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". *Curr Top Med Chem*. 9: 599–610, кабирализумаб (кабира; FPA-008) который представляет собой моноклональное антитело и проходит испытания в ранних клинических исследованиях метастатического рака поджелудочной железы (*см.* информацию об исследовании фазы I/II по изучению увеличения и расширения дозы кабирализумаба (кабира; FPA-008), антитела к CSF1R при теносиновиальной гигантоклеточной опухоли (TGCT, диффузный пигментный виллезонодулярный синовит D-PVNS; исследование применения кабирализумаба в виде монотерапии или вместе с ниволумабом на поздней стадии

рака или при распространенном раке; и публикацию Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer, Nov 2017), и другие иммуномодулирующие компоненты, применяемые в лечении онкологических заболеваний и воспалительных состояний.

[00123] В некоторых из этих вариантов осуществления нуклеиновая кислота включает, без ограничений, мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловую РНК, мшРНК, днкРНК и дцДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНК (*например*, мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловую РНК, мшРНК или днкРНК). В некоторых из этих вариантов осуществления, когда полинуклеотид представляет собой мРНК, он может быть транслирован в желаемый полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой молекулу микроРНК (микро-РНК), перв-микроРНК или пре-микроРНК. В некоторых из этих вариантов осуществления микроРНК доставляется в цитоплазму клетки-мишени таким образом, что молекула микроРНК может вызвать сайленсинг нативной мРНК в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой малую интерферирующую РНК (миРНК) или малую шпилечную РНК (мшРНК), способную влиять на экспрессию онкогена или других дисрегуляторных полипептидов. В некоторых из этих вариантов осуществления миРНК доставляется в цитоплазму клетки-мишени таким образом, что молекула миРНК может вызвать сайленсинг нативной мРНК в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой антисмысловую РНК, являющуюся комплементарной мРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой длинную некодирующую РНК (днкРНК), способную регулировать экспрессию генов и модулировать заболевания. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO). В различных вариантах осуществления ASO представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, РНК или гибрид ДНК/РНК. *См.*, *например*, публикацию Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997, включенную в настоящий документ путем ссылки для всех целей.

[00124] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой ДНК, которая может быть транскрибирована в РНК. В некоторых из этих вариантов осуществления транскрибированная РНК может быть транслирована в желаемый полипептид. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота ингибирует по меньшей мере один ген из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, СЕВР/β, Рi3Kγ, глутаминазы и РКМ2. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота ингибирует по меньшей мере один ген из: STAT3, STAT6, СЕВР/β, Рi3Kγ, KRAS, и HIF1-альфа. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, которая ингибирует по меньшей мере один ген из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, СЕВР/β, Рi3Kγ, глутаминазы и РКМ2. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, которая ингибирует по меньшей мере один ген из: STAT3, STAT6, СЕВР/β, Рi3Kγ, KRAS и HIF1-альфа. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO), который ингибирует по меньшей мере один ген из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, СЕВР/β, Рi3Kγ, глутаминазы и РКМ2. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO), который ингибирует по

меньшей мере один ген из: STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS и HIF1-альфа. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота ингибирует человеческий протоонкоген KRAS. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, которая ингибирует человеческий протоонкоген KRAS. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота ингибирует STAT3.

[00125] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота представляет собой известный антисмысловый олигонуклеотид (ASO), примеры которого перечислены в таблице 0. В определенных вариантах осуществления ASO имеет последовательность, по меньшей мере на 90%–99% идентичную ASO, например тем, которые перечислены в таблице 0. В определенных вариантах осуществления ASO ингибирует STAT3. В различных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90%–99% идентичную TAAGCTGATAATTCAACTCA (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 91% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 92% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере 93% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 94% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 96% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ASO модифицирован с помощью химической структуры MOE, O-метил или LNA. В некоторых вариантах осуществления ASO дополнительно содержит холестериную метку на 5'- или 3'-конце.

[00126] В некотором варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO), который ингибирует STAT6. В различных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90%–99% идентичную TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 2). В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 91% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 92% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере 93% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 94% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 96% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по

[00131] В некотором варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO), который ингибирует Kras. В различных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90%–99% идентичную GTAGCATGTAAATATAGCCC (SEQ ID NO: 6). В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 91% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 92% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 93% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 94% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 96% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO содержит последовательность SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления ASO модифицирован с помощью химической структуры MOE, O-метил или LNA. В некоторых вариантах осуществления ASO дополнительно содержит холестеринную метку на 5'- или 3'-конце.

[00132] В определенных вариантах осуществления композиция содержит внеклеточную везикулу, например, экзосому, дополнительно содержащую дополнительный иммуномодулирующий компонент, который представляет собой малую молекулу, антитело или фрагмент антитела, который, как известно, способствует поляризации макрофагов. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R).

[00133] В определенных вариантах осуществления композиция содержит дополнительный иммуномодулирующий компонент, обладающий противоопухолевой активностью. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент регулирует врожденный иммунный ответ. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент нацелен на естественные клетки-киллеры. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент регулирует адаптивный иммунный ответ. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент нацелен на цитотоксические Т-клетки.

[00134] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент расположен на поверхности внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент расположен внутри внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент расположен и на поверхности и внутри внеклеточной везикулы.

[00135] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент экспрессируется в клетке-продуценте в полном размере. В других вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент экспрессируется в виде трансляционного белка слияния

с поверхностным белком экзосомы, что приводит к более высокому уровню экспрессии биологически активной части иммуномодулирующего соединения на поверхности экзосомы. В некоторых вариантах осуществления дополнительное иммуномодулирующее соединение представляет собой растворимый белок, который экспрессируется в виде трансляционного белка слияния с поверхностным белком экзосомы так, что указанный растворимый белок остается на поверхности экзосомы.

[00136] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки, такой как *например*, A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, TIM-3, VISTA, SIGLEC7 (CD328) и SIGLEC9 (CD329). В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор связывающего партнера отрицательного регулятора контрольной точки, *например*, PD-L1 и PD-L2.

[00137] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор цитотоксического белка 4, связанного с Т-лимфоцитами (CTLA-4). В некоторых из этих вариантов осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой моноклональное антитело к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против CTLA-4. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой ипилимумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой тремелимумаб.

[00138] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор белка запрограммированной гибели клетки 1 (PD-1). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор лиганда белка запрограммированной гибели 1 (PD-L1). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор лиганда белка запрограммированной гибели 2 (PD-L2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой моноклональное антитело к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к PD-1, PD-L1 или PD-L2. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой ниволумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой пембролизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой пидилизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой атезолизумаб. В некоторых конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой авелумаб.

[00139] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор гена активации лимфоцитов 3 (LAG3). В некоторых из этих вариантов осуществления ингибитор LAG3 представляет собой моноклональное антитело к LAG3, такое как, *например*, BMS-986016 (см. клиническое исследование номер NCT01968109 под названием «исследование безопасности антитела к LAG-3 в комбинации с антителом к PD-1 или без него в лечении солидных опухолей» на сайте ClinicalTrials.gov).

[00140] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТИМ-3). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор of V-доменный Ig-супрессор активации Т-клеток (VISTA). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор рецептора аденозина A2a (A2aR). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор иммуноглобулин-подобного рецептора клетки-киллера (KIR). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибитор CD20, CD39 или CD73.

[00141] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор положительной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы.

[00142] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор члена суперсемейства рецепторов TNF, такого как агонистическое антитело или природный лиганд или член суперсемейства рецепторов TNF. В определенных вариантах осуществления член суперсемейства рецепторов TNF выбран из группы, состоящей из: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептора Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептора TWEAK, TACI, рецептора BAFF, ATAR, CD271, CD269, GITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент является членом суперсемейства TNF. В определенных вариантах осуществления член суперсемейства TNF выбран из группы, состоящей из: TNF α , TNF-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганда 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганда GITR и EDA-2.

[00143] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор члена 4 суперсемейства рецепторов TNF (OX40). В некоторых из этих вариантов осуществления активатор OX40 представляет собой антитело-агонист к OX40. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор OX40 представляет собой лиганд OX40 (OX40L).

[00144] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD27. В некоторых из этих вариантов осуществления активатор CD27

представляет собой антитело-агонист к CD27. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор CD27 представляет собой лиганд CD27 (CD27L).

[00145] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD40. В некоторых из этих вариантов осуществления активатор CD40 представляет собой антитело-агонист к CD40. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор CD40 представляет собой лиганд CD40 (CD40L).

[00146] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор белка, связанного с глюкокортикоид-индуцированным TNFR (GITR). В некоторых из этих вариантов осуществления активатор GITR представляет собой антитело-агонист к GITR. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор GITR представляет собой природный лиганд GITR.

[00147] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор 4-1BB. В некоторых из этих вариантов осуществления активатор 4-1BB представляет собой антитело-агонист к 4-1BB. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор 4-1BB представляет собой природный лиганд 4-1BB.

[00148] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой Fas-рецептор (Fas). В некоторых из этих вариантов осуществления Fas-рецептор отображается на поверхности внеклеточной везикулы. В некоторых других вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой Fas-лиганд (FasL). В некоторых из этих вариантов осуществления Fas-лиганд отображается на поверхности внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело к Fas-рецептору. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело к Fas-лиганду.

[00149] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор костимулирующей молекулы суперсемейства CD28. В определенных вариантах осуществления костимулирующая молекула суперсемейства CD28 представляет собой ICOS или CD28. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ICOSL, CD80, или CD86.

[00150] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS). В некоторых из этих вариантов осуществления активатор ICOS представляет собой антитело-агонист к ICOS. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор ICOS представляет собой лиганд ICOS (ICOSL).

[00151] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD28. В некоторых из этих вариантов осуществления активатор CD28 представляет собой антитело-агонист к CD28. В некоторых других из этих вариантов осуществления активатор CD28 представляет собой природный лиганд CD28. В определенных вариантах осуществления лиганд CD28 представляет собой CD80.

[00152] В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой растворимый цитокин, который был трансляционно слит с поверхностным белком экзосомы или его

фрагментом. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-7. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-12. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-15.

[00153] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или его производное. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой α -цепь TCR или ее производное. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой β -цепь TCR или ее производное. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой корцептор Т-клетки или его производное.

[00154] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из: альфа-фетопротейна (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, связанного с меланомой антигена (MAGE), опухолевого белка p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганда белка запрограммированной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, IL-3, антигена рака яичка, MART-1 gp100 и связанного с TNF лиганда, индуцирующего апоптоз.

[00155] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой карциноэмбриональный антиген (CEA). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой эпителиальный опухолевый антиген (ETA).

[00156] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин. В некоторых из этих вариантов осуществления муцин представляет собой секретируемый муцин. В некоторых других из этих вариантов осуществления муцин представляет собой трансмембранный муцин. В конкретных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин 1 (MUC1). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой Tn-MUC1. В конкретных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой муцин 16 (MUC16).

[00157] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой связанный с меланомой антиген (MAGE). В некоторых из этих вариантов осуществления MAGE представляет собой MAGE типа I. В некоторых других из этих вариантов осуществления MAGE представляет собой MAGE типа II. В некоторых вариантах осуществления MAGE типа I представляет собой MAGE-A2. В некоторых вариантах осуществления MAGE типа I представляет собой MAGE-A4.

[00158] В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой альфа-фетопротейн (AFP). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой опухолевый белок p53 (p53). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой тирозиназу. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой белок, связанный с тирозиназой (TRP). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой лиганд белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1) или лиганд белка запрограммированной смерти

2 (PD-L2). В различных вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD4, CD8, CD45, CD80 и CD86.

[00159] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или его производное. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с одним или более из альфа-фетопротеина (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), муцина 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцина 16 (MUC16), тирозиназы, связанного с меланомой антигена (MAGE), опухолевого белка p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганда белка запрограммированной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелина, VEGFR, альфа-фолатного рецептора, CE7R, IL-3, антигена рака яичка, MART-1 gp100 и связанного с TNF лиганда, индуцирующего апоптоз.

[00160] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор Т-клеточного рецептора или корецептора. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD3. В определенных вариантах осуществления активатор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CD3. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CD3. В определенных вариантах осуществления активатор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против CD3. В определенных вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой активатор CD28. В определенных вариантах осуществления активатор представляет собой фрагмент моноклонального антитела к CD28. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb или Fd моноклонального антитела к CD28. В определенных вариантах осуществления активатор представляет собой нанотело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело против CD28.

[00161] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой главный комплекс гистосовместимости (МНС) или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса I или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса II или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой МНС класса III или его производное.

[00162] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-A, HLA-B HLA-C или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-E, HLA-F, HLA-G или его производное. В некоторых из этих вариантов осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR или его производное.

[00163] В различных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может представлять собой полипептид, полинуклеотид, полисахарид, липид, малую молекулу или токсин.

[00164] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может представлять собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

[00165] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист. В некоторых из этих вариантов осуществления агонист представляет собой эндогенный агонист, такой как гормон или нейромедиатор. В некоторых других из этих вариантов осуществления агонист представляет собой экзогенный агонист, такой как лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой физический агонист, который может создавать агонистический ответ без связывания с рецептором. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой суперагонист, который может вызывать больший максимальный ответ, чем эндогенный агонист. В определенных вариантах осуществления агонист представляет собой полный агонист с полной эффективностью в отношении рецептора. В некоторых других вариантах осуществления агонист представляет собой частичный агонист, имеющий только частичную эффективность в отношении рецептора по сравнению с полным агонистом. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой обратный агонист, который может ингибировать конститутивную активность рецептора. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой коагонист, который для того, чтобы оказывать влияние на рецептор, действует вместе с другими коагонистами. В определенных вариантах осуществления агонист является необратимым агонистом, который постоянно связывается с рецептором посредством образования ковалентной связи. В определенных вариантах осуществления агонист представляет собой селективный агонист для определенного типа рецептора.

[00166] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой антагонист. В некоторых из этих вариантов осуществления антагонист представляет собой конкурентный антагонист, который обратимо связывается с рецептором на том же участке связывания, что и эндогенный лиганд или агонист, без активации рецептора. Конкурентный антагонист может влиять на количество агониста, необходимое для достижения максимального ответа. В некоторых других из этих вариантов осуществления антагонист представляет собой неконкурентный антагонист, который связывается с активным участком рецептора или аллостерическим участком рецептора. Неконкурентный антагонист может уменьшать величину максимального ответа, которая может быть достигнута при любом количестве агониста. В некоторых других вариантах осуществления антагонист представляет собой неконкурентный антагонист, который перед связыванием с отдельным аллостерическим участком связывания требует активации рецептора агонистом.

[00167] В различных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Иммуномодулирующий компонент может представлять собой полноразмерный белок или его фрагмент. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены из природных источников или частично или полностью синтезированы. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из этих вариантов осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых других вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

фрагмент scFv или (scFv)₂. В некоторых других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Нанотело[®] (однодоменное антитело). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело.

[00168] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является химерным. В некоторых из этих вариантов осуществления химерное антитело имеет домены V-области не от человека, и домены C-области человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является не человеческим, например, мышинным или полученным от сельскохозяйственных и домашних животных.

[00169] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

[00170] В различных вариантах осуществления композиция содержит два или более вышеупомянутых иммуномодулирующих компонента, включая смеси, слияния, комбинации и конъюгаты атомов, молекул и *т. п.* В определенных вариантах осуществления композиция содержит а нуклеиновую кислоту, объединенную с полипептидом. В определенных вариантах осуществления композиция содержит два или более полипептидов, конъюгированных друг с другом. В определенных вариантах осуществления композиция содержит белок, конъюгированный с биологически активной молекулой. В некоторых из этих вариантов осуществления биологически активная молекула является пролекарством.

Фармацевтическая композиция

[00171] Фармацевтические композиции обычно содержат множество внеклеточных везикул и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество внеклеточных везикул. (*См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005).*) Фармацевтические композиции, как правило, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[00172] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и внеклеточную везикулу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы вводят совместно с одним или более отдельными терапевтическими агентами, причем совместное введение включает введение отдельного терапевтического агента перед, после или одновременно с введением внеклеточных везикул.

[00173] Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают вспомогательные вещества, которые по существу безопасны, нетоксичны и желательны, в том числе вспомогательные вещества, приемлемые для применения в ветеринарии, а также в медицинской фармацевтике у людей.

[00174] Примеры носителей или разбавителей включают, без ограничений, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Использование таких сред и соединений фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или соединения являются несовместимыми с внеклеточными везикулами, описанными в настоящем документе, предусматривается их применение в композициях. В эти композиции также могут быть включены дополнительные терапевтические агенты. Как правило, фармацевтическая композиция составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем ее введения. Внеклеточные везикулы могут вводиться парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, внутримышечным путем или в виде ингаляций. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят внутривенно, *например* с помощью инъекции. Внеклеточные везикулы можно необязательно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении заболевания, расстройства или состояния, для лечения которых предназначены внеклеточные везикулы.

[00175] Растворы или суспензии могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многоразовые флаконы из стекла или пластмассы.

[00176] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Обычно композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, что она должна легко выходить из шприца. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, *например*, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, *например*, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов можно выполнять посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. При желании в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например* сахара, многоатомные спирты, такие как манит, сорбит и

хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например* моностеарата алюминия и желатина.

[00177] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения внеклеточных везикул в эффективном количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения внеклеточных везикул, описанных в настоящем документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка активного ингредиента вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. Внеклеточные везикулы можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить длительное или пульсирующее высвобождение внеклеточных везикул.

[00178] Системное введение композиций, содержащих внеклеточные везикулы, также может осуществляться через слизистые оболочки. Для введения через слизистую оболочку в составе используются пенетранты, подходящие для барьера, через который необходимо проникнуть. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники, и включают в себя, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Введение через слизистую может быть осуществлено с помощью использования, *например*, назальных спреев.

[00179] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят внутривенно субъекту, который может получить пользу от введения фармацевтической композиции. В некоторых других вариантах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, *например*, посредством инъекции в лимфатический сосуд или инъекции в лимфоузел (см., *например*, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)), или с помощью внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[00180] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, вводят в виде жидкой суспензии. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде препарата, который после введения способен образовывать депо. В определенных предпочтительных вариантах осуществления депо медленно высвобождает внеклеточные везикулы в циркуляцию или они остаются в форме депо.

[00181] Как правило, фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, не содержат загрязняющих веществ, являются биосовместимыми и нетоксичными и подходят для введения субъекту. Если в состав носителя входит вода, эта вода является высокоочищенной и обработанной для удаления загрязнений, *например* эндотоксинов.

[00182] Фармацевтически приемлемым носителем может быть, среди прочего, лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмал, арабийская камедь, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, целлюлоза, вода, сироп, метилцеллюлоза, метилгидроксibenзоат пропиленгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное

масло. Фармацевтическая композиция может дополнительно включать смазывающее вещество, смачивающий агент, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент, суспендирующий агент и/или консервант.

[00183] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточные везикулы, описанные в настоящем документе, и, необязательно, фармацевтически активный или терапевтический агент. Терапевтическим агентом может быть биологический агент, агент в виде малой молекулы или агент в виде нуклеиновой кислоты.

[00184] Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточные везикулы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенного введения.

[00185] В определенных вариантах осуществления для разрушения остаточных способных к репликации нуклеиновых кислот препарат внеклеточных везикул подвергают воздействию облучения, *например* воздействию рентгеновских лучей, гамма-лучей, бета-частиц, альфа-частиц, нейтронов, протонов, элементарных ядер, УФ-лучей.

[00186] В определенных вариантах осуществления препарат внеклеточных везикул подвергают воздействию гамма-облучения с использованием дозы облучения более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 кГр.

[00187] В определенных вариантах осуществления препарат внеклеточных везикул подвергают воздействию рентгеновского излучения с использованием дозы облучения более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более 10000 мЗв.

Способы

[00188] Аспекты настоящего изобретения также включают способы получения композиции, содержащей внеклеточную везикулу и иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления способ включает: получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента, причем клетка-продуцент естественным образом содержит иммуномодулирующий компонент; и, необязательно, выделение полученной внеклеточной везикулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает: модификацию клетки-продуцента с помощью иммуномодулирующего компонента; получение внеклеточной везикулы из модифицированной клетки-продуцента; и, необязательно, выделение полученных внеклеточных везикул. В некоторых других вариантах осуществления способ включает: получение внеклеточной везикулы из клетки-продуцента; выделение полученных внеклеточных везикул; и модификацию выделенной внеклеточной везикулы с помощью иммуномодулирующего компонента. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение выделенных внеклеточных везикул в состав фармацевтической композиции.

Способы модификации клетки-продуцента с помощью иммуномодулирующего компонента

[00189] В различных вариантах осуществления способ включает модификацию клетки-продуцента с помощью иммуномодулирующего компонента.

[00190] Клеткой-продуцентом может быть клеточная линия млекопитающих, клеточная линия растений, клеточная линия насекомых, клеточная линия грибов или прокариотическая клеточная линия. В определенных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой клеточную линию млекопитающих. Клеточные линии млекопитающих включают, без ограничений, клеточную линию почек эмбриона человека (НЕК), клеточную линию яичника китайского хомячка (СНО), клеточную линию НТ-1080, клеточную линию HeLa, клеточную линию PERC-6, клеточную линию CEVEC, клеточную линию фибробластов, клеточную линию амниоцитов, клеточную линию клеток эпителия и клеточную линию мезенхимальных стволовых клеток (MSC). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клеточная линия млекопитающих может представлять собой клетки НЕК-293, клетки фибробластов крайней плоти человека ВJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки или клетки RPTEC/TERT1. Клетка-продуцент также может представлять собой первичную клетку. В различных вариантах осуществления первичная клетка может быть первичной клеткой млекопитающего, первичной растительной клеткой, первичной клеткой насекомого, первичной клеткой грибов или первичной прокариотической клеткой.

[00191] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетка-продуцент представляет собой иммунную клетку, такую как дендритная клетка, Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер (NK-клетка), антигенпрезентирующая клетка, макрофага, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (Трег-клетка).

[00192] В различных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть экспрессирован в клетке-продуценте из трансгена или мРНК, введенной в клетку-продуцент путем трансфекции (см., например, Bacchetti S, Graham FL (April 1977). "Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (4): 1590–4; Kriegler M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. W. H. Freeman. pp. 96–97; Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (November 1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7413–7; Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (January 1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations". *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (4): 2550–61), вирусной трансдукции (см., например, Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000). "Transduction". *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.)), электропорации (см., например, Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; Hofschneider, PH (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields". *The EMBO Journal*. 1 (7): 841–5)), экструзии (см., например, Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson

DG, Langer R, Jensen KF (February 2013). "A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (6): 2082–7), обработки ультразвуком (см., например, Yizhi Song (2007). "Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria". *Nucleic Acids Res.* 35 (19): e129.), слияния клеток (см., например, Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (November 1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7413–), или с помощью других способов, известных специалистам в данной области.

[00193] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством трансфекции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть введен в подходящие клетки-продуценты с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Papapetrou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). В некоторых вариантах осуществления катионные липиды образуют комплексы с иммуномодулирующим компонентом посредством зарядовых взаимодействий. В некоторых из этих вариантов осуществления положительно заряженные комплексы связываются с отрицательно заряженной поверхностью клетки и поглощаются клеткой посредством эндоцитоза. В некоторых других вариантах осуществления для трансфекции клеток-продуцентов может быть использован катионный полимер. В некоторых из этих вариантов осуществления катионный полимер представляет собой полиэтиленимин (PEI). В определенных вариантах осуществления для введения иммуномодулирующего компонента в клетки-продуценты могут быть использованы химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен. Иммуномодулирующий компонент также может быть введен в клетку-продуцент с использованием физического метода, такого как трансфекция, опосредованная частицами, «генная пушка», биолистика или технология бомбардировки частицами (Papapetrou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). Для оценки эффективности трансфекции клетки-продуцента можно использовать репортерный ген, такой как, например, бета-галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок.

[00194] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством вирусной трансдукции. В качестве носителей для переноса генов можно использовать ряд вирусов, включая вирус мышинного лейкоза (MMLV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус простого герпеса (HSV), лентивирусы и спумавирусы. Опосредованные вирусами носители для переноса генов содержат векторы на основе ДНК-вирусов, таких как аденовирус, аденоассоциированный вирус и вирус герпеса, а также векторы на основе ретровирусов.

[00195] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством электропорации. Электропорация создает переходные поры в клеточной мембране, что позволяет вводить в клетку различные молекулы. В некоторых вариантах осуществления ДНК и РНК, а также полипептиды и неполипептидные терапевтические агенты могут быть введены в клетку-продуцент посредством электропорации.

[00196] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления для введения

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

[00197] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством экструзии.

[00198] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления клетку-продуцент подвергают воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение клеточной мембраны, что позволяет загружать иммуномодулирующий компонент.

[00199] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством слияния клеток. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством электрослияния клеток. В некоторых других вариантах осуществления для слияния клеток-продуцентов используют полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых других вариантах осуществления для слияния клеток-продуцентов используют вирус Сендай.

[00200] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством гипотонического лизиса. В некоторых из этих вариантов осуществления клетка-продуцент подвергается воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать иммуномодулирующий компонент. В некоторых альтернативных вариантах осуществления для набухания клетки-продуцента и для создания пор в мембране клетки-продуцента используется контролируемый диализ против гипотонического раствора. Затем клетка-продуцент подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[00201] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством обработки детергентом. В некоторых вариантах осуществления клетку-продуцент обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану клетки-продуцента, создавая поры, позволяющие загружать иммуномодулирующий компонент. После загрузки клеток-продуцентов детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[00202] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных вариантах осуществления клетки-продуценты имеют поверхностный рецептор, который при связывании с иммуномодулирующим компонентом вызывает интернализацию рецептора и связанного иммуномодулирующего компонента.

[00203] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят в клетку-продуцент посредством фильтрации. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты и иммуномодулирующий компонент могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у клетки-продуцента, что вызывает временное разрушение мембраны клетки-продуцента и позволяет иммуномодулирующему компоненту проникать в клетку-продуцент.

[00204] В некоторых вариантах осуществления клетку-продуцент подвергают нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению клеточной мембраны и позволяет загружать иммуномодулирующий компонент.

Способы модификации внеклеточной везикулы с помощью иммуномодулирующего компонента

[00205] В различных альтернативных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят непосредственно во внеклеточные везикулы после выделения внеклеточных везикул.

[00206] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством трансфекции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть введен во внеклеточные везикулы с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Parapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В определенных вариантах осуществления для введения иммуномодулирующего компонента во внеклеточные везикулы могут быть использованы химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен.

[00207] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством электропорации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергают воздействию электрического поля, которое вызывает появление временных отверстий в мембране внеклеточной везикулы, что позволяет загружать иммуномодулирующий компонент.

[00208] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления для введения иммуномодулирующего компонента во внеклеточную везикулу на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

[00209] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством экструзии.

[00210] В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергают воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение мембраны внеклеточной везикулы, что позволяет загружать иммуномодулирующий компонент.

[00211] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент может быть конъюгирован с поверхностью внеклеточной везикулы. Конъюгирование может быть достигнуто химическим или ферментативным способами, известными в данной области.

[00212] В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула содержит химически конъюгированный иммуномодулирующий компонент. Химическое конъюгирование может быть осуществлено путем ковалентного связывания иммуномодулирующего компонента с другой молекулой с использованием или без использования линкера. Образование таких конъюгатов известно специалистам в данной области техники, и также им известны различные способы осуществления конъюгации, причем выбор конкретной методики зависит от материалов, которые должны быть конъюгированы. В определенных вариантах осуществления полипептиды конъюгированы с внеклеточной везикулой. В некоторых других вариантах осуществления с внеклеточной везикулой конъюгированы не-полипептиды, такие как липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и малые молекулы.

[00213] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством гипотонического лизиса. В некоторых из этих вариантов осуществления внеклеточные везикулы подвергают воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать иммуномодулирующий компонент. В некоторых альтернативных вариантах осуществления для набухания внеклеточной везикулы и для создания пор в мембране внеклеточной везикулы используется контролируемый диализ против гипотонического раствора. Затем внеклеточную везикулу подвергают воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[00214] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством обработки детергентом. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану внеклеточной везикулы, создавая поры, позволяющие загружать иммуномодулирующий компонент. После загрузки внеклеточных везикул детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[00215] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных вариантах осуществления внеклеточные везикулы имеют поверхностный рецептор, который при связывании с иммуномодулирующим компонентом вызывает интернализацию рецептора и связанного иммуномодулирующего компонента.

[00216] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством механического воздействия. В определенных вариантах осуществления внеклеточные везикулы могут подвергаться бомбардировке иммуномодулирующим компонентом, прикрепленным к тяжелой или заряженной частице, такой как золотые микроносители. В некоторых из этих вариантов осуществления частица может быть механически или электрически ускорена таким образом, что она проходит через мембрану внеклеточной везикулы.

[00217] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент вводят во внеклеточную везикулу посредством фильтрации. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы и иммуномодулирующий компонент могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у внеклеточной везикулы, что вызывает временное разрушение мембраны внеклеточной везикулы и позволяет иммуномодулирующему компоненту проникать во внеклеточную везикулу.

[00218] В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы подвергают нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению мембраны внеклеточной везикулы и позволяет загружать иммуномодулирующий компонент.

Способы выделения внеклеточных везикул

[00219] Внеклеточные везикулы могут быть выделены из клеток-продуцентов. В определенных вариантах осуществления внеклеточная везикула высвобождается клеткой-продуцентом в среду для культивирования клеток. Предполагается, что все известные способы выделения внеклеточных везикул считаются подходящими для использования в настоящем изобретении. Например, для выделения внеклеточных везикул

из среды или другого исходного материала могут быть использованы их физические свойства, включая разделение на основе электрического заряда (*например*, электрофоретическое разделение), размера (*например*, фильтрация, молекулярное просеивание и т. п.), плотности (*например*, обычное или градиентное центрифугирование), постоянной Сведберга (*например*, осаждение с применением внешней силы или без нее и т. п.) Альтернативно или дополнительно выделение может быть проведено на основании одного или более биологических свойств и включать способы, в которых могут использоваться поверхностные маркеры (*например*, для осаждения, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания с лигандом, неспецифического связывания с лигандом, путем аффинной очистки и т. п.).

[00220] Выделение и обогащение могут быть выполнены обычным и неселективным способом, обычно включая последовательное центрифугирование. Альтернативно, выделение и обогащение могут быть выполнены более специфичным и селективным способом, таким как использование поверхностных маркеров, специфичных для внеклеточных везикул или клеток-продуцентов. Например, специфические поверхностные маркеры могут быть использованы при иммунопреципитации, сортировке FACS, аффинной очистке и магнитном разделении с лигандами, связанными с гранулами.

[00221] В некоторых вариантах осуществления для выделения внеклеточных везикул можно использовать эксклюзионную хроматографию. Методы эксклюзионной хроматографии известны в данной области. Примеры неограничивающих методик предоставлены в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления выделяют фракцию пустотного объема, которая содержит представляющие интерес внеклеточные везикулы. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения с использованием методов центрифугирования (одна или более хроматографических фракций), как это по сути известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления для дополнительного выделения внеклеточных везикул проводят, например, центрифугирование в градиенте плотности. В определенных вариантах осуществления может быть желательным дополнительно отделить внеклеточные везикулы, полученные из клеток-продуцентов, от другого источника внеклеточных везикул. Например, внеклеточные везикулы, полученные из клетки-продуцента, могут быть отделены от внеклеточных везикул, полученных не из клеток-продуцентов, путем захвата на иммуносорбенте с использованием антигена и антитела, специфичного для клетки-продуцента.

[00222] В некоторых вариантах осуществления выделение внеклеточных везикул может включать комбинации методов, которые включают, без ограничений, дифференциальное центрифугирование, мембранную фильтрацию на основе размеров, иммунопреципитацию, сортировку FACS и магнитное разделение.

Методы измерения размера внеклеточных везикул

[00223] В некоторых вариантах осуществления методы, описанные в настоящем документе, включают измерение размера внеклеточных везикул и/или популяций внеклеточных везикул. Обычно размер внеклеточной везикулы определяется как наибольший измеримый размер. Как правило, наибольший измеримый размер внеклеточной везикулы также называют ее диаметром.

[00224] Размер внеклеточной везикулы может быть измерен с использованием динамического рассеяния света (DLS) и/или многоугольного рассеяния света (MALS). Методы использования DLS и/или MALS для измерения размера внеклеточной везикулы известны специалистам в данной области и включают анализ отслеживания наночастиц (NTA, *например*, с использованием устройства отслеживания наночастиц Malvern NanoSight NS300). В конкретном варианте осуществления размер внеклеточной везикулы определяют с использованием устройства Malvern NanoSight NS300. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) имеют наибольший размер приблизительно 20–300 нм. В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) имеют наибольший размер приблизительно 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью NTA (*например*, с использованием устройства Malvern NanoSight NS300) около 40–200 нм.

[00225] Размер внеклеточной везикулы можно измерить с помощью анализа гармонических колебаний сопротивления с регулируемым размером пор (TRPS). В конкретном варианте осуществления размер внеклеточной везикулы, измеренный с помощью TRPS, определяют с использованием устройства iZON qNANO Gold. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold), около 20–300 нм. В других вариантах осуществления внеклеточные везикулы, описанные в данном документе, имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold), около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по

одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений по результатам измерения с помощью TRPS (*например*, с использованием устройства iZON qNano Gold) около 40–200 нм.

[00226] Размер внеклеточных везикул можно измерить с помощью электронной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления метод электронной микроскопии, используемый для измерения размера внеклеточной везикулы, представляет собой просвечивающую электронную микроскопию. В конкретном варианте осуществления для измерения размера внеклеточной везикулы используется просвечивающий электронный микроскоп Tescnai™ G² Spirit BioTWIN. Способы измерения размера внеклеточной везикулы с использованием электронного микроскопа хорошо известны специалистам в данной области техники, и для измерения размера внеклеточной везикулы может быть подходящим любой такой способ. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе внеклеточные везикулы имеют наибольший размер, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tescnai™ G² Spirit BioTWIN), около 20–300 нм. В других вариантах осуществления описанные в данном документе внеклеточные везикулы имеют наибольший размер, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tescnai™ G² Spirit BioTWIN), около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tescnai™ G² Spirit BioTWIN), около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tescnai™ G² Spirit BioTWIN), около 20–300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Tescnai™ G² Spirit BioTWIN), около 20–

300 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 90% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Теснаі™ G² Spirit BioTWIN), около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 95% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Теснаі™ G² Spirit BioTWIN), около 40–200 нм. В других вариантах осуществления популяции внеклеточных везикул, описанные в данном документе, включают популяцию, в которой 99% внеклеточных везикул имеют наибольший размер по одному из измерений, измеренный сканирующим электронным микроскопом (*например*, сканирующим электронным микроскопом Теснаі™ G² Spirit BioTWIN), около 40–200 нм.

Способы определения поляризации макрофагов

[00227] В настоящем документе раскрыты способы и композиции для увеличения поляризации макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 с использованием внеклеточной везикулы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, ингибирующих экспрессию гена-мишени макрофага. Композиции преимущественно поглощаются макрофагами (по сравнению с клетками других типов, такими как Т-клетки, В-клетки, макрофаги или дендритные клетки) и являются настолько же или более эффективными в увеличении поляризации макрофагов, чем эквивалентное количество только иммуномодулирующего компонента. Способы определения поляризации макрофагов, включая обнаружение фенотипов M2 и M1 макрофагов, могут быть осуществлены любым способом определения фенотипов M2 и M1, известным в данной области. Срезы тканей (*например*, из биоптатов опухолей), образцы крови и т. п. можно анализировать (*например*, окрашивать) на наличие маркеров пан-макрофагов, а также макрофагов M2 и M1, включая, без ограничений, маркеры клеточной поверхности M2 (*например*, YM1, FIZZ1, дектин-1, MGL), M2-ассоциированные цитокины (*например*, IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24), M1-ассоциированные цитокины (*например*, INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 и CXCL11), факторы роста (*например*, VEGF-A, VEGF-C, EGF и TGF-β), ферменты (*например*, матриксные металлопротеиназы MMP2, MMP9, цистеиновые катепсиновые протеазы); M2-ассоциированные микроРНК (*например*, микроРНК146а, микроРНК let 7b, и miR-223) и/или M1-ассоциированные микроРНК (*например*, микроРНК155, miR-33). *См., например*, Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. Макрофаги и/или компоненты макрофагов, секрецию или активность макрофагов в образцах (*см., например*, Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Randolph, G. J. (2007). Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity, *Nature Immunology* 13(11), 1118–1128) можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии, иммуноблоттинга, количественной ПЦР или любого другого метода, известного в данной области для обнаружения клеток или клеточных продуктов в биологических образцах.

[00228] В данном документе также предложены способы лечения онкологического заболевания у субъекта.

[00229] В различных вариантах осуществления композицию внеклеточных везикул, например экзосом, содержащую один или более иммуномодулирующих компонентов, которые ингибируют по меньшей мере один ген и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, вводят субъекту с онкологическим заболеванием. В некоторых из этих вариантов осуществления композиция может усиливать иммунный ответ и может усиливать нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта. В некоторых аспектах повышенная поляризация макрофагов с превращением из фенотипа M2 в M1 *сама по себе* усиливает иммунный ответ субъекта и усиливает нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта. Некоторые авторы упоминают активацию подтипа M2d в ответ на IL-6 и аденозины, и эти макрофаги также называются опухолеассоциированными макрофагами (TAM). *См., например, Rószter, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. Mediators of Inflammation, 2015, 1–16; Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. Immunology, 154(2), 186–195; и Q. Wang, H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang, and Y. Wang, "Fra-1 protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages," Cell Research, vol. 20, no. 6, pp. 701–712, 2010.* Опухолеассоциированные макрофаги (TAM) типичны в своих проопухолевых функциях, таких как стимуляция подвижности раковых клеток, образование метастазов и ангиогенез, и при этом образование TAM зависит от факторов микроокружения, присутствующих в развивающейся опухоли. TAM продуцируют иммуносупрессивные цитокины, такие как IL-10, TGF β , PGE2 и очень небольшое количество NO или ROI и низкие уровни воспалительных цитокинов (IL-12, IL-1 β , TNF α , IL-6). Способность TAM презентировать опухолеассоциированные антигены снижается, как и стимуляция противоопухолевых функций T- и NK-клеток. Также TAM не способны лизировать опухолевые клетки. https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 Нацеливание на TAM может обеспечить новую терапевтическую стратегию против онкологического заболевания, что было продемонстрировано посредством доставки агентов для изменения набора и распределения TAM, истощения существующих TAM или индукции повторного обучения TAM с превращением из фенотипа M2 в фенотип M1. *См., например, Lewis, Claire E., and Jeffrey W. Pollard. "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." Cancer research 66.2 (2006): 605-612; Sica, Antonio, et al. "Macrophage polarization in tumour progression." Seminars in Cancer Biology. Vol. 18. No. 5. Academic Press, 2008; Sica, Antonio, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):762-7; Cuccarese, Michael F.; Dubach, J. Matthew; Pflirschke, Christina; Engblom, Camilla; Garris, Christopher; Miller, Miles A.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2017-02-08). "Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging". Nature Communications. 8: 14293; Zeisberger, S M; Odermatt, B; Marty, C; Zehnder-Fjällman, A H M; Ballmer-Hofer, K; Schwendener, R A (2006-07-11). "Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach". British Journal of Cancer. 95 (3): 272–281; Rodell, Christopher B.; Arlauckas, Sean P.; Cuccarese, Michael F.; Garris, Christopher S.; Li, Ran; Ahmed, Maaz S.; Kohler, Rainer H.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2018-05-21). "TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy".*

Nature Biomedical Engineering; Guerriero, Jennifer L.; Sotayo, Alaba; Ponichtera, Holly E.; Castrillon, Jessica A.; Pourzia, Alexandra L.; Schad, Sara; Johnson, Shawn F.; Carrasco, Ruben D.; Lazo, Suzan (March 2017). "Class II HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages". Nature. 543 (7645): 428–432.

[00230] В некоторых вариантах осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или представляет собой так называемые «горячие опухоли» или «воспалительные опухоли». В некоторых вариантах осуществления онкологическое заболевание, подлежащее лечению, характеризуется низкими или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли или представляет собой так называемые «холодные опухоли» или «невоспалительные опухоли». В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в количестве и в течение времени, достаточных для превращения «холодной опухоли» в «горячую опухоль», *т. е.* указанное введение приводит к инфильтрации лейкоцитов (таких как Т-клетки) в микроокружение опухоли.

[00231] В некоторых вариантах осуществления композиции содержат внеклеточную везикулу и комбинацию из более одного иммуномодулирующего компонента, включая компонент, который стимулирует поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1, и компонент, который дополнительно усиливает иммунный ответ, такой как ингибитор блокирования контрольной точки, *например* ипилимумаб, нацеленный на CTLA-4, ниволумаб, цемиплимаб и пембролизумаб, нацеленные на PD-1, и атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, каждый из которых нацелен на PD-L1, и ингибиторы CSFR-1, такие как пексидартиниб, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаб, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаб. Введение этих композиций в качестве средств для лечения субъектов с онкологическим заболеванием может дополнительно усиливать иммунный ответ и усиливать нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта посредством комбинированного действия иммуномодулирующих компонентов.

[00232] В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или активный фрагмент, нацеленный на CTLA-4, PD-1, PD-L1 или CSF1-R. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR ипилимумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR ниволумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR цемиплимаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR пембролизумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR атезолизумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR авелумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR дурвалумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR пексидартиниба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR PLX7486. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR ARRAY-382. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR JNJ-40346527. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR BLZ945. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR эмактузумаба. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR AMG820. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR IMC-CS4. В вариантах осуществления антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны CDR кабирализумаба.

[00233] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую внеклеточную везикулу и иммуномодулирующий компонент, вводят субъекту в качестве противораковой вакцины. В некоторых из этих вариантов осуществления композицию вводят субъекту в качестве индивидуализированной противораковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий компонент представляет собой опухолевый антиген или пептид, полученный из опухолевого антигена. Примеры подходящих опухолевых антигенов включают: альфа-фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), муцин 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцин 16 (MUC16), тирозиназу, связанный с меланомой антиген (MAGE), опухолевый белок p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганд белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганд белка запрограммированной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелин, VEGFR, альфа-фолатный рецептор, CE7R, IL-3, антиген рака яичка, MART-1 gp100 и связанный с TNF лиганд, индуцирующий апоптоз. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген получен из эталонной геномной последовательности. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген получен из геномной последовательности субъекта, получающего композицию.

[00234] Онкологические заболевания, которые можно лечить композицией, включают, без ограничений, онкологические заболевания, перечисленные в таблице 5.

Способы модулирования экспрессии генов, транскрипционные сети и поляризация в макрофагах

[00235] В некоторых вариантах осуществления предложены способы модулирования экспрессии генов в макрофаге, включающие введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, причем иммуномодулирующий компонент нацелен на ген, и при этом модуляция равна модуляции, вызванной введением эквимольного количества свободного

иммуномодулирующего компонента, нацеленного на ген, или превышает ее. Также предложены способы ингибирования экспрессии генов в макрофаге, включающие введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, причем иммуномодулирующий компонент нацелен на ген, и при этом ингибирование равно ингибированию, вызванному введением эквимольного количества свободного иммуномодулирующего компонента, нацеленного на ген, или превышает его. В некоторых вариантах осуществления предложены способы подавления нижестоящей мишени гена в макрофаге, включающие введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, причем иммуномодулирующий компонент нацелен на ген, и при этом подавление равно подавлению, вызванному введением эквимольного количества свободного иммуномодулирующего компонента, нацеленного на ген, или превышает его. В некоторых вариантах осуществления предложены способы изменения поляризации популяции макрофагов, включающие введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, причем иммуномодулирующий компонент нацелен на ген, и при этом изменение поляризации равно изменению поляризации, вызванному введением эквимольного количества свободного иммуномодулирующего компонента, нацеленного на ген, или превышает его. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная везикула представляет собой экзосому. В некоторых вариантах осуществления дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой ASO. В некоторых вариантах осуществления изменение поляризации представляет собой изменение фенотипа с M2 на M1.

Способы лечения состояний фиброза

[00236] В данном документе также предложены способы лечения состояния фиброза у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества композиции, которая содержит экзосомы, содержащие иммуномодулирующий компонент, который реполяризует макрофаги с превращением фенотипа M2 в фенотип M1. В некоторых вариантах осуществления состояние фиброза представляет собой фиброз легких, фиброз печени или фиброз поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления фиброз печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит или НАСГ. *См., например,* Mayo Clinic Staff. "Definition [of pulmonary fibrosis]". Фонд медицинского образования и исследований клиники Майо. Архивировано из оригинала 15 июля 2014 г. Получено 26 июля 2014 г., доступно в сети Интернет по адресу webmayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690; Ferri FF. Idiopathic pulmonary fibrosis. In: Ferri's *Clinical Advisor* 2016. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2016; Gross TJ, Hunninghake GW (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis". *N Engl J Med.* 345 (7): 517–525; Friedman LS (2014). *Current medical diagnosis and treatment* 2014. [S.l.]: McGraw-Hill. pp. Chapter 16. Liver, Biliary Tract, & Pancreas Disorders; Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ (январь 2018). "The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases". *Hepatology.* 67 (1): 328–357; Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, Habtezion A. *Nat Commun.* 2015 May 18;6:7158.

Способы применения

[00237] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию растворяют в подходящей жидкости и вводят в вену субъекта.

[00238] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию растворяют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[00239] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту интратекально. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят посредством инъекции в спинномозговой канал или в субарахноидальное пространство, чтобы она попала в спинномозговую жидкость (СМЖ).

[00240] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту интраназально. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть инсуффлирована через нос в форме либо для местного введения, либо для системного введения. В определенных вариантах осуществления композицию вводят в виде назального спрея.

[00241] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления композицию растворяют в подходящей жидкости и вводят в виде инъекции в брюшину субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанное внутрибрюшинное введение приводит к распространению композиции (*например*, внеклеточных везикул в композиции) в лимфатические сосуды. В некоторых вариантах осуществления указанное внутрибрюшинное введение приводит к распространению композиции (*например*, внеклеточных везикул в композиции) в тимус, селезенку и/или костный мозг. В некоторых вариантах осуществления указанное внутрибрюшинное введение приводит к распределению композиции (*например*, внеклеточных везикул в композиции) в один или более лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления указанное внутрибрюшинное введение приводит к распределению композиции (*например*, внеклеточных везикул в композиции) в один или более из шейного лимфатического узла, пахового лимфатического узла, средостенного лимфатического узла или грудного лимфатического узла. В некоторых вариантах осуществления указанное внутрибрюшинное введение приводит к распространению композиции (*например*, внеклеточных везикул в композиции) в поджелудочную железу.

[00242] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту периокулярно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственных препаратов включает субконъюнктивальный, передний субтеноновый, задний субтеноновый и ретробульбарный пути введения.

[00243] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят одному и тому же субъекту множеством путей введения. В некоторых вариантах осуществления указанное множество путей введения включает внутривенное введение, внутриартериальное введение, интратекальное введение, интраназальное введение, внутрибрюшинное введение и/или периокулярное введение. В предпочтительном варианте осуществления указанное множество путей введения включает внутривенное введение и внутрибрюшинное введение.

[00244] В определенных вариантах осуществления доза внеклеточных везикул составляет от 1 нг до 10 нг, от 10 нг до 100 нг, от 100 нг до 1 мкг, от 1 мкг до 5 мкг, от 5 мкг до 10 мкг, от 10 мкг до 50 мкг, от 50 мкг до 75 мкг, от 75 мкг до 100 мкг, от 100 мкг до 150 мкг, от 150 мкг до 200 мкг, от 200 мкг до 300 мкг, от 300 мкг до 500 мкг, от 500 мкг до 1 мг или от 1 мг до 10 мг.

[00245] Композиции могут быть введены субъекту один раз. Альтернативно, за некоторый период времени может быть выполнено множество введений. Например, субъекту могут выполнить два, три, четыре, пять или больше введений. В некоторых вариантах осуществления введение могут выполнять по необходимости, *например* до тех пор, пока сохраняются симптомы, связанные с заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления повторные введения могут быть показаны субъекту пожизненно. Периоды лечения могут варьироваться и могут длиться, *например*, не более года, шести месяцев, трех месяцев, двух месяцев, одного месяца, двух недель, одной недели, трех дней, двух дней или не более одного дня.

[00246] В определенных вариантах осуществления дозы внеклеточных везикул вводят с такими интервалами, как один раз в сутки, через день, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в месяц или два раза в месяц.

[00247] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят с частотой, достаточной для эффективного увеличения концентрации иммуномодулирующего компонента в клетке-мишени или ткани-мишени выше уровня, связанного с симптомом заболевания, расстройства или состояния.

[00248] В некоторых вариантах осуществления в течение периода лечения композиции вводят по меньшей мере дважды таким образом, что происходит лечение расстройства или состояния или улучшение их симптома. В некоторых вариантах осуществления в течение периода лечения композиции вводят по меньшей мере дважды таким образом, что происходит лечение расстройства или состояния или предотвращение их симптома. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз в течение периода лечения таким образом, что за период лечения в клетку-мишень или ткань-мишень доставляется достаточное количество иммуномодулирующего компонента. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в течение периода лечения достаточное количество раз таким образом, что за период лечения в клетку-мишень или ткань-мишень доставляется достаточное количество иммуномодулирующего компонента так, что происходит предотвращение, уменьшение, улучшение или отсрочка одного или более симптомов заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления увеличение концентрации иммуномодулирующего компонента в клетке-мишени или ткани-мишени включает увеличение максимальной концентрации, тогда как в других — увеличение средней концентрации. В некоторых вариантах осуществления существенное увеличение в течение периода лечения может быть определено путем сравнения периода до или после лечения у субъекта или путем сравнения измерений, выполненных в категории пациентов, подвергающихся лечению, с измерениями в соответствующей контрольной группе, не получающей лечения.

[00249] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз за период лечения таким образом, что концентрация иммуномодулирующего компонента в клетке-мишени или ткани-мишени увеличивается по меньшей мере приблизительно в течение одной недели,

двух недель, трех недель, четырех недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или более шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят достаточное количество раз за период лечения таким образом, что концентрация иммуномодулирующего компонента в клетке-мишени или ткани-мишени увеличивается в течение периода времени, по меньшей мере равного периоду лечения.

[00250] В некоторых вариантах осуществления интервал времени между повторными введениями в пределах периода лечения не превышает период, в течение которого количество внеклеточных везикул в кровотоке уменьшается до менее чем приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от количества внеклеточных везикул, присутствующих во вводимой фармацевтической композиции.

[00251] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дополнительно включают введение одной или множества доз нетерапевтических внеклеточных везикул перед инъекцией соответствующей терапевтической дозы внеклеточных везикул, содержащих терапевтический агент. В определенных вариантах осуществления нетерапевтическую внеклеточную везикулу вводят отдельно от терапевтических внеклеточных везикул и в другой дозе. В определенных вариантах осуществления доза нетерапевтической внеклеточной везикулы больше дозы терапевтической внеклеточной везикулы. В определенных других вариантах осуществления доза нетерапевтической внеклеточной везикулы меньше дозы терапевтической внеклеточной везикулы. В определенных вариантах осуществления доза нетерапевтической внеклеточной везикулы равна дозе терапевтической внеклеточной везикулы. В различных вариантах осуществления способы введения нетерапевтических внеклеточных везикул перед введением инъекции соответствующей дозы терапевтических внеклеточных везикул уменьшает обновление терапевтических внеклеточных везикул в печени, легких и/или селезенке. См. совместную заявку PCT/US2017/047794, включенную в настоящий документ путем ссылки для всех целей.

[00252] Эффективное количество композиции предоставляется, по меньшей мере частично, на основании типа ткани-мишени, типа клетки-мишени, способа введения, физических характеристик внеклеточной везикулы (*например*, размера и, в некоторых случаях, объема доставляемых молекул) и других детерминант. В общем, эффективное количество композиции обеспечивает эффективный клеточный ответ клетки-мишени. Повышение эффективности может быть продемонстрировано увеличением клеточной трансфекции (*т. е.* процентной долей клеток, трансфицированных содержимым внеклеточных везикул), усилением клеточного ответа или снижением врожденного иммунного ответа субъекта-хозяина.

[00253] Дозировка и частота введения внеклеточных везикул и их фармацевтических композиций могут быть определены, *например*, лечащим врачом на основании различных факторов, таких как тяжесть заболевания, возраст пациента, пол, рацион и режим питания, тяжесть любого воспаления, время введения и другие клинические факторы. В одном примере внутривенное введение начинают с дозы, которая является минимально эффективной, и дозу увеличивают в течение предварительно выбранного периода времени до тех пор, пока не будет наблюдаться положительный эффект. Впоследствии постепенное увеличение дозы ограничивается уровнями, которые вызывают соответствующее увеличение эффекта, с учетом всех возможных побочных эффектов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00254] Другие аспекты и варианты осуществления представлены в следующих пронумерованных пунктах.

1. Внеклеточная везикула, содержащая одну или более молекул нуклеиновых кислот, которые ингибируют по меньшей мере один ген и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1.
2. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула представляет собой экзосому.
3. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 1 или 2, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК.
4. Внеклеточная везикула по любому одному из вариантов осуществления 1–3, отличающаяся тем, что ингибирующая РНК представляет собой антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК или пре-микроРНК.
5. Внеклеточная везикула по любому одному из вариантов осуществления 1–4, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ген, выбран из группы, состоящей из:

KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC и c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы и PKM2.
6. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 5, отличающаяся тем, что ген представляет собой KRAS.
7. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 6, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа.
8. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 7, отличающаяся тем, что ингибирующая РНК также нацелена на мышинный Kras^{G12D}.
9. Внеклеточная везикула по любому одному из вариантов осуществления 1–8, отличающаяся тем, что макрофаг является оседлым в опухоли макрофагом.
10. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что опухоль представляет собой опухоль поджелудочной железы.
11. Внеклеточная везикула по любому одному из вариантов осуществления 1–10, дополнительно содержащая дополнительный иммуномодулирующий компонент.
12. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 11, отличающаяся тем, что дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, антитело или терапевтический белок.
13. Внеклеточная везикула по варианту осуществления 12, отличающаяся тем, что антитело является ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому одному из вариантов осуществления 1-13.
15. Способ лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту внеклеточной везикулы по любому одному из вариантов осуществления 1–13 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 14, тем самым осуществляя лечение заболевания у пациента.
16. Способ по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что заболевание является онкологическим заболеванием.
17. Способ по варианту осуществления 15 или 16, отличающийся тем, что пациент является человеком.
18. Способ по любому одному из вариантов осуществления 1–17, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на протоонкоген.
19. Способ по варианту осуществления 18, отличающийся тем, что протоонкоген представляет собой человеческий KRAS.
20. Способ по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что онкологическое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы.
21. Способ по любому одному из вариантов осуществления 15–20, дополнительно включающий проведение по меньшей мере второго вида терапии.
22. Способ по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что второй вид терапии включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию.
23. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что макрофаг M2 представляет собой опухолеассоциированный макрофаг, выбранный из группы, состоящей из макрофагов типа M2a, M2b и M2c.
24. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует повышенную секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из $INF\gamma$, IL-12, IL-23, $TNF\alpha$, IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 и CXCL11, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
25. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует сниженную секрецию иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-10, $TGF\beta$, PGE_2 , CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
26. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует повышенную экспрессию опухолеассоциированного антигена по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
27. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что макрофаг M1 усиливает стимуляцию Т-клеток $CD8^+$ и/или естественных клеток-киллеров по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.

28. Способ лечения рака поджелудочной железы у субъекта, включающий введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа; при этом лечение увеличивает процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 до большего уровня, чем наблюдаемый у пациента, которого лечат с применением ингибирующей РНК, нацеленной на человеческий KRAS^{G12D}.

ПРИМЕРЫ

[00255] Следующие примеры приводятся с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, однако они не претендуют ни на ограничение объема того, что авторы рассматривают как свое изобретение, ни на то, что нижеприведенные эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (*например*, количеств, значений температуры и *т. д.*), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части означают массовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление представляет атмосферное давление или давление, близкое к атмосферному. Могут употребляться стандартные сокращения, *например*, п. о., пара(-ы) оснований; т. п. н., тысяча(-и) пар нуклеотидов; пл, пиколитр(-ы); с или сек, секунда(-ы); мин, минута(-ы); ч или час, час(-ы); ак, аминокислота(-ы); нт, нуклеотид(-ы); и т. п.

[00256] В практике по настоящему изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии, биохимии белков, рекомбинантных ДНК и фармакологии в пределах квалификации в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. *См., например*, Т.Е. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1: Нокдаун транскрипционных факторов в макрофагах M2

Способы:

Выделение моноцитов из МКПК:

- Получали 50 мл лейкоцитомоноцитарного слоя.
- В пробирки STEMCELL SepMate объемом 50 мл пипеткой переносили 15 мл фикола.
- Лейкоцитомоноцитарный слой разводили в ФСБ с использованием 2 мМ ЭДТК до достижения конечного объема ~250 мл.
- Разбавленный образец лейкоцитомоноцитарного слоя выливали в пробирки Sepmate до достижения конечного объема в пробирке ~ 45–50 мл.
- Пробирки центрифугировали при 1000 g в течение 15 минут с установкой торможения на 1.

- Из центрифужных пробирок аспирировали плазму и с помощью пипетки собирали лейкотромбоцитарный слой и переносили в коническую пробирку объемом 50 мл. Пробирки наполняли ФСБ/ЭДТК и центрифугировали для осаждения клеток при 500 g в течение 3 минут.
- При наличии большого количества эритроцитов клетки ресуспендировали в 10 мл лизирующего буфера ACK (ThermoFisher, № по каталогу A1049201) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 минут (согласно протоколу производителя). Пробирки наполняли ФСБ/ЭДТК и центрифугировали при 500 g в течение 3 минут.
- Пробирки центрифугировали в течение 5 минут при 400 g, еще раз промывали осадок ФСБ/ЭДТК и повторно осаждали.
- Осадок ресуспендировали в буфере RoboSep (STEMCELL, № по каталогу 20104) и подсчитывали клетки, используя разведение 1:1 с трипановым синим (Thermofisher) (из одного лейкотромбоцитарного слоя получали ~ 500 миллионов МКПК).
- Моноциты CD14+ выделяли с использованием набора для обогащения моноцитов человека EasySep (STEMCELL, № по каталогу 19059RF) в соответствии с протоколом производителя (~ 10% от общего числа клеток было выделено в виде моноцитов)
- 5 миллионов моноцитов высевали в один планшет в среду RPMI с добавлением 10% ФБС, 1% анти/анти + 40 нг/мл M-CSF.

Дифференцировка и поляризация макрофагов:

(По материалам: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC>)

- Высеянные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС, 1% анти/анти, 1% пен/стреп + 40 нг/мл M-CSF (Biolegend) в течение 5–6 дней при 37 °C, 5% CO₂. В день 1 и 3 после посева добавляли 5 мл той же свежей среды. В день 5 добавляли поляризующие цитокины следующим образом (с 40 нг/мл MSCF; все цитокины добавляли в концентрации 20 нг/мл):
- M0: без цитокинов.
- M2a: IL-4.
- M2c: IL-10.
- M2++: IL4, IL10, TGFβ.
- M1: IFN-g + LPS (100 нг/мл).
- TAM: 75% супернатанта Раис-1.
- Клетки инкубировали с цитокинами течение 24 часов.
- На 6-й день среду аспирировали, клетки промывали ФСБ, а затем добавляли в каждый планшет по 10 мл ФСБ 5 mM с ЭДТК (ледяной) и инкубировали при 4 °C в течение 30 минут.

- Клетки аккуратно соскребали с планшетов и подсчитывали.
- Затем высевали по 50 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в среду RPMI-1640 с добавлением 10% ФСБ, 1% анти/анти, 1% пен/стреп + 40 нг/мл M-CSF (Biolegend) с соответствующими цитокинами для различных популяций макрофагов (см. выше), и через 24 часа начинали обработку.

Очистка экзосом:

[00257] Экзосомы собирали из супернатанта суспензионных культур клеток HEK293 SF высокой плотности через 9 дней. Супернатант фильтровали и фракционировали с помощью анионообменной хроматографии и элюировали в ступенчатом градиенте хлорида натрия. Пиковая фракция с самой высокой концентрацией белка содержала экзосомы и загрязняющие клеточные компоненты. Выделяли пиковую фракцию и дополнительно фракционировали на градиенте плотности Optiprep™ (60% йодиксанол мас./об.) ультрацентрифугированием.

[00258] Фракцию экзосом концентрировали ультрацентрифугированием в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл для ротора SW 32 Ti при 133 900 g в течение 3 часов при 4 °C. Осажденный материал ресуспендировали в 1 мл ФСБ и 3 мл Optiprep™, доводя конечную концентрацию йодиксанола до 45%. Для градиента Optiprep™ готовили 4-уровневый стерильный градиент с 4 мл 45% йодиксанола, содержащего ресуспендированный материал, 3 мл 30% йодиксанола, 2 мл 22,5% йодиксанола, 2 мл 17,5% йодиксанола и 1 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344059) объемом 12 мл для ротора SW 41 Ti. Градиент Optiprep™ ультрацентрифугировали при 150 000 g в течение 16 часов при 4 °C для отделения фракции экзосом. Ультрацентрифугирование привело к получению верхней фракции, как было известно, содержащей экзосомы, средней фракции, содержащей клеточный дебрис средней плотности, и нижней фракции, содержащей агрегаты высокой плотности и клеточный дебрис. Экзосомный слой затем осторожно собирали из верхних ~ 3 мл из пробирки.

[00259] Фракцию экзосом разводили в ~32 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) объемом 38,5 мл и подвергали ультрацентрифугированию при 133 900 g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем ресуспендировали в минимальном объеме ФСБ (~ 200 мкл) и хранили при 4 °C.

[00260] Многие солидные опухоли характеризуются миелоидным клеточным инфильтратом, часто содержащим опухолеассоциированные макрофаги, характеризующиеся наличием альтернативно активированного фенотипа M2. Макрофаги M2 экспрессируют высокие уровни фосфорилированных STAT3 и STAT6, которые стимулируют экспрессию метаболического фермента аргиназы (Arg1). Чтобы продемонстрировать, что нокдаун критических генов M2 изменяет фенотип M2 в дифференцированных *in vitro* макрофагах, мышинные макрофаги RAW264.7 поляризовали до превращения в фенотип M2, как описано выше. Культивированные поляризованные макрофаги трансфицировали увеличивающимися количествами миРНК, нацеленной на STAT3, STAT6, СЕВРβ-1, СЕВРβ-2, Рi3Kγ или KRAS (12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ). Каждый из генов подавляли дозозависимым образом (Фиг. 1), и нокдаун каждого гена M2 приводил к сопутствующему снижению Arg1 (Фиг. 2), демонстрируя, что фенотип M2 можно изменить, уменьшив экспрессию вышестоящих регуляторов.

Пример 2. Дифференциальное поглощение экзосом подтипами макрофагов

[00261] Подтипы макрофагов характеризуются изменениями метаболической и другой фенотипической активности. Чтобы понять, имеется ли преимущество поглощения определенных экзосом подтипами макрофагов, инкубировали шесть субпопуляций макрофагов (M0, M1, M2a, M2c, M2++ и TAM) с повышающимися концентрациями экзосом, полученных из НЕК293SF, сконструированных для экспрессии флуоресцентного GFP. Поглощение экзосом определяли путем измерения общей интенсивности GFP в клетках в течение 36 часов в системе анализа живых клеток IncuCyte® (Essen Bioscience). Как показано на Фиг. 3, хотя поглощение экзосом наблюдалось во всех подтипах макрофагов, при этом наименьшей эффективностью поглощения экзосом отличались макрофаги M0, в то время как макрофаги M2++ значительно более эффективно поглощали экзосомы по сравнению с другими подтипами макрофагов.

[00262] Поскольку макрофаги M2 эффективно поглощают экзосомы, мы исследовали, будут ли экзосомы, нагруженные ASO, более эффективными при нацеливании на внутриклеточные мишени макрофагов (например, более эффективными для нокдауна экспрессии гена-мишени и нижестоящих эффекторных молекул в сигнальном пути гена), чем только ASO. Был создан модифицированный 2'-метоксиэтилом (МОЕ) одноцепочечный ДНК/РНК ASO, нацеленный на STAT3 и несущий флуоресцентный индикатор Cy5 и 5'-холестериновый линкер. Экзосомы НЕК293SF смешивали с мечеными холестерином флуоресцентными ASO, свободные ASO удаляли с помощью ультрацентрифугирования и посредством удаления супернатанта, содержащего ASO. Макрофаги M2 и M0 высевали с одинаковой плотностью и инкубировали с соответствующими концентрациями свободных ASO или экзосом, загруженных ASO (экзо-ASO), которые измеряли по общей интенсивности флуоресценции. Общую флуоресценцию клеток измеряли в течение 48 часов и определяли количественно с использованием системы анализа живых клеток IncuCyte®. Как показано на Фиг. 4, макрофаги M2 быстрее поглощают как свободные ASO, так и экзо-ASO, по сравнению с макрофагами M0. Интересно, что экзо-ASO более эффективно поглощались как макрофагами M0, так и M2, что позволяет предположить, что доставка ASO в макрофаги M2 может быть усилена путем загрузки на экзосомы.

[00263] Чтобы определить, имело ли место различие в поглощении макрофагами экзосом и экзо-ASO по сравнению с клетками других типов *in vivo*, интактным мышам вводили внутрибрюшинно 1×10^{11} или 1×10^{12} GFP-содержащих экзосом. Через один час после инъекции выделяли все перитонеальные клетки и определяли их характеристики с помощью проточной цитометрии для определения GFP-позитивности в различных подмножествах иммунных клеток, *т. е.* В-клетках, дендритных клетках, нейтрофилах, естественных клетках-киллерах (NK), Т-клетках и макрофагах. Как показано на Фиг. 5А, при применении обеих доз преобладающим типом клеток, поглощающих флуоресцентные экзосомы, были макрофаги. Для определения того, возникает ли это различие в состоянии заболевания, мышам с опухолью B16F10 вводили однократную дозу меченого Cy5 экзо-ASO или нативных немеченых экзосом. Инъекцированные опухоли выделяли, диссоциировали и проводили измерения с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг. 5В, макрофаги поглощают экзо-ASO гораздо легче, чем опухолевые клетки (общий сигнал Cy5 в ~ 100 раз выше), что позволяет предположить, что доставка экзо-ASO может достигать популяций макрофагов в нескольких сложных смесях клеток. Кроме того, преимущественное поглощение макрофагами экзо-ASO по сравнению с другими протестированными типами клеток (В-клетки, дендритные клетки, нейтрофилы,

естественные клетки-киллеры (NK) и Т-клетки) обеспечивает способы доставки ASO, нацеленные на клетки макрофагов, включая введение композиции экзо-ASO субъекту, причем введенная композиция предпочтительно поглощается макрофагами, присутствующими у субъекта (по сравнению с поглощением другими подмножествами иммунных клеток, *например*, В-клетками, дендритными клетками, нейтрофилами, естественными клетками-киллерами (NK) и Т-клетками). Эта повышенная специфичность композиции экзо-ASO к макрофагам повышает безопасность введенной композиции за счет снижения эффектов в нецелевых клетках.

Пример 3. Опосредованная экзосомами доставка антисмысловых олигонуклеотидов эффективно нарушает регуляцию транскрипционных сетей макрофагов и влияет на поляризацию

[00264] Предыдущие эксперименты дают возможность предположить, что опосредованная экзосомами доставка ASO может быть эффективным методом изменения паттернов экспрессии генов макрофагов. Экзосомы, полученные из HEK293SF, очищенные в соответствии с вышеуказанными методами, были загружены одним из пяти различных меченных холестерином ASO, нацеленных на STAT3 (4.1, двухцепочечная химическая структура MOE; 5.1 и 5.2, одноцепочечная химическая структура О-метила; 5.3 и 5.4, одноцепочечная химическая структура MOE). Последовательности ASO показаны в таблице 0. M2-поляризованные мышечные клетки RAW264.7 инкубировали с 5 мкМ свободного меченого холестерином ASO или с экзосомами, нагруженными меченым холестерином ASO, в количестве 1×10^5 или 1×10^6 . Уровни транскрипта STAT3 измеряли через 24 часа после обработки, выявляя сопоставимый или превосходящий нокдаун STAT3 при обработке экзо-ASO по сравнению с обработкой свободным ASO. Немодифицированные экзосомы, инкубированные с поляризованными макрофагами, не влияли на экспрессию STAT3 (Фиг. 6). Чтобы исследовать нижестоящие мишени STAT3, уровни транскриптов ARG1 измеряли через 48 часов после обработки. Как показано на Фиг. 7, нокдаун STAT3 свободным ASO или экзо-ASO привел к устойчивой репрессии Arg1, в некоторых случаях более чем на 90% (Фиг. 7). M2-поляризованные клетки RAW264.7 инкубировали с высокой (4 мкМ) и низкой (0,4 мкМ) концентрациями ASO или экзо-ASO для STAT3, KRAS и C/EBP β . Как показано на Фиг. 8A-C, образцы экзо-ASO были одинаково (STAT3) или более эффективными (KRAS, C/EBP β) во всех испытанных дозах (Фиг. 8A-C). Последовательности ASO представлены в таблице 0.

[00265] Этот результат демонстрирует, что экзо-ASO является мощным модулятором сетей экспрессии макрофагов и может обеспечить превосходную дифференцированную модальность по сравнению с введением свободного ASO для различных видов терапевтического применения. Один из таких способов модулирования экспрессии генов в макрофаге, включает введение субъекту экзо-ASO, причем указанный ASO нацелен на ген, и при этом модуляция равна модуляции, вызванной введением эквимольного количества свободного ASO, нацеленного на ген, или превышает ее. Другой вариант осуществления включает способ ингибирования экспрессии гена в макрофаге, включающий введение субъекту экзо-ASO, причем указанный ASO нацелен на ген, и при этом ингибирование равно ингибированию, вызванному введением эквимольного количества свободного ASO, нацеленного на ген, или превышает его. Другой вариант осуществления включает способ подавления нижестоящей мишени гена в макрофаге, включающий введение субъекту экзо-ASO, причем указанный ASO нацелен на ген, и при этом подавление равно

подавлению, вызванному введением эквимольного количества свободного ASO, нацеленного на ген, или превышает его. Еще один вариант осуществления включает способ изменения поляризации популяции макрофагов, включающий введение субъекту экзо-ASO, причем указанный ASO нацелен на ген, экспрессированный в макрофагах, и при этом изменение поляризации равно изменению поляризации, вызванному введением эквимольного количества свободного ASO, нацеленного на ген, или превышает его. В таких вариантах осуществления изменение поляризации может представлять собой изменение фенотипа с M2 на M1.

[00266] Чтобы проверить роль экзо-ASO в клетках человека, первичные человеческие макрофаги были поляризованы до фенотипа M2 и обработаны различными дозами свободного ASO STAT3 или экзо-ASO STAT3. При использовании макрофагов от трех отдельных доноров-людей, через 24 часа после обработки экзо-ASO был последовательно более эффективным в подавлении уровней транскрипта STAT3 (Фиг. 9А). Экзо-ASO также значительно сильнее модулировал нисходящий человеческий маркер поляризации M2, CD163, по сравнению со свободным ASO (Фиг. 9В). Макрофаги M2 человека также обрабатывали с использованием 4 мкМ свободного ASO или экзо-ASO для HIF1 α , P3K γ , CREB/ β , STAT6 и STAT3. Как показано на Фиг. 10, во всех группах обработки наблюдалось подавление гена-мишени, но во всех случаях обработка экзо-ASO была более эффективной, чем обработка свободным ASO. Важно, что нокадаун экзо-ASO любой из мишеней макрофагов приводил к устойчивому снижению экспрессии CD163 (Фиг. 11), демонстрируя, что опосредованная экзосомами доставка ASO эффективным и воспроизводимым образом нарушает важные сети сигнализации макрофагов.

[00267] Функциональным следствием поляризации макрофагов M2 является уменьшение провоспалительных цитокинов, которые способствуют проонкогенному микроокружению. Следовательно, превращение макрофагов из фенотипа M2 в M1 должно приводить к усилению провоспалительной сигнализации. Превращение макрофагов из фенотипа M2 в M1 может быть индуцировано LPS, что приводит к индукции цитокинов, включая IL-12 и IL-23. STAT3 является отрицательным регулятором этой сети экспрессии цитокинов, и, таким образом, мы проверили, может ли ингибирование STAT3 в присутствии LPS дополнительно усиливать продукцию провоспалительных цитокинов. M2-поляризованные человеческие макрофаги обрабатывали с использованием 4 мкМ свободного ASO STAT3, 4 мкМ экзо-ASO STAT3, 4 мкМ скремблированного экзо-ASO, нативных экзосом или C188-9, низкомолекулярного ингибитора STAT3. Через 24 часа среду заменяли средой, содержащей 10 нг/мл LPS и через 24 часа выделяли супернатант. Как показано на Фиг. 12, LPS индуцировал секрецию IL-12 и IL-23 (группа LPS 10 нг/мл в сравнении с группой без LPS). Обработка экзо-ASO STAT3, но не свободным ASO STAT3, дополнительно усиливала экспрессию каждого цитокина, что дает возможность предположить, что экзо-ASO может приводить к более эффективной стимуляции фенотипа M1 в ответ на соответствующие иммуномодулирующие сигналы.

[00268] Нарушение регуляции STAT3, STAT6 и других путей модуляции макрофагов приводит к широким изменениям в паттернах экспрессии генов. Чтобы изучить дифференцированное общее влияние обработки экзо-ASO, был проведен анализ NanoString мРНК на макрофагах человека фенотипа M2 в их равновесном состоянии и в ответ на обработку немодифицированными экзосомами (только BB), а также ASO и экзо-ASO в соответствующих концентрациях. Нормализованное количество мРНК по результатам анализа с использованием набора nCounter[®] Human Myeloid Innate Immunity продемонстрировало уменьшение транскриптов STAT3 после обработки как свободным ASO, так и экзо-ASO (Фиг. 13А). После обработки

ASO наблюдалось эффективное подавление всех нисходящих маркеров CD163 (Фиг. 13D), TGF β (Фиг. 13C) и STAT6 (Фиг. 13D).

[00269] Устойчивая репрессия TGF β (< 85%) является критически важным регулятором поляризации макрофагов M2 (Yang and Zhang *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:58). Мы исследовали влияние обработки экзо-ASO STAT3, STAT6 и CEBP β на экспрессию TGF β . Человеческие M2-поляризованные макрофаги обрабатывали экзосомами, загруженными ASO против STAT3 (обе химические структуры: MOE и LNA), STAT6 (химическая структура MOE) и CEBP β (химическая структура MOE). Во всех случаях после обработки субмикромольными концентрациями ASO уровни TGF β были резко снижены (Фиг. 14). Эти результаты демонстрируют, что опосредованная экзосомой доставка ASO против многочисленных регуляторов поляризации макрофагов может привести к устойчивому, стабильному нарушению регуляции клеточных программ, которое может оказывать влияние при лечении многочисленных онкологических заболеваний. Важно отметить, что каждая из мишеней макрофагов, включая недавно признанный в качестве регулятора этого процесса KRAS, была охарактеризована как «неподдающаяся воздействию» мишень, поскольку их роль в заболевании и других клеточных процессах является хорошо известной, но в классических подходах разработки лекарственных средств ускользают безопасные и эффективные методы лечения.

Пример. 4. Ингибирование KRAS дикого типа приводит к усилению поляризации макрофагов и уменьшению размера опухоли in vivo в ортотопической мышинной модели рака поджелудочной железы.

Способы:

[00270] *Получение и выделение экзосом KRAS:* для встраивания конструкций миРНК KRAS в экзосомы без функционального повреждения экзосом используются методы электропорации. Экзосомы выделяют из суспензии клеток почек эмбриона человека (HEK) 293SF, выращенных в химически определенной среде, с использованием установленных методов ультрацентрифугирования (Kahlert *et al.*, 2014). Чистота и однородность экзосом (диаметр частиц 80–150 нм) подтверждается измерениями Nanosight™, просвечивающей электронной микроскопией и мечением иммунозолотом CD9. Для подтверждения наличия и количества миРНК KRAS также проводили ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы и кПЦР. Также создавали экзосомы, содержащие скремблированную миРНК.

[00271] *Стратегии РНКи.* Последовательность миРНК KRAS, нацеленная на мышинный KRAS дикого типа, содержит выступ нуклеотида ТТ для повышения эффективности сайленсинга. Для отслеживания доставки РНКи ее также метили на 3'-конце смысловой цепи флуорофором Alexa Fluor® 647.

[00272] *Мыши и визуализация.* Самок бестимусных голых мышей (Charles Rivers) в возрасте от 4 до 6 недель размещали в индивидуально вентилируемых клетках с поддержанием 12-часового цикла свет-темнота при температуре 21–23 °С и влажности 40–60%. Мышам был разрешен свободный доступ к пище, подвергнутой стерилизации облучением, и стерильной воде. Под общей анестезией с помощью шприца с иглой 27 калибра в хвост поджелудочной железы вводили онкогенные клетки поджелудочной железы человека Панс-1 (Kras^{asp12} (Rejiba *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2001)) или клетки ВХРС-3 (10⁶, повторно

суспендированные в 10 мкл ФСБ). Для анализа размера/объема ортотопической опухоли и количественной оценки всех расчетов по опухоли использовали программное обеспечение Living Image версии 4.4 (Caliper Life Sciences). Определяли представляющую интерес круговую область (ROI) вокруг поджелудочной железы и опухоли и устанавливали ее в качестве стандарта для сравнения всех изображений в пределах одной экспериментальной группы. Кроме того, условия воздействия (время, апертура, положение столика, группирование) оставались одинаковыми для всех измерений во всех экспериментальных группах. Последующие измерения опухоли (ф/с/см²/ср) во всех экспериментальных группах проводили в одинаковых условиях. Мышам регулярно и случайным образом проводили визуализирующие исследования и делили на группы лечения. Мышам через день в/б вводили 2×10^8 экзосом в ФСБ в объеме 100 мкл. Перед введением инъекции экзосомы подвергали электропорации с 2 мкг миРНК и промывали ФСБ.

[00273] *Гистология, гистопатология и иммуногистохимия.* Ткани фиксировали в формалине и обрабатывали для заливки парафином. Ткани нарезают срезами толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и трихромным красителем по методу Массона (MTS) (Leica). Для проведения гистопатологической оценки оценивали срезы, окрашенные H&E на основании морфологических стадий рака поджелудочной железы: нормальная, интраэпителиальная неоплазия поджелудочной железы (PanIN) и аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC). Для каждого среза ткани специалисты по гистологии поджелудочной железы в слепом режиме определяли процентный показатель каждой из трех стадий (нормальная, PanIN, PDAC), после чего рассчитывали среднее значение, чтобы получить для каждой когорты общий балл из 100. Среднее значение этих баллов в процентах затем использовали в соответствующих когортах для каждой мыши. Срезы опухолевой ткани также окрашивали на макрофаги (либо с использованием маркеров для пан-макрофагов (*например*, F4/80-антител и/или с использованием специфичных для фенотипов M2 и M1 клеточных маркеров для обнаружения оседлых в опухоли макрофагов).

[00274] *Анализ для определения характеристик фенотипов макрофагов.* У мышей брали образцы крови и опухоли. Макрофаги выделяли и окрашивали для проведения анализа маркеров M1 и M2 с помощью проточной цитометрии. Макрофаги окрашивали на маркеры пан-макрофагов, а также на маркеры клеточной поверхности фенотипа M2 (*например*, YM1, FIZZ1, дектин-1 и/или MGL) и на маркеры клеточной поверхности фенотипа M1. Затем макрофаги M2 и M1 подсчитывали и сортировали для проведения дальнейшего анализа, такого как количественная ПЦР, для определения экспрессии цитокинов и/или микроРНК для of микроРНК, связанных с фенотипом M1 и/или M2).

[00275] Результаты экспериментов с ксенотрансплантатом и анализы объема ортотопической опухоли подтверждают, что экзосомы, содержащие миРНК KRAS дикого типа, эффективно уменьшают размер опухолей поджелудочной железы и увеличивают количество опухолеассоциированных макрофагов с фенотипом M1 по сравнению с экзосомами, несущими скремблированную миРНК, что свидетельствует об эффективности введения экзосом, содержащих ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа, для лечения рака.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 0. Последовательности антисмысловых олигонуклеотидов (ASO)		
Мишень	Последовательность	SEQ ID NO:
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	SEQ ID NO: 1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCTT	SEQ ID NO: 2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	SEQ ID NO: 3
Pi3K γ	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	SEQ ID NO: 4
HIF1- α	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	SEQ ID NO: 5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	SEQ ID NO: 6
Все антисмысловые олигонуклеотиды имеют фосфоротиоатную связь между каждым нуклеотидом		

Таблица 1. Липиды экзосом	
Лизобисфосфатидная кислота	Ганглиозид GM3 24:1
Сфингомиелин (SM)	Ганглиозид GM3 16:0
Ганглиозид GM3	PE40:5
Фосфатидилсерин (PS)	PE40:6
Фосфатидилинозит (PI)	PE38:3
Фосфатидилхолин (PC)	PE38:4
Фосфатидилэтаноламин (PE)	PE36:1
Лизофосфатидилхолин (LPC)	PE36:2
Холестерин (Chol)	PE34:1
Диацилглицерин (DG)	PE34:2
PI18:0/20:3	PE-простой эфир 38:5
PI18:0/20:4	PE-простой эфир 38:6
PI18:0/18:1	PE-простой эфир 34:1
PI18:1/18:1	PE-простой эфир 34:2
PI18:0/16:0	PC34:1
PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	Дигидросфингомиелин 16:0

Таблица 2. Полипептиды экзосом			
ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75

ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A

ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGK α	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKS2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNAI1	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B

HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	RPLP0-подобн.	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7

PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VTA1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151
C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2

SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBK1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC
ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
APOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX
ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B
RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5

ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXYD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
BHMT	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8
CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC
MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE
NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN
SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	C1orf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK

PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1
PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUMIL1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1
RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A

TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIP1
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP

ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRDL2	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDI A	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHV α	UNC45A
COX4I1	DDC	IGL α	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248

CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXYD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFBI	RPLP0P2

	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3
PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MF12	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPIO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444
RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60

RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
SI00A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548

UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD

ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3
DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1
FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3

AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2A1
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM
CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19

	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGH α	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTP11
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903
CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819
PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSRI	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	CCT6B
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B
RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	BCHE
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE

RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

Таблица 3. Полезные нагрузки полипептидов и приемники			
Общие классы			
Белки, содержащие анкириновые повторы		Фибронектины	Лиазы
Антитела	Рецепторы комплемента	GPI-связанные полипептиды	Нанотела
Аптамеры	Циклические пептиды	Белки, содержащие повторы HEAT	Нуклеиновые кислоты
Белки, содержащие повторы ARM	DARPin	Гидролазы	Полипептиды
Углеводы	ДНКазы	Киназы	Одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv)
Рецепторы клеточной поверхности	Ферменты	Липопротеины	Белки, содержащие тетратрикопептидные повторы
Комплемент			
C1 ингибитор	C4-связывающий белок	CR3	Фактор I
Рецептор бета-цепи C3	CD59	CR4	Гомологичный фактор рестрикции
C3aR	CR1	Стимулятор гемолиза (DAF)	Ко-фактор мембранного белка (MCP)
C3eR	CR2	Фактор H	PRELP
Ферменты			
триацилглицеринлипаза	КоА-гидролаза желчных кислот	ферулоилэстераза	фосфатидат фосфатаза
(S)-метилмалонил-КоА-гидролаза	бис (2-этилгексил)фталатэстераза	формил-КоА-гидролаза	фосфатидилглицерофосфатаза
[белок-носитель ацила] фосфодиэстераза	бисфосфоглицератфосфатаза	фруктозо-бисфосфатаза	фосфатидилинозитдеацилаза
[фосфорилаза] фосфатаза	Карбоново-сложноэфирные гидролазы	фумарилацетоацетаза	фосфодиэстераза I
1,4-лактоназа	карбоксиметиленбутенолидаза	фузаринин-С орнитинэстераза	фосфоглицератфосфатаза

11-цис-ретинилпальмитат гидролаза	целлюлоза-полисульфатаза	галактолипаза	фосфогликолатфосфатаза
1-алкил-2-ацетилглицерофосфохолинэстераза	цефалоспорин-С деацетилаза	глюконолактоназа	фосфоинозитид фосфолипаза С
2'-гидроксибифенил-2-сульфинатдесульфиназа	цереброзид-сульфатаза	глюкозо-1-фосфатаза	фосфолипаза А1
2-пирон-4,6-дикарбоксилатлактоназа	цетраксатбензилэстераза	глюкозо-6-фосфатаза	фосфолипаза А2
3', 5'-бисфосфатнуклеотидаза	хлорогенатгидролаза	глутатионтиолэстераза	фосфолипаза С
3-гидроксиизобутирил-КоА-гидролаза	хлорофиллаза	глицерин-1-фосфатаза	фосфолипаза D
3'-нуклеотидаза	холинэстераза	глицерин-2-фосфатаза	фосфоноацетальдегидгидролаза
3-оксоадипатенол-лактоназа	холин-сульфатаза	глицерофосфохолин фосфодиэстераза	фосфоноацетатгидролаза
3-фитаза	холоил-КоА гидролаза	Гликозидазы, <i>например</i> ферменты, которые гидролизуют O- и S-гликозильные соединения	фосфонопируватгидролаза
4-гидроксибензоил-КоА тиоэстераза	хондро-4-сульфатаза	гликосульфатаза	фосфопротеинфосфатаза
4-метилоксалоацетатэстераза	хондро-6-сульфатаза	Гликозилазы	Фосфорно-диэфирные гидролазы
4-фитаза	цитрат-лиаза деацетилаза	гистидинол-фосфатаза	Фосфорно-моноэфирные гидролазы
4-пиридоксолактона	кокаинэстераза	гормоночувствительная липаза	Фосфорно-триэфирные гидролазы

за			
5'-нуклеотидаза	кутиназа	Гидролизующие N-гликозильные соединения	фосфосеринфосфатаза
6-ацетилглюкоза деацетилаза	цикламатсульфогидролаза	Гидролизующие S-гликозильные соединения	поли(3-гидроксипропанат)деполимераза
6-фосфоглюконолактоназа	Цистеиновые эндопептидазы	гидроксиацилглютамингидролаза	поли (3-гидроксиоктаноат) деполимераза
α-аминокислотная эстераза	Карбоксипептидазы цистеинового типа	гидроксипропанат-димер гидролаза	полинейридин-альдегид-эстераза
α-аминоацилпептидгидролазы	D-арабинолактоназа	гидроксиметилглутарил-КоА гидролаза	протеин-глутамат метилэстераза
ацетоацетил-КоА гидролаза	дезоксисимонат А-кольцевая лактоназа	идуронат-2-сульфатаза	кворум-гасящая N-ацил-гомосерин-лактоназа
ацетоксибутирилбитринофендеацетилаза	dГТФаза	инозитолфосфатфосфатаза	ретинилпальмитатэстераза
ацетилальминэстераза	дигидрокумарин гидролаза	эстераза ювенильного гормона	Сериновая дегидратаза или сериновая гидроксиметилтрансфераза
ацетилалкилглицеринацетилгидролаза	Дипептидазы	кинуруениназы	Сериновые эндопептидазы
ацетилхолинэстераза	Дипептид гидролазы	L-арабинолактоназа	серин-этанолламинфосфатфосфодиэстераза
ацетил-КоА гидролаза	Дипептидилпептидазы и трипептидилпептидазы	лимонин-D-кольцевая лактоназа	Карбоксипептидазы серинового типа
ацетилэстераза	Дифосфорно-моноэфирные гидролазы	липопротеинлипаза	S-формилглутатионгидролаза
ацетилпируватгидролаза	дисульфоглюкозамин-6-сульфатаза	L-рамноно-1,4-лактоназа	сиалат-O-ацетилэстераза
ацетилсалицилатдеацетилаза	додеканойл-[белок-носитель ацила] гидролаза	лизофосфолипаза	синапин-эстераза
ацетилксиланэстер	Эндодезоксирибонуклеазы,	маннит-1-фосфатаза	Сайт-специфические

аза	продуцирующие 3'-фосфомоноэфиры		эндодезоксирибонуклеазы: расщепление не является специфичным для последовательности
кислая фосфатаза	Эндодезоксирибонуклеазы, продуцирующие 5'-фосфомоноэфиры	Металлокарбокисептидазы	Сайт-специфические эндодезоксирибонуклеазы, специфичные для измененных оснований.
Действующие на ангидриды кислот, чтобы катализировать трансмембранное перемещение веществ	Эндопептидазы с неизвестным каталитическим механизмом	Металлоэндопептидазы.	Сайт-специфические эндодезоксирибонуклеазы: расщепление является специфичным для последовательности
Действующие на ангидриды кислот для облегчения клеточного и субклеточного перемещения	Эндорибонуклеазы, продуцирующие 3'-фосфомоноэфиры.	метилфосфотиоглицерат фосфатаза	сфингомиелинфосфодиэстераза
Действующие на ГТФ для облегчения клеточного и субклеточного перемещения	Эндорибонуклеазы, продуцирующие 5'-фосфомоноэфиры.	метилумбеллиферилацетатдеацетилаза	S-сукцинилглутатионгидролаза
Действующие на фосфоро-азотные связи	Эндорибонуклеазы, проявляющие активность с рибо- или дезоксирибонуклеиновыми кислотами и продуцирующие 3'-фосфомоноэфиры	монотерпен-э-лактон гидролаза	стероидная лактоназа
Действующие на серно-азотные связи	Эндорибонуклеазы, проявляющие активность с рибо- или дезоксирибонуклеиновыми кислотами и продуцирующие 5'-	N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза	стеринэстераза

	фосфомоноэфиры		
актиномициналактоназа	Ферменты, действующие на кислотные ангидриды	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза	стерилсульфатаза
ацилкарнитингидролаза	Ферменты, действующие на углерод-углеродные связи	N-ацетилгалактозаминогликандеацетилаза	сукцинил-КоА гидролаза
ацил-КоА гидролаза	Ферменты, действующие на углерод-углеродные связи, кроме пептидных связей	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза	сахароза-фосфатная фосфатаза
ацилглицеринлипаза	Ферменты, действующие на углерод-фосфорные связи	N-сульфоглюкозаминсульфогидролаза	сахарные фосфатазы
ацилоксиацилгидролаза	Ферменты, действующие на углерод-серные связи	олеоил-[белок-носитель ацила] гидролаза	Серноэфирные гидролазы
ацилпируватгидролаза	Ферменты, действующие на эфирные связи	Омега-пептидазы	танназа
ADAMTS13	Ферменты, действующие на галогенидные связи	орселлинат-депсидгидролаза	Тиоэфирные гидролазы
Аденозиндеаминаза	Ферменты, действующие на пептидные связи (пептидазы)	оксалоацетаза	Тиоэфирные и триалкилсульфониевые гидролазы
аденилил-[глутамат-аммиачная лигаза] гидролаза	Ферменты, действующие на фосфорные связи	пальмитоил [протеин] гидролаза	Треониновые эндопептидазы
АДФ-зависимая ацил-КоА-гидролаза со средней длиной цепи	Ферменты, действующие на серные связи	пальмитоил-КоА гидролаза	тимидинфосфорилаза
АДФ-зависимая ацил-КоА-гидролаза с короткой длиной цепи	Ферменты, действующие на серно-серные связи	пектинэстераза	трегалоза-фосфатаза
АДФ-фосфоглицератфосфатаза	Эфирные гидролазы.	Пептидилпептидные гидролазы	триацетатлактоназа
алкалинфосфатаза	Экзодезоксирибонуклеазы, продуцирующие 5'-	Пептидиламинокислотные гидролазы	Трифосфорномоноэфирные

	фосфомоноэфиры		гидролазы
полностью транс-ретинилпальмитат гидролаза	Экзонуклеазы, проявляющие активность с рибо- или дезоксирибонуклеиновыми кислотами и продуцирующие 3'-фосфомоноэфиры	Пептидиламинокислотные гидролазы или ациламинокислотные гидролазы	триглицеридгидролаза
аминоацил-тРНК гидролаза	Экзонуклеазы, проявляющие активность с рибо- или дезоксирибонуклеиновыми кислотами и продуцирующие 5'-фосфомоноэфиры	Пептидил-дипептидазы	тропинэстераза
Аминопептидазы	Экзорибонуклеазы, продуцирующие 3'-фосфомоноэфиры.	фенилацетил-КоА гидролаза	убиквитинтиолестераза
арилэстераза	Экзорибонуклеазы, продуцирующие 5'-фосфомоноэфиры.	Фенилаланин-аммиачная лиаза	УДФ-сульфохиновосинтаза
арилсульфатаза	Фактор IX	Фенилаланингидроксилаза	уриказа
аспарагиназа	Фактор VIII	феофорбидаза	уронолактоназа
Аспарагиновые эндопептидазы	жирная ацилэтилэфирная синтаза	флоретингидролаза	воскоэфирная гидролаза
β-дикетон гидролаза		форбол-диэфиргидролаза	ксилоно-1,4-лактоназа

Таблица 4. Мишени

Общие классы мишеней			
Микроорганизмы	Полипептиды	ДНК	Аминокислоты
Грибы	Токсины	РНК	Прионы
Бактерии	Липиды	Паразиты	Цитокины
Вирус	Клетки	Клеточный дебрис	
Мишени, связанные с инфекционными заболеваниями			
Липополисахари	Белок клеточной инвазии	Интермедилизин	Секретируемый

ды			эффекторный белок sptP
Токсин запирающей зоны	Холерный энтеротоксин	Инвазионный белок sipA	Силигериолизин
Белок полимеризации актина RickA	Цистеиновая протеаза	Компонент Ia йота токсина	Сериновая протеаза
Белок полимеризации актина RickA	Цитолетальный расширяющий токсин	Иванолизин	Шига токсин
Аденозинмонофосфат-протеинтрансфераза vorS	Цитолизин	LepB	Сфингомиелиназа
Аденилатциклаза	Цитотоксический некротизирующий фактор	Летальный фактор	Стафилокиназа
Аденилатциклаза EcoY	Цитотоксин	Лейкотоксин	Стрептокиназа
АДФ-рибозилтрансферазный ферментативный компонент	Дермонекротический токсин	Листерииолизин	Стрептолизин
Аэролизин	Деубиквитиназа	Микробная коллагеназа	Стрептопейн
Альфа-токсин	Дифтерийный токсин	Автопереносчик белка наружной мембраны IcsA	Суилизин
Альвеолизин	Энтерогемолизин	Пантон-Валентин лейкоцидин F	Суперантиген
Альвеолизин	Энтеротоксин	Перфринголизин	T3SS-секретируемый эффекторный белок EspF
Антролизин O	Ингибитор дифференцировки эпидермальных клеток	Коклюшный токсин	Столбнячный токсин
Agr2/3 комплекс-активирующий белок tickA	Экзофермент	Фосфолипаза	Tir

Бинарный токсин CDT АДФ-рибозилтрансферазы	Экзотоксин	Активатор плазминогена	ToIC
Ботулинический нейротоксин	Фактор обмена нуклеотида G	Пневмолизин	Токсин синдрома токсического шока
Компонент II токсина С2	Фактор обмена нуклеотида гуанина sorE	Защитный антиген	Цинковая карбоксипептидаза
SagA	Термостабильный энтеротоксин	Протеинкиназа	Цинковая карбоксипептидаза
Кальмодулин-чувствительная аденилатциклаза	Автопереносчик IgA-специфической сериновой эндопептидазы	Пиолизин	Zn-зависимая эндопептидаза
Фактор ингибирования клеточного цикла	Инозитолфосфатфосфатаза sorB	Токсин RTX	
Мишени липидов и клеток			
Циркулирующие опухолевые клетки	липид очень низкой плотности (VLDL)	Триглицериды	Жирные кислоты
Метастазы	Липопротеин высокой плотности	Хиломикроны	Холестерин
Эукариотические клетки	Липопротеин низкой плотности	Аполипопротеины	

Таблица 5. Онкологические заболевания			
Острый лимфобластный лейкоз (ALL)	Колоректальный рак	Макроглобулинемия Вальденстрема	Плеврорегочная бластома (детского возраста)
Острый миелоидный лейкоз (AML)	Краниофарингиома (детского возраста)	Рак молочной железы у мужчин	Беременность и рак молочной железы
Адренокортикальная карцинома	T-клеточная лимфома кожи	Злокачественная фиброзная гистиоцитома кости и остеосаркома	Первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС)
СПИД-	Неинвазивная протоковая	Меланома	Рак предстательной

ассоциированная саркома Капоши	карцинома (DCIS)		железы
СПИД-ассоциированная лимфома	Эмбриональные опухоли (детского возраста)	Карцинома из клеток Меркеля	Редкие виды онкологических заболеваний
Рак анального канала	Рак эндометрия	Мезотелиома	Рак прямой кишки
Рак червеобразного отростка	Эпандимома (детского возраста)	Метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом	Почечно-клеточная карцинома
Астроцитомы (детского возраста)	Эпителиальный рак	Карцинома, локализованная по средней линии, связанная с геном NUT	Переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника
Атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль (детского возраста)	Рак пищевода	Пузырный занос	Ретинобластома
Базально-клеточная карцинома	Эстезионейробластома (детского возраста)	Рак ротовой полости и ротоглотки	Раβδοмиосаркома
Рак желчных протоков	Саркома Юинга	Синдромы множественных эндокринных новообразований (детского возраста)	Рак слюнных желез
Рак мочевого пузыря	Внегонадная герминогенная опухоль	Множественная миелома / новообразование плазматических клеток	Саркома
Рак кости	Рак внепеченочных желчных протоков	Грибовидный микоз	Вторичный рак
Рак кишечника	Рак глаз	Миелодиспластические синдромы	Синдром Сезари
Глиома ствола мозга (детского возраста)	Рак желчного пузыря	Миелодиспластические / миелопролиферативные новообразования	Рак кожи
Опухоли	Рак желудка	Миелолиферативные	Рак кожи (не

головного мозга		нарушения, хронические	меланома)
Рак молочной железы	Карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта	Рак носовой полости и околоносовых пазух	Мелкоклеточный рак легкого
Бронхиальные опухоли (детского возраста)	Герминогенная опухоль	Рак носоглотки	Рак тонкой кишки
Лимфома Беркитта	Гестационные трофобластические опухоли (GTT)	Нейробластома	Саркома мягких тканей
Рак с неизвестным первичным очагом	Глиома	Неходжкинская лимфома	Плоскоклеточная карцинома
Рак, распространяющийся на кости	Волосатоклеточный лейкоз	Немелкоклеточный рак легких	Метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом
Рак, распространяющийся на головной мозг	Рак головы и шеи	Рак пищевода	Рак желудка (желудочный)
Рак, распространяющийся на печень	Рак сердца (детского возраста)	Рак полости рта	Рак желудка
Рак, распространяющийся на легкие	Гепатоцеллюлярный рак (печени)	Рак полости рта	T-клеточная лимфома кожи — см. грибovidный микоз и синдром Сезари
Карциноидная опухоль	Гистиоцитоз, клетка Лангерганса	Рак ротоглотки	Рак яичек
Карцинома с неизвестным первичным очагом	Лимфома Ходжкина	Остеосаркома (рак кости)	Рак горла
Опухоли сердца (детского возраста)	Подглоточный рак	Остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома	Тимома и карцинома тимуса
Атипичная	Внутриглазная меланома	Рак яичника	Рак щитовидной

тератоидно-рабдоидная опухоль центральной нервной системы (детского возраста)			железы
Эмбриональные опухоли центральной нервной системы (детского возраста)	Опухоли островковых клеток, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы	Рак поджелудочной железы	Переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника
Центральной нервной системы (детского возраста)	Рак почки	Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (опухоли островковых клеток)	Рак с неизвестным первичным очагом
Рак шейки матки	Гистиоцитоз клеток Лангерганса	Папилломатоз (детского возраста)	Переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки
Хордома (детского возраста)	Рак гортани	Параганглиома	Рак уретры
Хориокарцинома	Лейкоз	Рак паращитовидной железы	Рак матки (эндометрия)
Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)	Рак губ и полости рта	Рак полового члена	Саркома матки
Хронический миелолейкоз (СML)	Рак печени	Рак глотки	Рак влагалища
Хронические миелопролиферативные заболевания	Неинвазивная лобулярная карцинома(LCIS)	Феохромоцитома	Рак вульвы
Рак ободочной кишки	Опухоль с низким злокачественным потенциалом	Опухоль гипофиза	Макроглобулинемия Вальденстрема
Лимфома	Рак легкого	Новообразование плазматических	Опухоль Вильмса

		клеток/множественная миелома	
--	--	---------------------------------	--

[00276] Настоящее изобретение было описано в отношении типичных примеров, которые следует рассматривать как иллюстративные варианты осуществления, не ограничивающие объем изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения. Все ссылки на публикации, включая научные публикации, трактаты, учебники, заявки на патенты и выданные патенты, включены в настоящее описание путем ссылки для любых целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

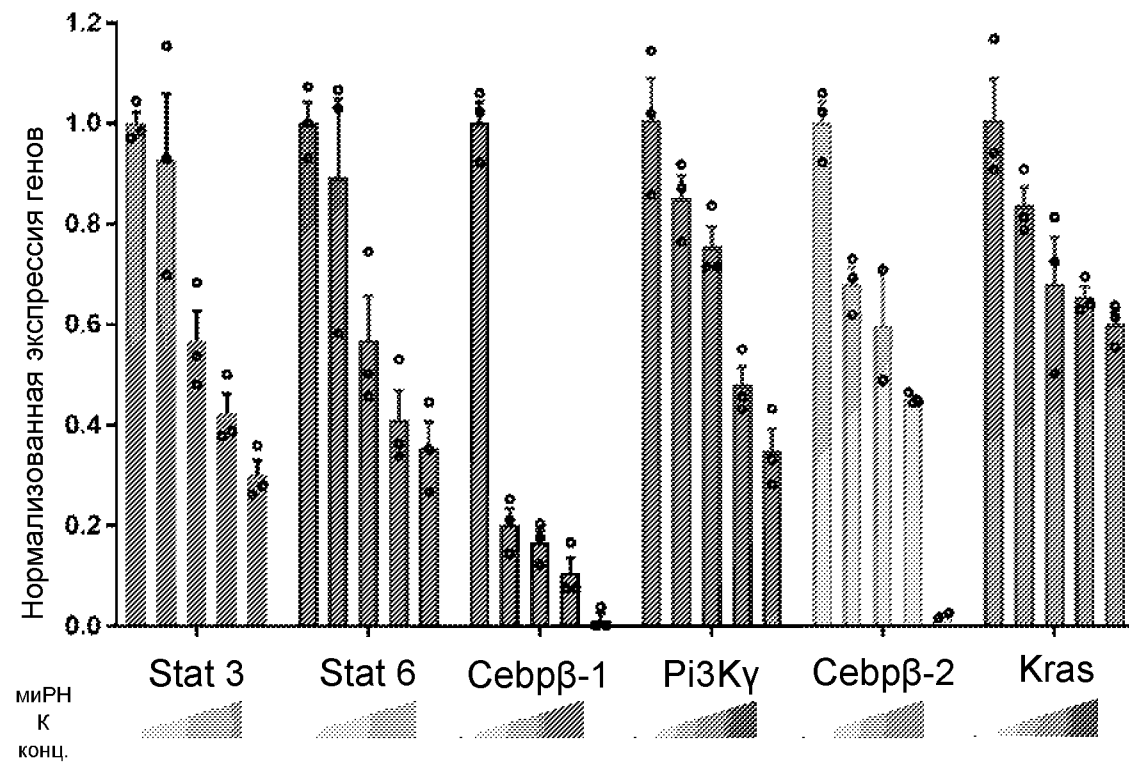
1. Внеклеточная везикула, содержащая один или более иммуномодулирующих компонентов, которые при контакте с макрофагом избирательно реполяризуют макрофаг с превращением фенотипа М2 в фенотип М1.
2. Внеклеточная везикула по п. 1, отличающаяся тем, что один или более иммуномодулирующих компонентов ингибируют по меньшей мере один ген-мишень макрофага.
3. Внеклеточная везикула по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что указанная внеклеточная везикула представляет собой экзосому.
4. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 1–3, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту.
5. Внеклеточная везикула по п. 4, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК.
6. Внеклеточная везикула по п. 5, отличающаяся тем, что ингибирующая РНК представляет собой антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК.
7. Внеклеточная везикула по п. 4, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO).
8. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 1–7, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент ингибирует по меньшей мере один ген, выбранный из группы, состоящей из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы, СЕВР/β, Рi3Kγ и РKM2.
9. Внеклеточная везикула по п. 8, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ген выбран из группы, состоящей из: STAT3, STAT6, СЕВР/β, Рi3Kγ, KRAS и HIF1-альфа.
10. Внеклеточная везикула по п. 9, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1–6.
11. Внеклеточная везикула по п. 10, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1–6.
12. Внеклеточная везикула по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ген представляет собой STAT3.
13. Внеклеточная везикула по п. 12, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на STAT3.
14. Внеклеточная везикула по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ген представляет собой KRAS.
15. Внеклеточная везикула по п. 14, отличающаяся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа.

16. Внеклеточная везикула по п. 15, отличающаяся тем, что ингибирующая РНК также нацелена на мышинный Kras^{G12D}.
17. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 1–16, отличающаяся тем, что макрофаг представляет собой оседлый в опухоли макрофаг.
18. Внеклеточная везикула по п. 17, отличающаяся тем, что опухоль представляет собой опухоль поджелудочной железы.
19. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 1–18, дополнительно содержащая дополнительный иммуномодулирующий компонент.
20. Внеклеточная везикула по п. 19, отличающаяся тем, что дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, антитело или его активный фрагмент, или терапевтический белок или его активный фрагмент.
21. Внеклеточная везикула по п. 20, отличающаяся тем, что дополнительный иммуномодулирующий компонент представляет собой антитело или его активный фрагмент.
22. Внеклеточная везикула по п. 21, отличающаяся тем, что антитело или его активный фрагмент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа, который связывается с CTLA-4, PD-1 или PD-L1, или ингибитор, который связывается с CSF1-R.
23. Внеклеточная везикула по п. 22, отличающаяся тем, что антитело или его активный фрагмент содержит CDR, которые по меньшей мере на 95 % идентичны CDR ипилимумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR ниволумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR цемиплимаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR пембролизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR атезолизумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR авелумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR дурвалумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR пексидартиниба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR PLX7486, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR ARRY-382, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR JNJ-40346527, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR BLZ945, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR эмактузумаба, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR AMG820, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR IMC-CS4, или по меньшей мере на 95% идентичны CDR кабирализумаба.
24. Внеклеточная везикула по п. 23, отличающаяся тем, что антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба.
25. Внеклеточная везикула по п. 22, отличающаяся тем, что антитело или его активный фрагмент представляет собой по меньшей мере одно антитело, которое конкурирует за связывание с антителом, выбранным из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, пексидартиниба, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, эмактузумаба, AMG820, IMC-CS4 и кабирализумаба.
26. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 20–25, дополнительно содержащая PTGFRN или его фрагмент.

27. Внеклеточная везикула по п. 26, отличающаяся тем, что антитело или его фрагмент слит с PTGFRN или его фрагментом.
28. Внеклеточная везикула по любому одному из пп. 1–27, отличающаяся тем, что сравнение проводят с использованием анализа, выбранного из группы, состоящей из анализа поглощения внеклеточной везикулы, анализа экспрессии гена-мишени, анализа экспрессии нижестоящего гена, анализа высвобождения цитокинов и анализа белка клеточной поверхности макрофага.
29. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что макрофаг M2 представляет собой опухолеассоциированный макрофаг, выбранный из группы, состоящей из макрофагов типа M2a, M2b и M2c.
30. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует повышенную секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 и CXCL11, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
31. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует сниженную секрецию иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-10, TGF β , PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24, по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
32. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что макрофаг M1 демонстрирует повышенную экспрессию опухолеассоциированного антигена по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
33. Внеклеточная везикула по любому одному из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что макрофаг M1 усиливает стимуляцию Т-клеток CD8⁺ и/или естественных клеток-киллеров по сравнению с макрофагом M2 до поляризации.
34. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому одному из пп. 1–33.
35. Способ лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту внеклеточной везикулы по любому одному из пп. 1–33 или фармацевтической композиции по п. 34, тем самым осуществляя лечение заболевания у пациента.
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что заболевание является онкологическим заболеванием.
37. Способ по п. 35 или 36, отличающийся тем, что пациент является человеком.
38. Способ по любому одному из пп. 35–37, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на протоонкоген.
39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что протоонкоген представляет собой человеческий KRAS.
40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что онкологическое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы.
41. Способ по любому одному из пп. 35–40, дополнительно включающий проведение по меньшей мере второго вида терапии.

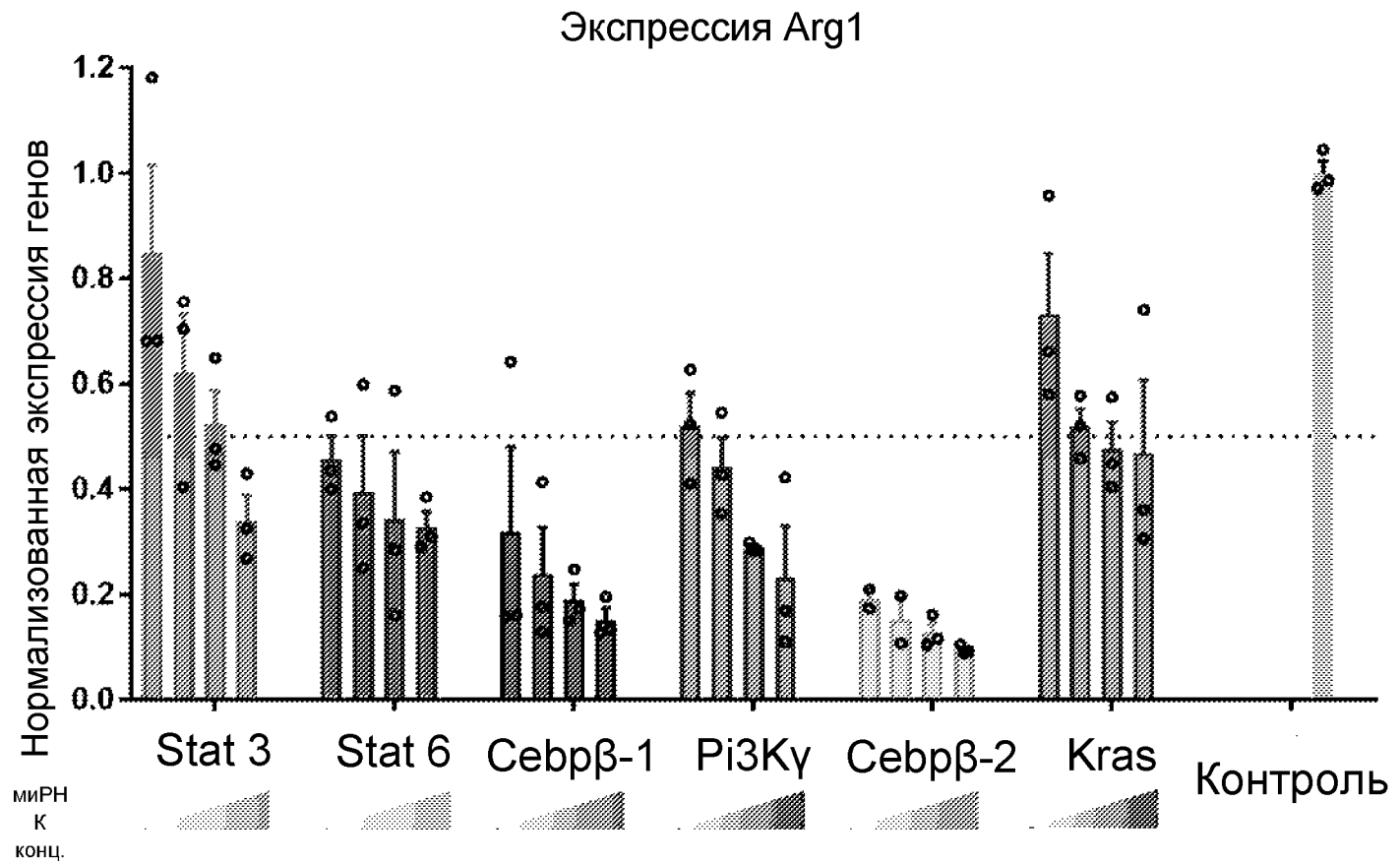
42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что второй вид терапии включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию.
43. Способ по любому одному из пп. 26–33, отличающийся тем, что введение проводят путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного, внутрибрюшинного и внутриопухолевого введения.
44. Способ модулирования экспрессии генов в макрофаге, включающий:
контактирование макрофага с внеклеточной везикулой, содержащей один или более иммуномодулирующих компонентов, которые ингибируют по меньшей мере один ген и тем самым увеличивают поляризацию макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 по сравнению с контактированием макрофага с эквивалентным (-и) количеством (-ами) только иммуномодулирующих компонентов.
45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что контактирование происходит *ex vivo* или *in vivo*.
46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что контактирование происходит *in vivo*.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что контактирование *in vivo* включает введение внеклеточной везикулы субъекту.
48. Способ по п. 46, отличающийся тем, что введение проводят путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного, внутрибрюшинного и внутриопухолевого введения.
49. Способ по любому одному из пп. 46–48, отличающийся тем, что субъект является человеком.
50. Способ по любому одному из пп. 46–49, отличающийся тем, что субъект страдает заболеванием, выбранным из онкологического заболевания и фиброза.
51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак поджелудочной железы.
52. Способ по любому одному из пп. 44–51, отличающийся тем, что внеклеточная везикула представляет собой экзосому.
53. Способ по любому одному из пп. 44–50, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой нуклеиновую кислоту.
54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК.
55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что ингибирующая РНК представляет собой антисмысловую РНК, миРНК, мшРНК, микроРНК, днкРНК, перв-микроРНК или пре-микроРНК.
56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO).
57. Способ по любому одному из пп. 44–56, отличающийся тем, что по меньшей мере один ген выбран из группы, состоящей из: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-альфа, HIF1-бета, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, p-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, аргиназы, глутаминазы, СЕВР/β, Рi3Kγ и PKM2.
58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что по меньшей мере один ген выбран из группы, состоящей из: STAT3, STAT6, СЕВР/β, Рi3Kγ, KRAS и HIF1-альфа.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1–6.
60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1–6.
61. Способ по п. 58, отличающийся тем, что по меньшей мере один ген представляет собой STAT3.
62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на STAT3.
63. Способ по п. 58, отличающийся тем, что по меньшей мере один ген представляет собой KRAS.
64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что иммуномодулирующий компонент представляет собой ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа.
65. Способ лечения рака поджелудочной железы у субъекта, включающий введение субъекту внеклеточной везикулы, содержащей ингибирующую РНК, нацеленную на человеческий KRAS дикого типа; при этом лечение увеличивает процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов с превращением фенотипа M2 в фенотип M1 до более высокого уровня, чем наблюдаемый у пациента, которого лечат с применением ингибирующей РНК, нацеленной на человеческий KRAS^{G12D}.
66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что процент поляризации оседлых в опухоли макрофагов определяют с помощью анализа *ex-vivo* оседлых в опухоли макрофагов, полученных из образца опухоли.

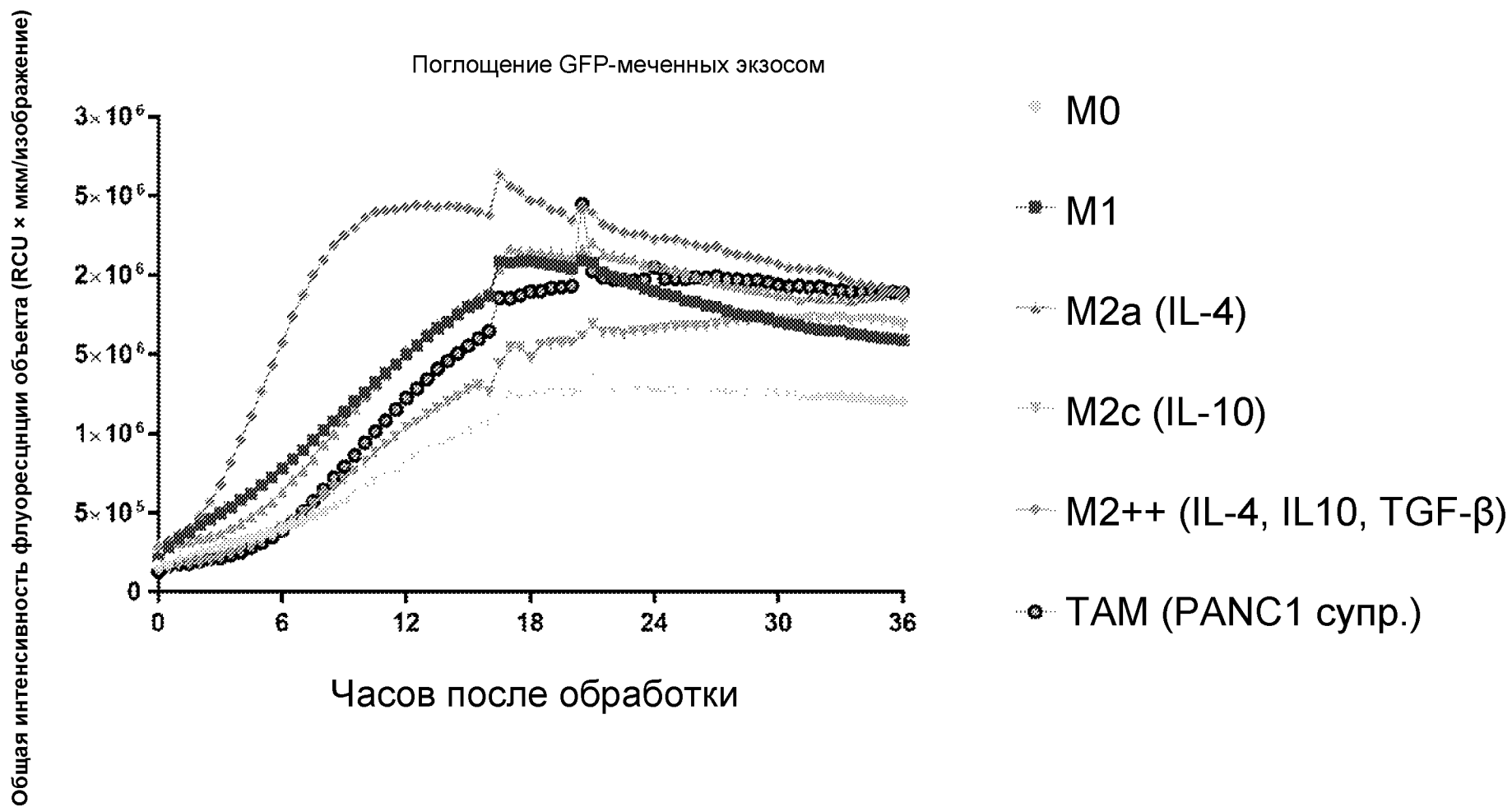


ФИГУРА 1

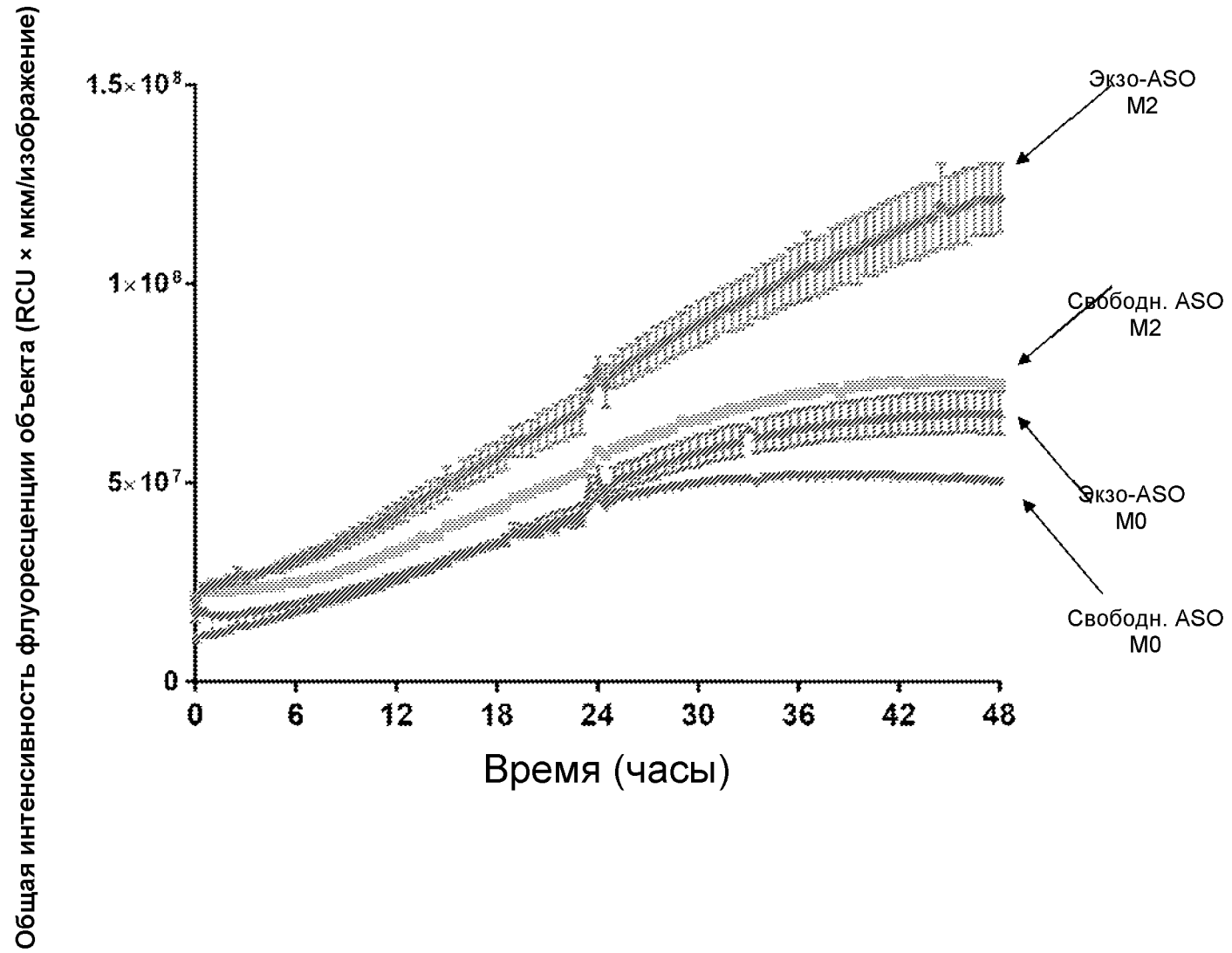
ФИГУРА 2



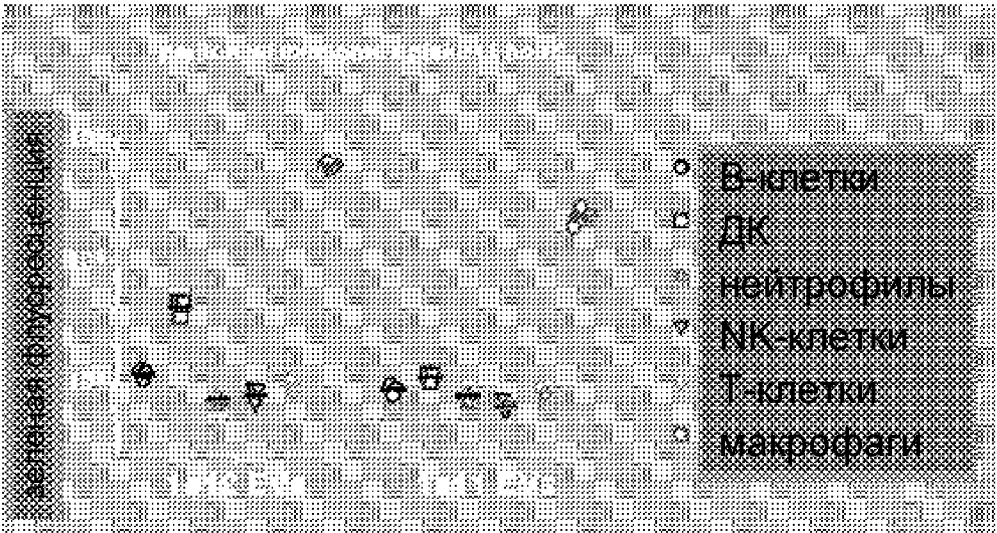
ФИГУРА 3



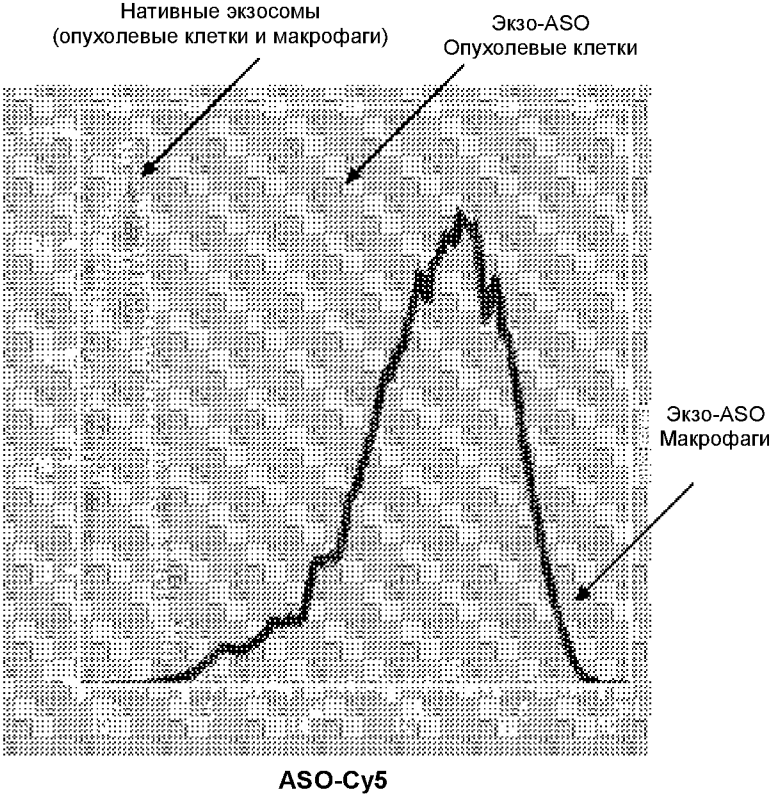
ФИГУРА 4



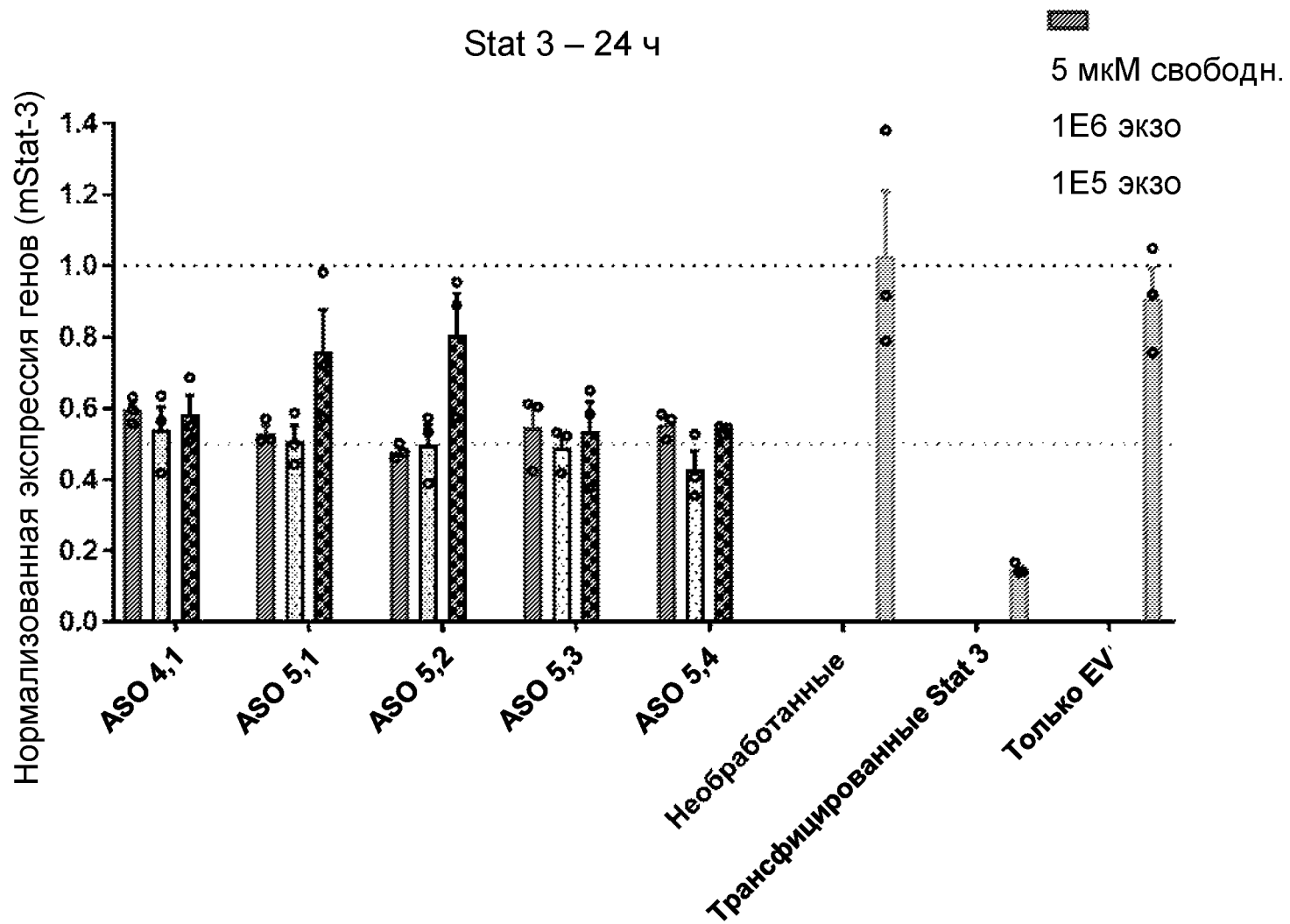
ФИГУРА 5А



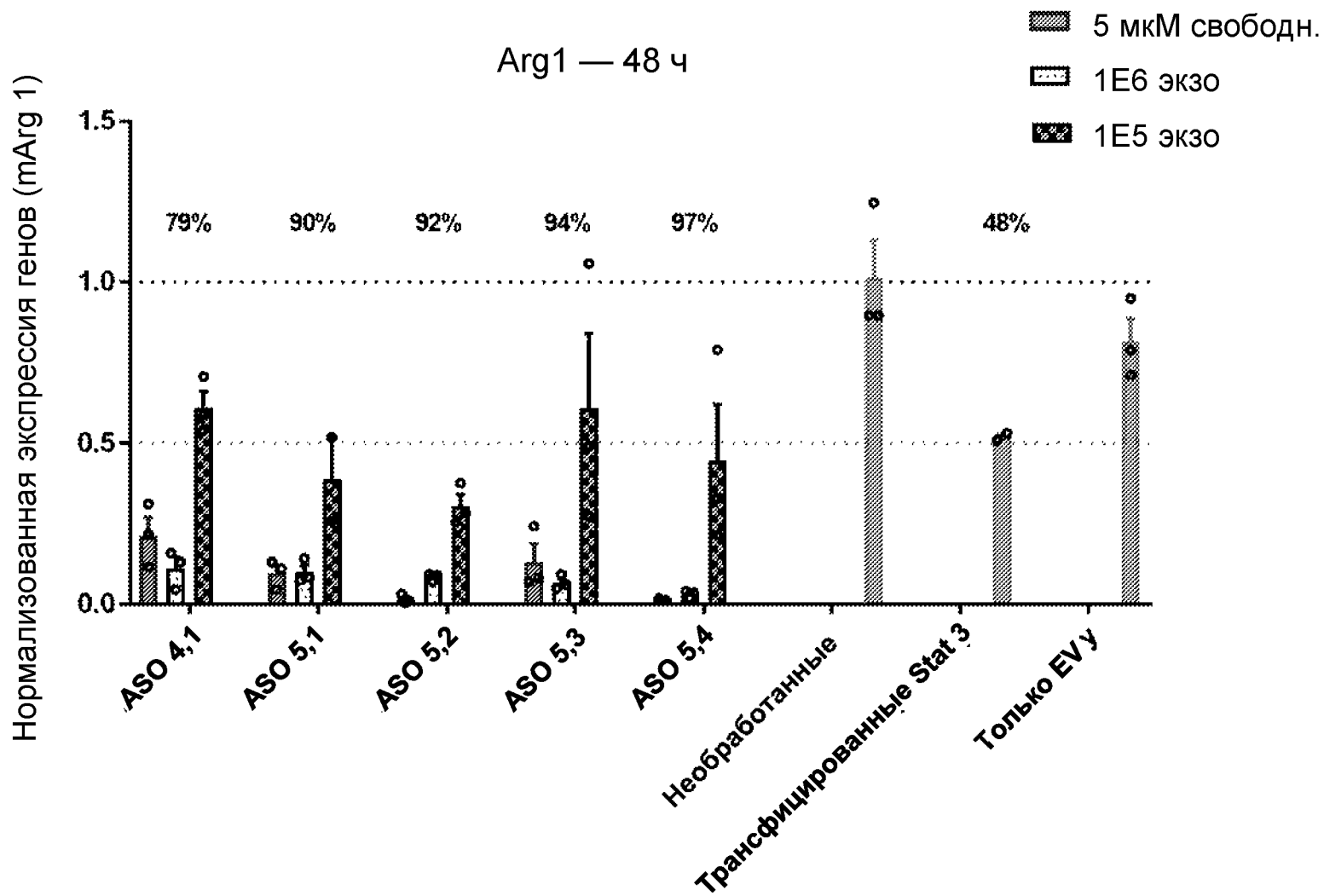
ФИГУРА 5В



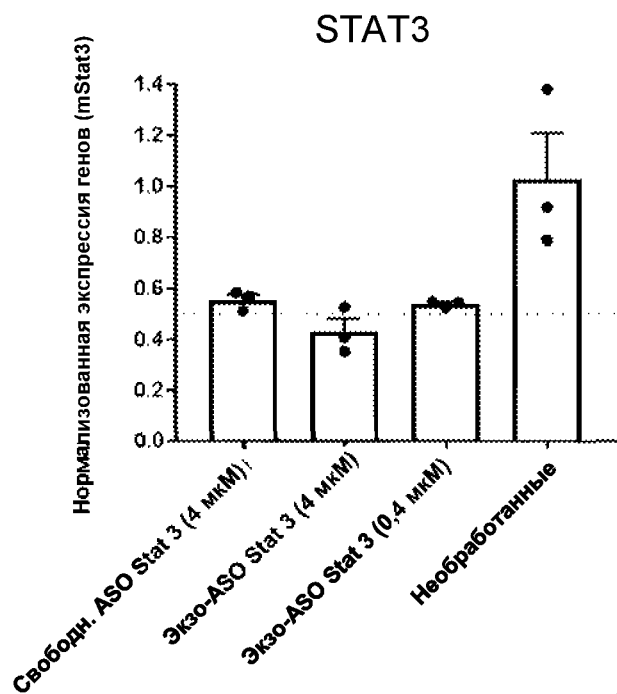
ФИГ. 6



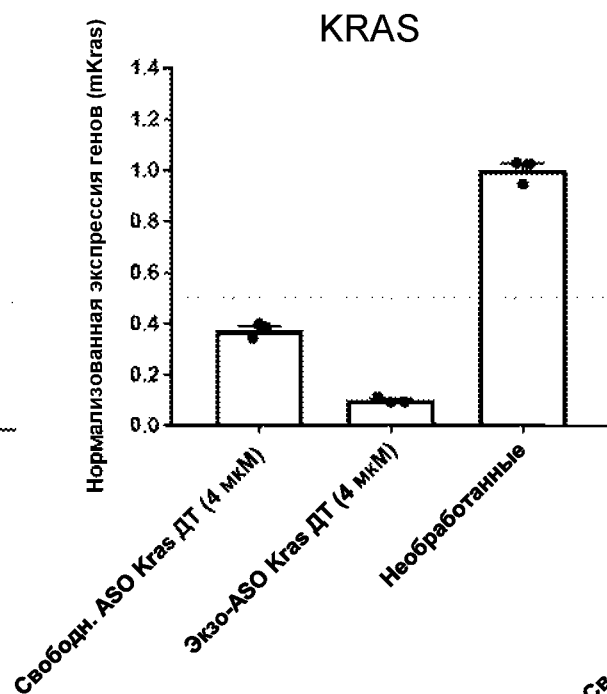
ФИГУРА 7



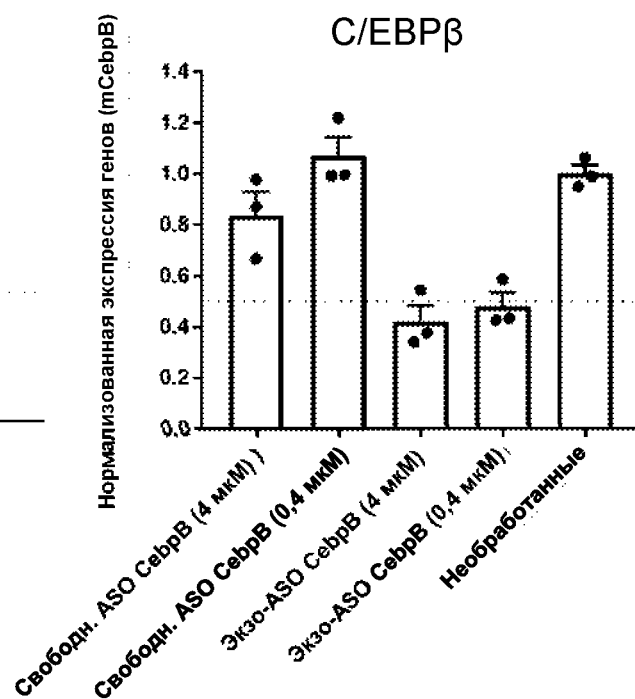
ФИГУРА 8А



ФИГУРА 8В

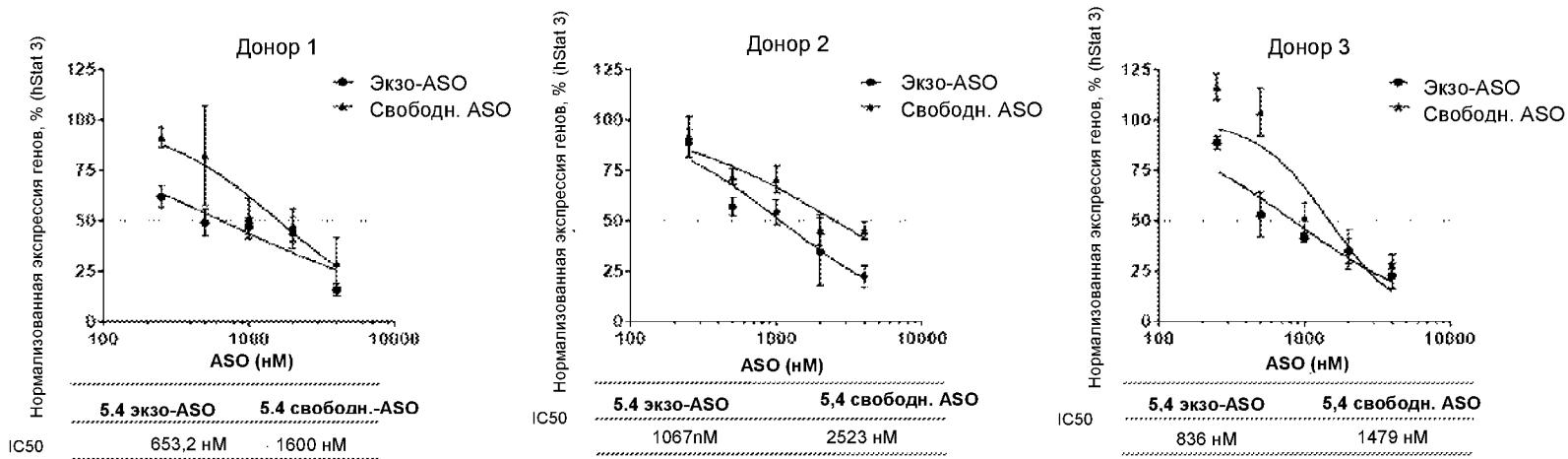


ФИГУРА 8С



ФИГУРА 9А

Stat 3 (24 ч)



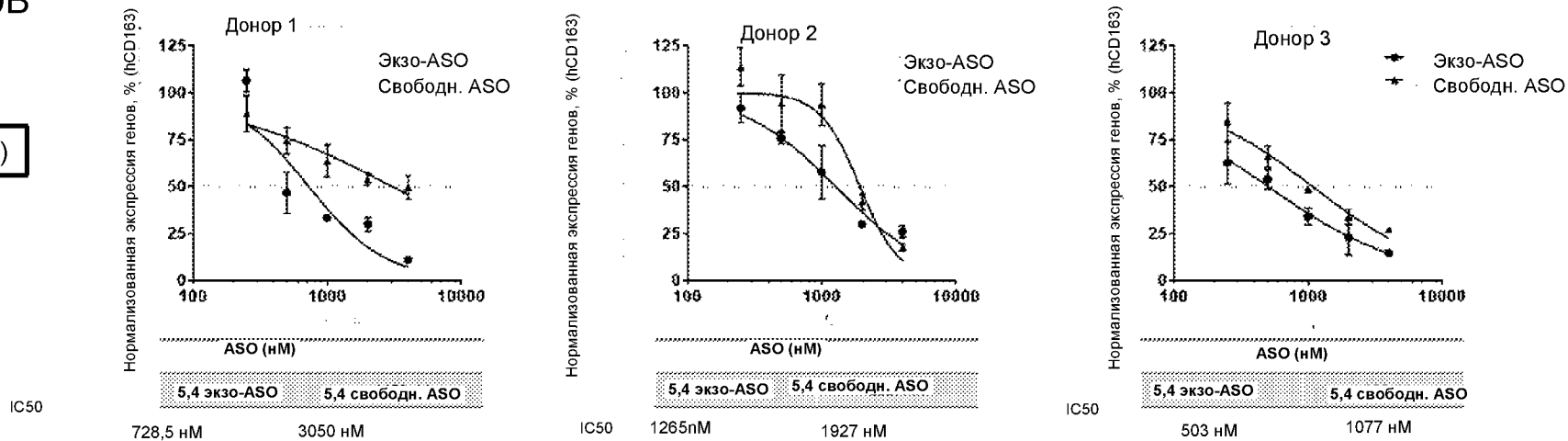
Кратность увеличения: 2,45

Кратность увеличения: 2,36

Кратность увеличения: 1,77

ФИГУРА 9В

CD163 (48 ч)

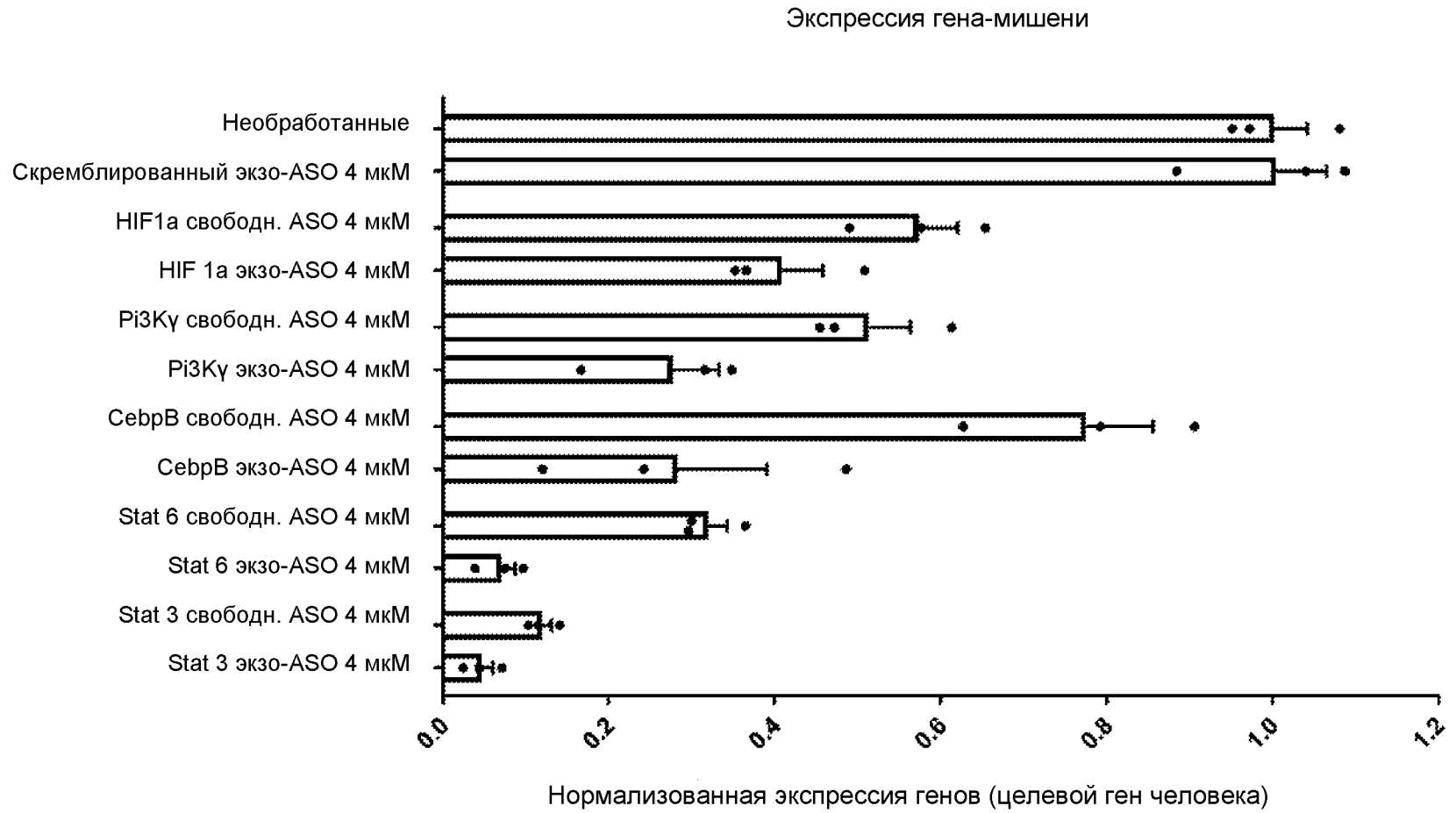


Кратность увеличения: 4,18

Кратность увеличения: 1,52

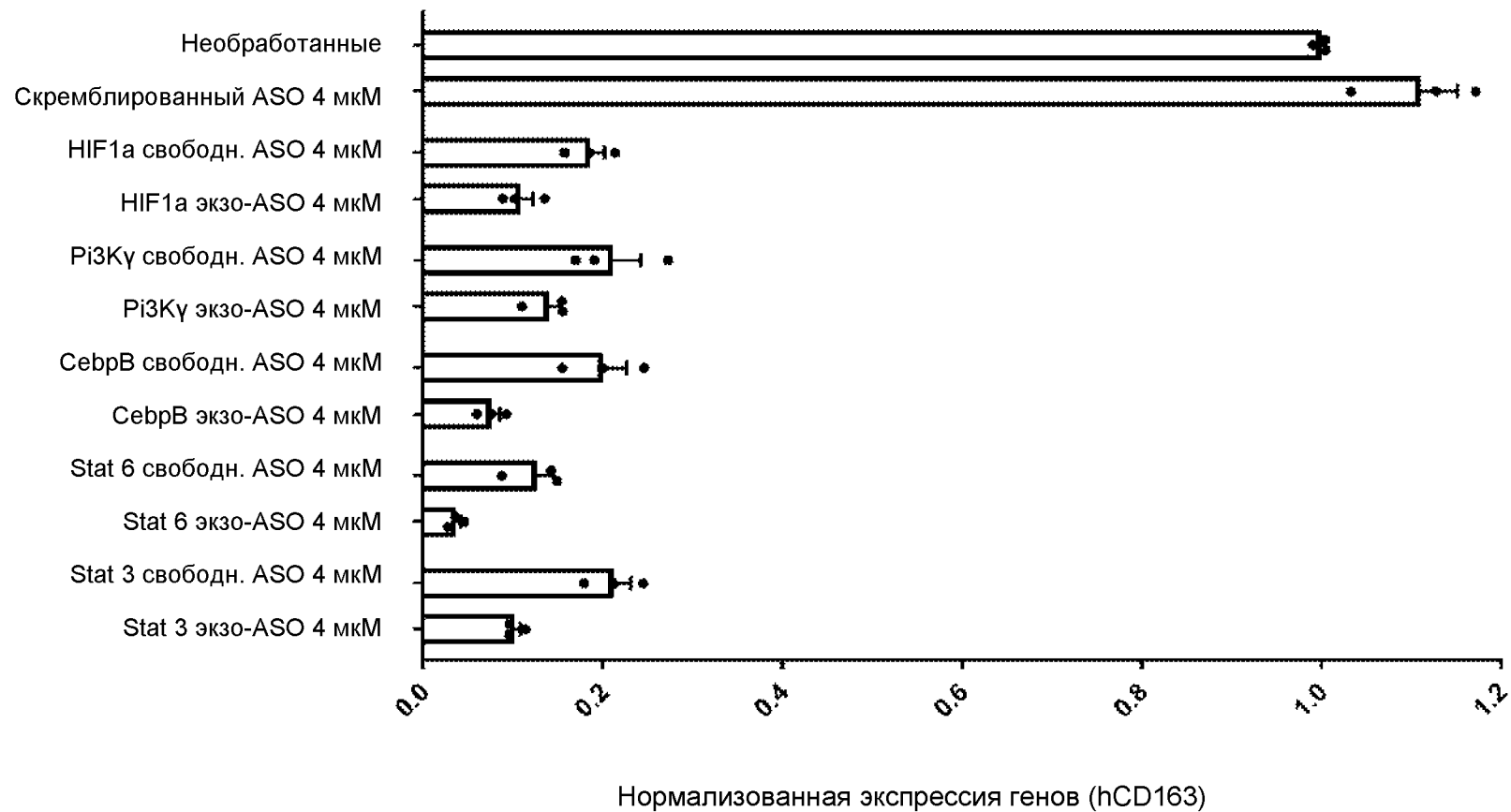
Кратность увеличения: 2,14

ФИГУРА 10

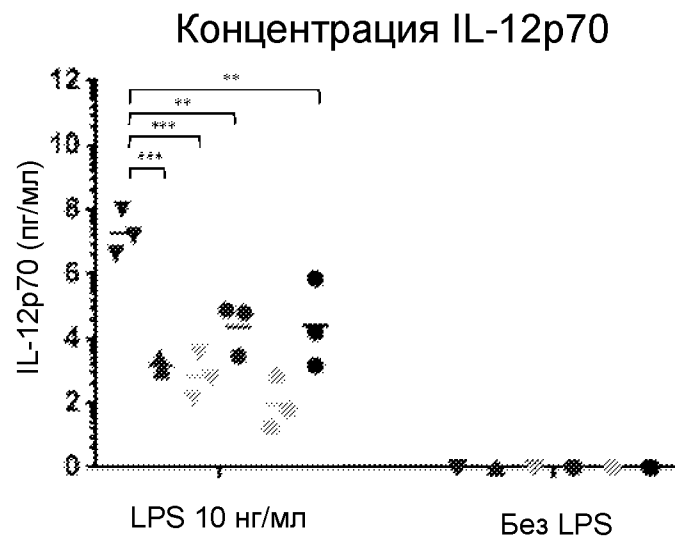


ФИГУРА 11

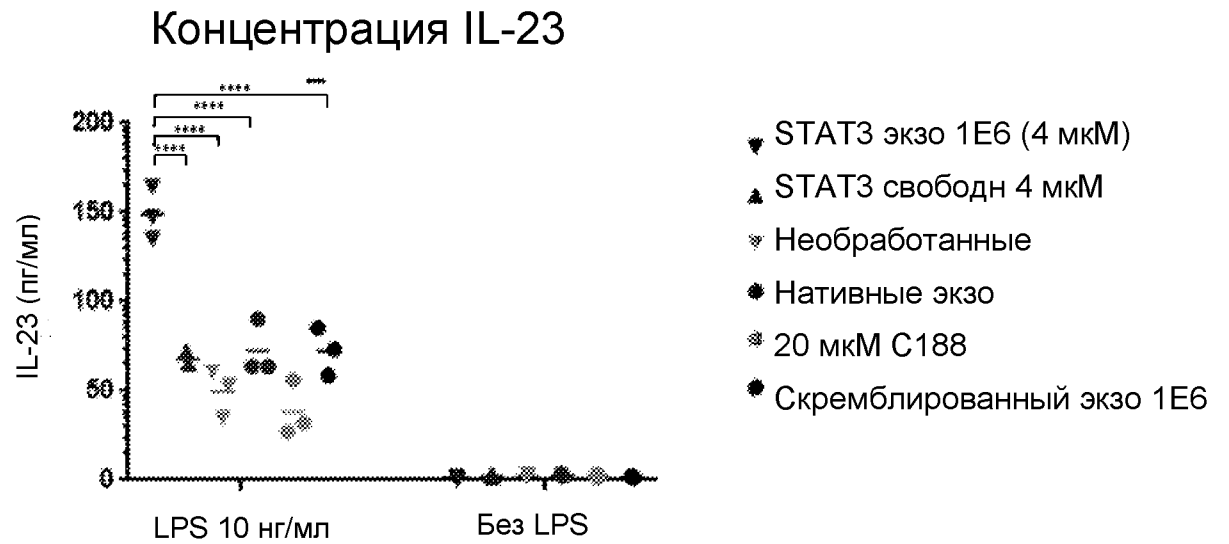
Экспрессия CD 163



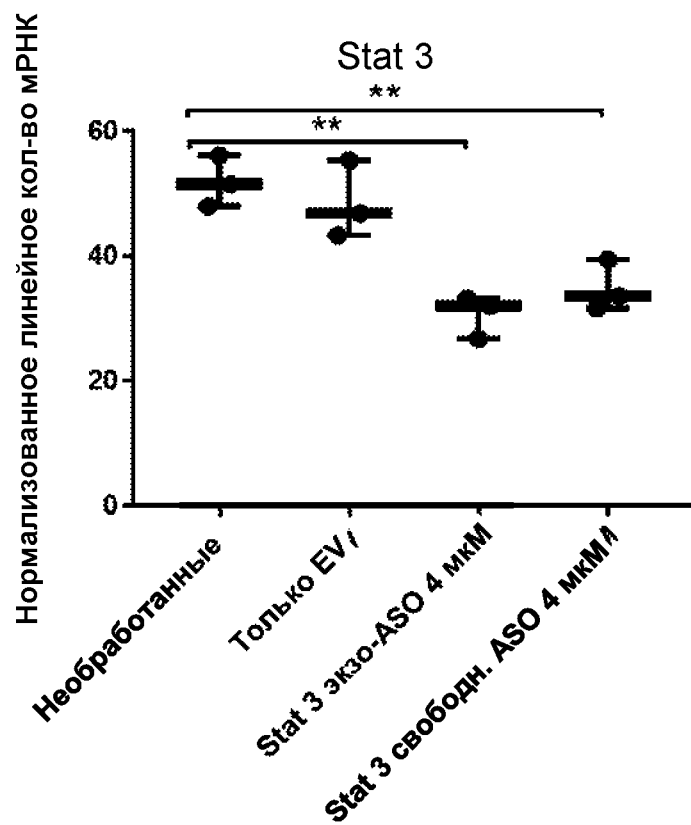
ФИГУРА 12А



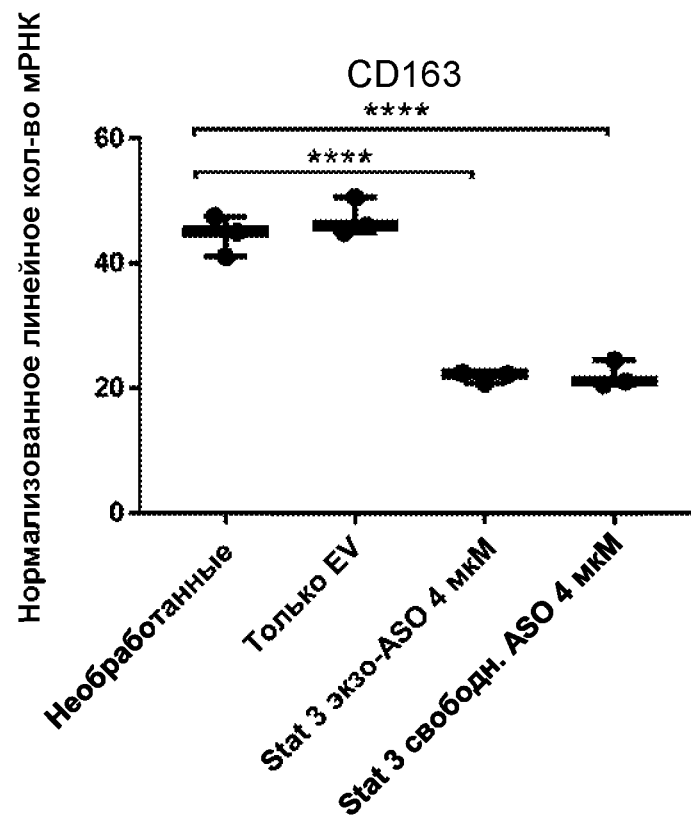
ФИГУРА 12В



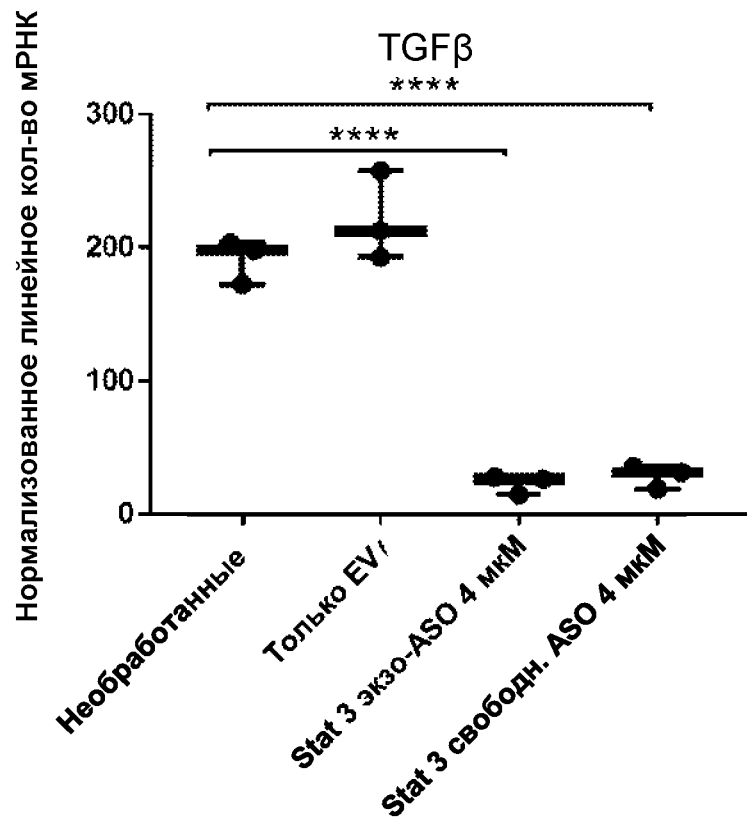
ФИГУРА 13А



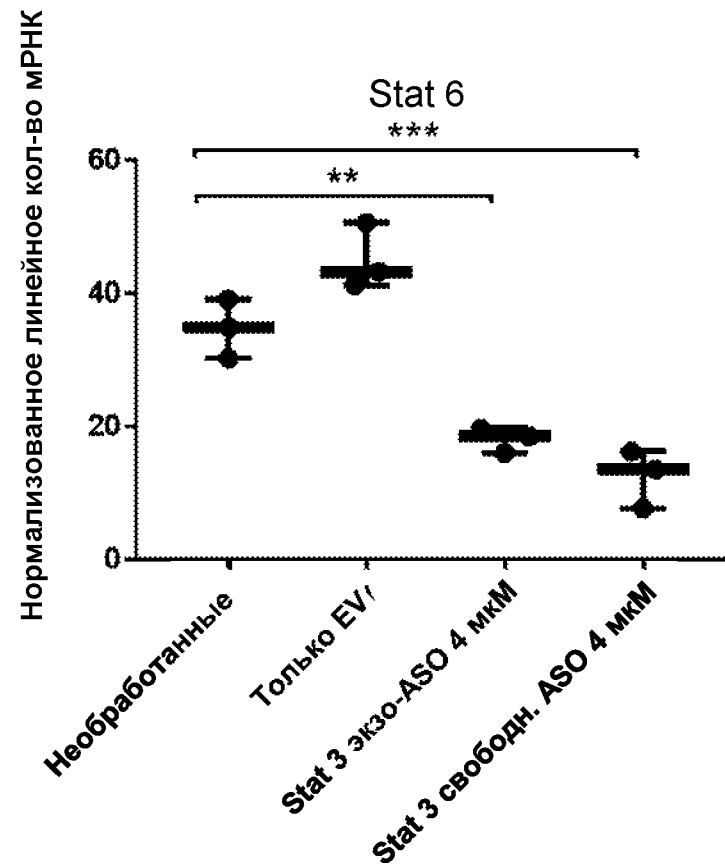
ФИГУРА 13В



ФИГУРА 13С



ФИГУРА 13D



ФИГУРА 14

