

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192490 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.18

(22) Дата подачи заявки
2020.03.20

(51) Int. Cl. *A61K 47/69* (2017.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/822,014; 62/835,439

(32) 2019.03.21; 2019.04.17

(33) US

(86) PCT/US2020/024057

(87) WO 2020/191377 2020.09.24

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

(72) Изобретатель:
Макконелл Расселл Е.,
Сатьянараянан Срирам (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Пармонова К.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Изобретение относится к внеклеточным везикулам (например, экзосомам), содержащим биологически активную молекулу, ковалентно связанную с внеклеточной везикулой посредством малеимидного фрагмента, которые могут быть применимы в качестве средства для профилактики или лечения рака и других заболеваний. В изобретении также предложены способы получения внеклеточных везикул и способы применения внеклеточных везикул для лечения заболеваний или нарушений.

A1

202192490

202192490

A1

КОНЬЮГАТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка РСТ испрашивает приоритет предварительных заявок США №№ 62/822014, поданной 21 марта 2019 г., и 62/835439, поданной 17 апреля 2019 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (название: 4000_037PC03_SL_ST25.txt, размер: 235506 байта; и дата создания: 20 марта 2020 г.), поданного в этой заявке, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] В настоящем изобретении предложены внеклеточные везикулы (ВВ), *например* экзосомы, содержащие по меньшей мере одну биологически активную молекулу, ковалентно связанную с внеклеточной везикулой, *например*, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента, которые могут быть пригодны в качестве агента для профилактики или лечения рака и других заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Многие биоактивные соединения обладают высокой биологической активностью, которая представляет терапевтический интерес. Однако эти соединения часто проявляют токсичность в нецелевых органах. Одним из способов ограничения воздействия на нецелевые ткани, является химическое конъюгирование малых молекул с реагентами на основе аффинности, такими как антитела, которые могут направлять терапевтическое соединение на определенные типы клеток (Dosio, F. *et al.*, *Toxins (Basel)* 3(7):848-883 (2011)), но этот подход ограничен количеством молекул соединения, представляющего интерес, которые могут быть присоединены к антителу (обычно 2-6 молекул на антитело), и доступностью/существованием антител, которые специфически связываются с целевыми соответствующими пораженными/эффекторными клетками без связывания с нецелевыми

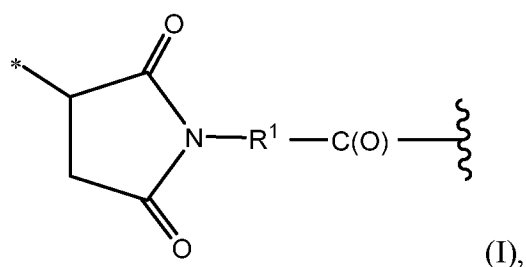
клетками. Эти две проблемы ограничивают применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) за счет снижения активности и увеличения системной токсичности соответственно. Соответственно, существует потребность в системах доставки с более высокой полезной нагрузкой, чем ADC, которые могут избирательно нацеливаться на определенные ткани или органы, в то же время ограничивая общее системное воздействие терапевтического соединения.

[0005] ВВ, *например*, экзосомы являются важными медиаторами межклеточной коммуникации. Они также являются важными биомаркерами в диагностике и прогнозе многих заболеваний, таких как рак. В качестве средств доставки лекарственных средств ВВ, *например*, экзосомы предлагают много преимуществ по сравнению с традиционными способами доставки лекарственных средств (*например*, пептидная иммунизация, ДНК-вакцины), представляя новый способ лечения во многих терапевтических областях. Однако, несмотря на свои преимущества, многие ВВ, *например*, экзосомы, имели ограниченную клиническую эффективность. Например, экзосомы, полученные из дендритных клеток (DEX), были исследованы в клиническом испытании II фазы в качестве поддерживающей иммунотерапии после химиотерапии первой линии у пациентов с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC). Однако испытание было прекращено, поскольку первичная конечная точка (по меньшей мере 50% пациентов с выживаемостью без прогрессирования (PFS) через 4 месяца после прекращения химиотерапии) не была достигнута. Besse, B., *et al.*, *Oncoimmunology* 5(4):e1071008 (2015).

[0006] Соответственно, необходимы новые и более эффективные сконструированные ВВ, *например*, экзосомы, для лучшего терапевтического применения и других путей применения технологий на основе ВВ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящем изобретении предложена внеклеточная везикула, *например*, экзосома, содержащая биологически активную молекулу, ковалентно связанную с ВВ, *например*, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (I):



(I),

где

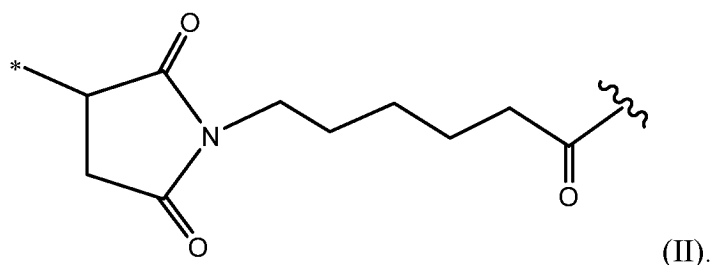
R^1 выбран из группы, состоящей из $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ карбоцикло-, $-O-(C_{1-8}$ алкилен)-, -арил-, $-C_{1-10}$ алкилен-арил-, -арил- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ карбоцикло)-, $-(C_{3-8}$ карбоцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ гетероцикло-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ гетероцикло)-, $-(C_{3-8}$ гетероцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_r$ и $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$;

r является целым числом от 1 до 10;

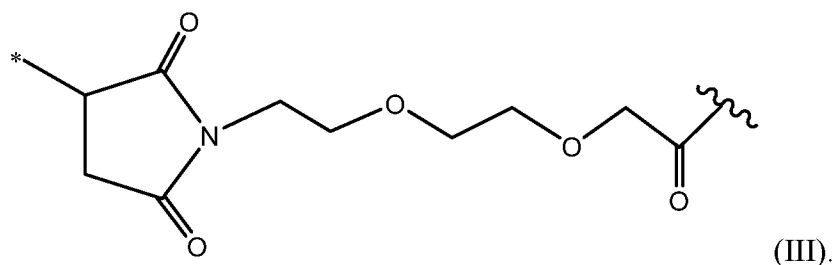
* указывает сайт ковалентного связывания малеимидного фрагмента с ВВ, например, экзосомой; и

волнистая линия указывает на сайт присоединения малеимидного фрагмента к биологически активной молекуле.

[0008] В некоторых аспектах R^1 представляет собой $-(CH_2)_s-$, где s равно 4, 5 или 6. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (II), где R^1 представляет собой $-(CH_2)_5-$:



[0009] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (III), где R^1 представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где r равно 2:



[0010] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ, например, экзосоме, где функциональная группа представляет собой сульфгидрильную группу. В некоторых аспектах сульфгидрильная группа находится на белке на поверхности ВВ, например, экзосоме. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент связан с биологически активной молекулой с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах расщепляемый линкер расщепляется протеазой. В некоторых аспектах протеаза представляет собой катепсин. В некоторых аспектах линкер представляет собой линкер, чувствительный к восстановлению, или кислотолабильный линкер.

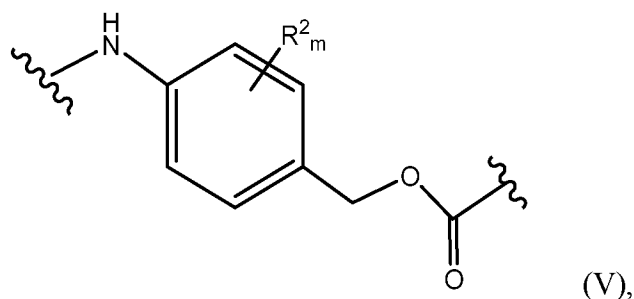
[0011] В некоторых аспектах линкер имеет формулу (IV):



где каждый $-A-$ независимо представляет собой аминокислотную единицу, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; $-Y-$ представляет собой спейсерную единицу, а y равно 0, 1 или 2.

[0012] В некоторых аспектах $-A_a-$ представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид. В некоторых аспектах a равно 2 и $-A_a-$ выбран из группы, состоящей из валин-аланина, валин-цитруллина, фенилаланин-лизина, N-метилвалин-цитруллина, циклогексилаланин-лизина и бета-аланин-лизина. В некоторых аспектах $-A_a-$ представляет собой валин-аланин или валин-цитруллин. В некоторых аспектах y равно 1.

[0013] В некоторых аспектах $-Y-$ представляет собой саморасщепляющийся спейсер. В некоторых аспектах $-Y_y-$ имеет формулу (V):

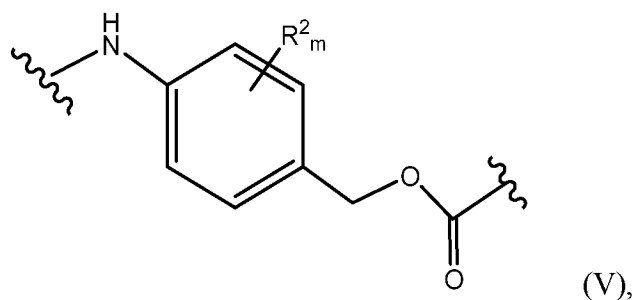


где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

[0014] В некоторых аспектах m равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах m равно 0. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат. В некоторых аспектах $-Y-$ представляет собой несаморасщепляющийся спейсер. В некоторых аспектах несаморасщепляющийся спейсер представляет собой $-Gly-$ или $-Gly-Gly-$.

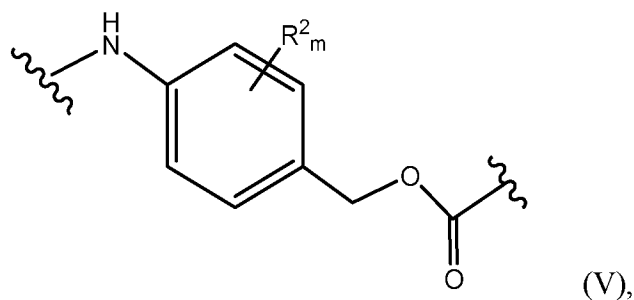
[0015] В некоторых аспектах линкер представляет собой кислотолабильный линкер. В некоторых аспектах кислотолабильный линкер представляет собой цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию. В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с кислотолабильным линкером.

[0016] В некоторых аспектах спейсерная единица имеет формулу (V):



где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

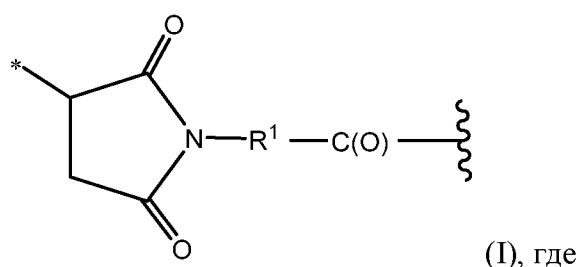
[0017] В некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит тетраэтиленгликоль (ТЭГ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером. В некоторых аспектах спейсерная единица имеет формулу (V):



где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

[0018] В настоящем изобретении также предложена ВВ, например экзосома, содержащая биологически активную молекулу и расщепляемый линкер, при этом расщепляемый линкер соединяет ВВ, например, экзосому, с биологически активной молекулой, и расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, дополнительно содержит малеимидный фрагмент, который связывает ВВ, например, экзосому, с расщепляемым линкером посредством функциональной группы, присутствующей на ВВ, например, экзосоме.

[0019] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (I):



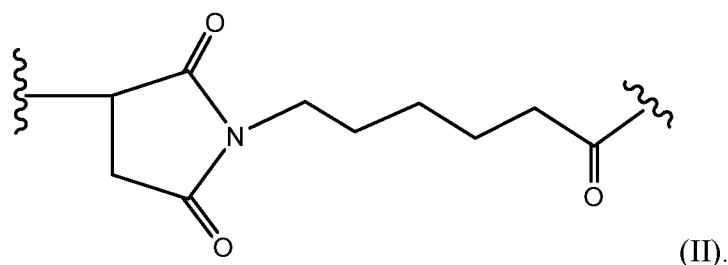
R^1 выбран из группы, состоящей из $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ карбоцикло-, $-O-(C_{1-8}$ алкилен)-, -арил-, $-C_{1-10}$ алкилен-арил-, -арил- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ карбоцикло)-, $-(C_{3-8}$ карбоцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ гетероцикло-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ гетероцикло)-, $-(C_{3-8}$ гетероцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_r$ и $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$;

r является целым числом от 1 до 10; и

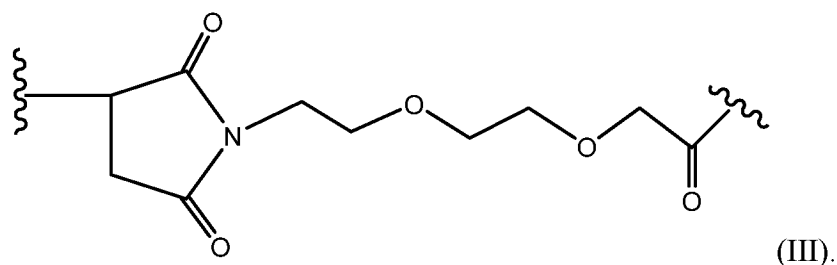
* указывает сайт ковалентного связывания малеимидного фрагмента с ВВ, например, экзосомой; и

волнистая линия указывает сайт присоединения малеимидного фрагмента к биологически активной молекуле.

[0020] В некоторых аспектах R^1 представляет собой $-(CH_2)_s-$, где s равно 4, 5 или 6. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (II), где R^1 представляет собой $-(CH_2)_5-$:



[0021] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (III), где R^1 представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где r равно 2:



[0022] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ, например, экзосоме. В некоторых аспектах функциональная группа находится на гликане на ВВ, например, экзосоме. В некоторых аспектах функциональная группа представляет собой сульфгидрил (тиол). В некоторых аспектах функциональная группа находится на белке на поверхности ВВ, например, экзосоме. В некоторых аспектах белок представляет собой каркасный фрагмент. В некоторых аспектах белок представляет собой полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид-переносчик АТФ или их фрагмент.

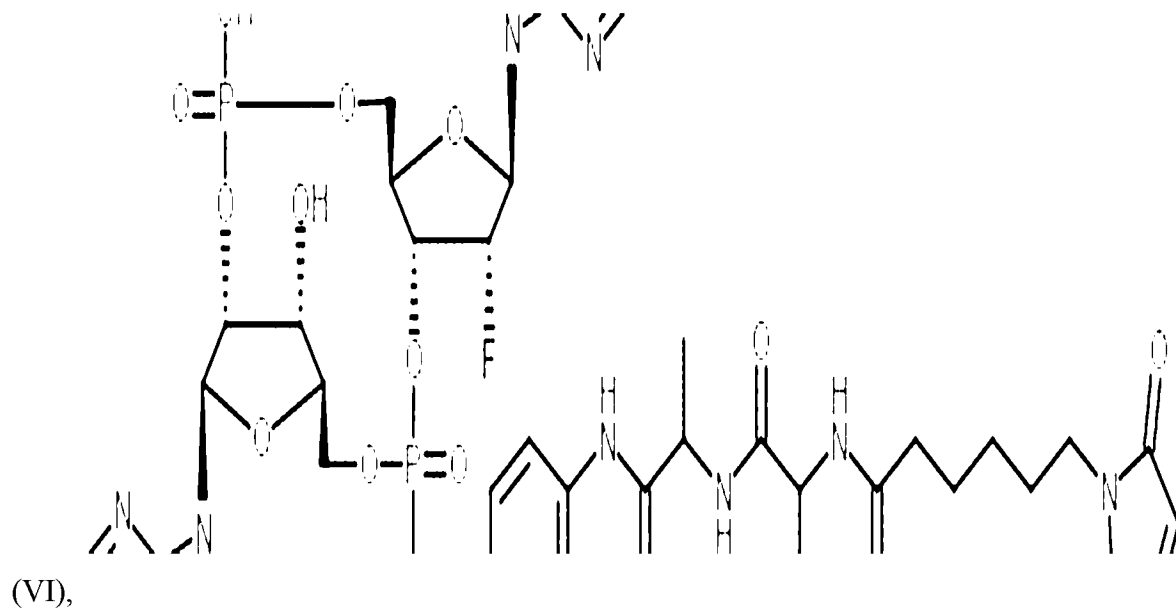
[0023] В настоящем изобретении также предложена ВВ, например, экзосома, содержащая малеимидный фрагмент, расщепляемый линкер и биологически активную

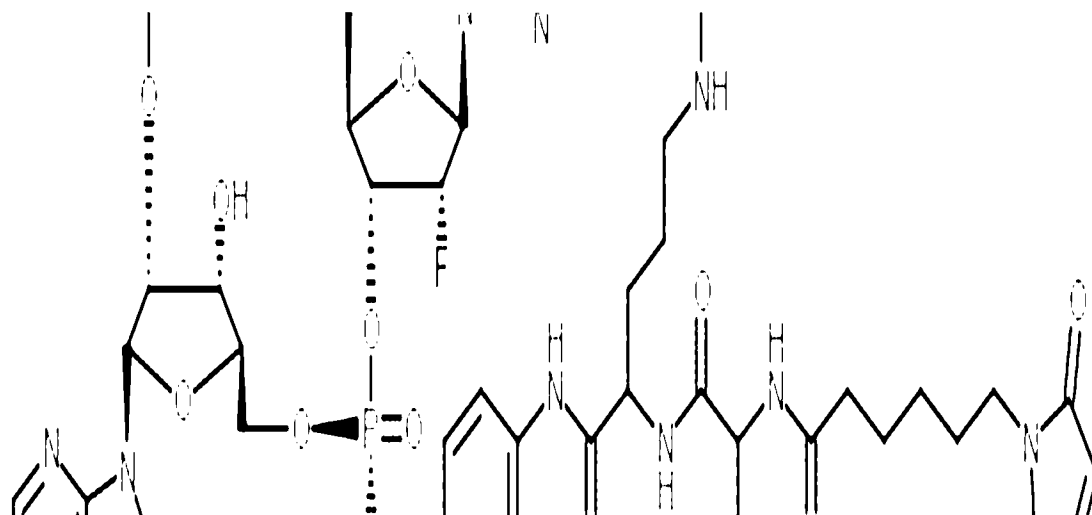
молекулу, при этом малеимидный фрагмент связывает ВВ, например, экзосому, с расщепляемым линкером, а расщепляемый линкер связывает малеимидный фрагмент биологически активной молекулы.

[0024] В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой химическое соединение. В некоторых аспектах химическое соединение представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах малая молекула представляет собой химерное соединение, нацеленное на протеолиз (PROTAC).

[0025] В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой нуклеотид, при этом нуклеотид является агонистом стимулятора генов интерферона (STING). В некоторых аспектах агонист STING включает циклический динуклеотидный агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING.

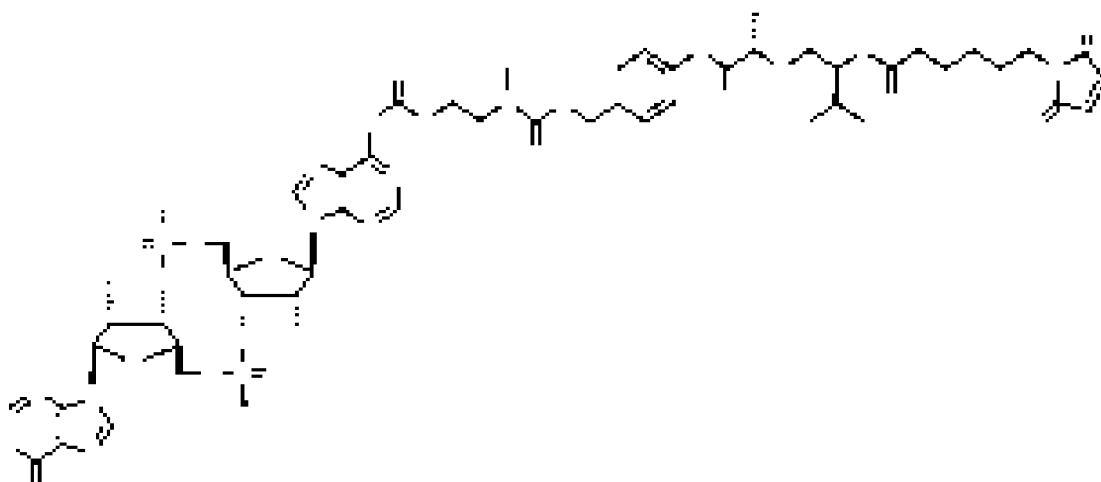
[0026] В некоторых аспектах ВВ содержит (малеимидный фрагмент)-(расщепляемый линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (VI) или (VII):



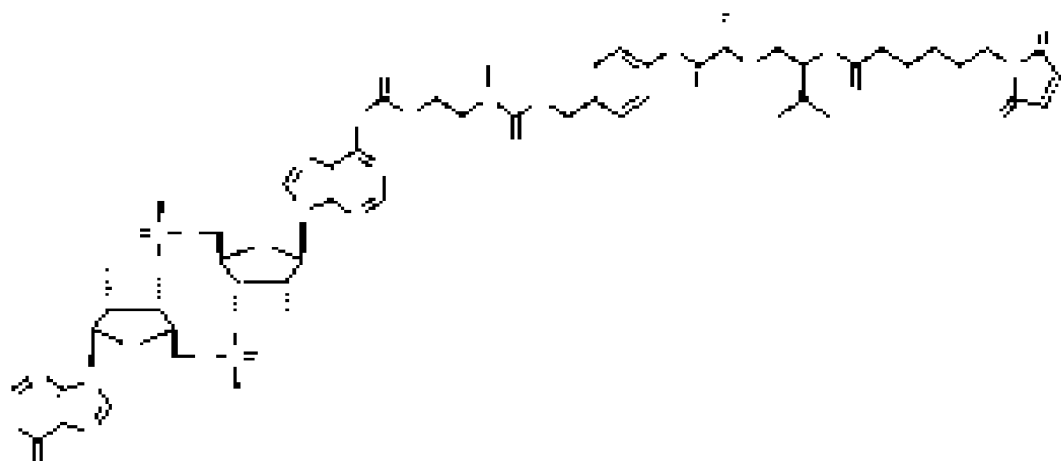


(VII) или их фармацевтически приемлемую соль.

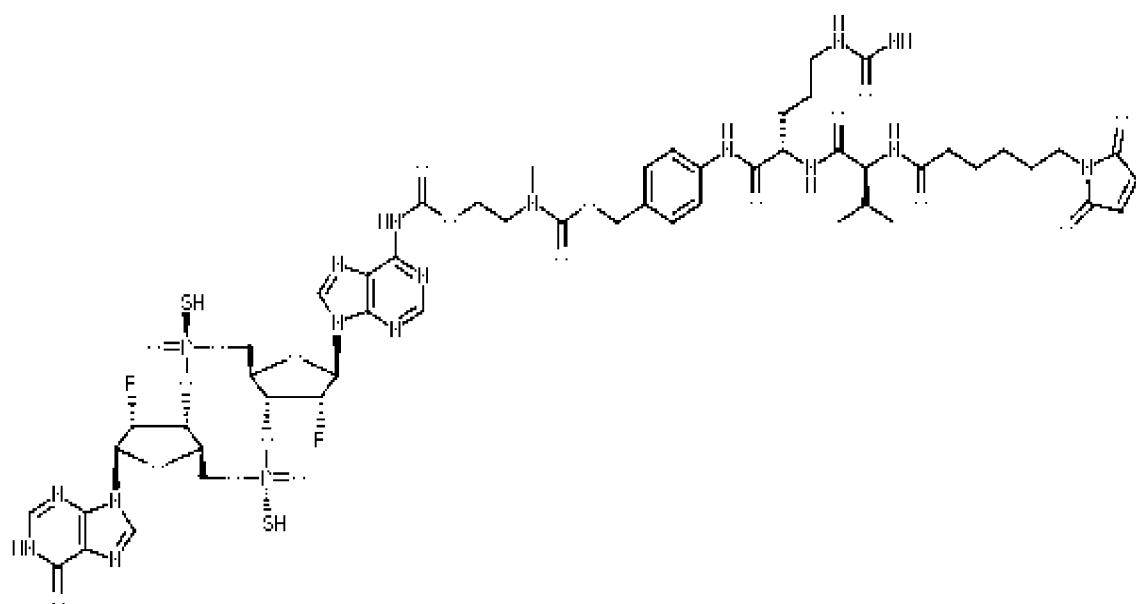
[0027] В некоторых аспектах ВВ содержит (малеимидный фрагмент)-(расщепляемый линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (VIII), (IX), (X) или (XI):



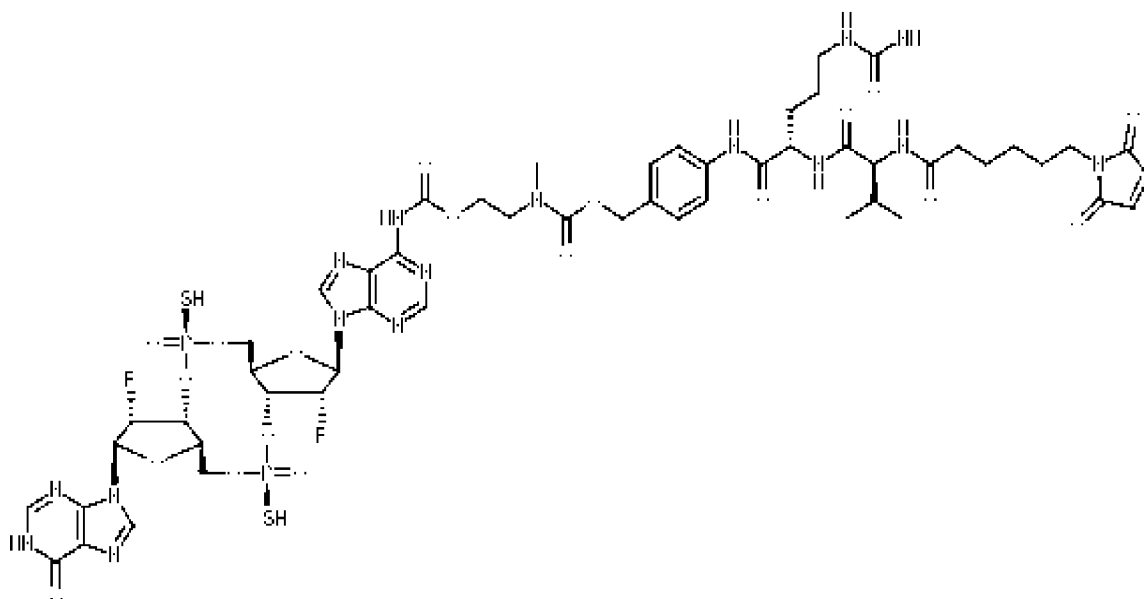
(VIII),



(IX),



(X),



(XI) или их фармацевтически приемлемую соль.

[0028] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицируется для экспонирования функциональной группы на поверхности для ковалентного связывания малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах функциональная группа представляет собой сульфгидрильную группу. В некоторых аспектах функциональная группа экспонируется с помощью обработки ВВ, например, экзосомы, восстанавливающим агентом. В некоторых аспектах восстанавливающий агент включает ТСЕР (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин), DTT (дителиотреитол), ВМЕ (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент или любую их комбинацию. В некоторых аспектах тиолирующий агент представляет собой реагент Траута (2-иминотиолан).

[0029] В аспектах ВВ по настоящему изобретению представляют собой экзосомы.

[0030] В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0031] В настоящем изобретении также предложен способ конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, например, экзосомой, включающий связывание малеимидного фрагмента с ВВ, например, экзосомой. В некоторых аспектах связывание включает обработку ВВ, например экзосомы, восстанавливающим агентом. В некоторых аспектах восстанавливающий агент представляет собой включает ТСЕР (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин), DTT (дителиотреитол), ВМЕ (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент или любую их комбинацию. В некоторых аспектах тиолирующий агент представляет собой реагент Траута (2-иминотиолан). В некоторых аспектах связывание дополнительно

включает приведение восстановленной ВВ, например, экзосомы, в контакт с малеимидным фрагментом. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент химически связан с биологически активной молекулой до связывания с ВВ, например, экзосомой. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент химически связан с линкером для соединения малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой.

[0032] В настоящем изобретении также предложен набор, содержащий ВВ, например, экзосому, раскрываемую в данном документе, и инструкции по применению. Также предложен набор, содержащий реагенты для конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, например, экзосомой, и инструкции по проведению конъюгации, за счет чего образуется ВВ, например, экзосома по настоящему изобретению.

[0033] В настоящем изобретении также предложен способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению. В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное нарушение, нейродегенеративное расстройство, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ. В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, вводится внутривенно, внутривнутрибрюшинно, назально, перорально, внутримышечно, подкожно, парентерально, интратекально, интраокулярно или интратуморально.

[0034] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена внеклеточная везикула (ВВ), содержащая по меньшей мере одну биологически активную молекулу, ковалентно связанную с каркасным фрагментом посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент представляет собой бифункциональную молекулу. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент содержит по меньшей мере один линкер или спейсер. В некоторых аспектах линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах каркасный фрагмент представляет собой каркасный белок или каркасный липид. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой белок каркаса X. В некоторых аспектах белок каркаса X представляет собой полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид-переносчик АТФ или их фрагмент. В некоторых аспектах биологически активная молекула включает антиген вакцины, адъювант вакцины или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активная молекула включает STING, ASO, синтетический противоопухолевый агент (например, MMAE), ингибитор высвобождения цитокинов (например, MCC950), ингибитор mTOR (например, рапамицин), ингибитор аутоаксина (например, PAT409), антагонист LPA1 (например, AM152) или любую их комбинацию. В

некоторых аспектах внеклеточная везикула дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма, антифагоцитарный сигнальный фрагмент или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма, антифагоцитарный сигнальный фрагмент или их комбинация связаны с внеклеточной везикулой посредством малеимидного фрагмента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[0035] На **Фиг. 1А** представлено схематическое изображение, показывающее, как химическая структура малеимида может быть использована для химического связывания биологически активной молекулы (ВАМ) с ВВ (например, экзосомой), например, посредством каркасного фрагмента, описанного в данном документе (например, белка каркаса X или его фрагмента или липида). Линкеры, изображенные на чертеже, являются необязательными и, если они присутствуют, могут представлять собой линкер (например, расщепляемый линкер) или их комбинацию.

[0036] На **Фиг. 1В** представлены примеры соединений-агонистов STING, которые могут быть связаны с ВВ: CP227 (Val-Ala, связанный с малеимидным фрагментом), CP229 (Val-Cit, связанный с малеимидным фрагментом), CP238 (Val-Ala, связанный с холестерином), CP246 (Val-Ala, связанный с сукцинимидом), CP240 (без линкера), CP249 (Val-Ala, связанный с малеимидным фрагментом), CP250 (Val-Ala, связанный с малеимидным фрагментом), CP260 (Val-Cit, связанный с малеимидным фрагментом) и CP261 (Val-Cit, связанный с малеимидным фрагментом).

[0037] На **Фиг. 2** представлены результаты анализов РВМС, оценивающих агонизм STING (IFN- β) сульфгидрильных или аминореактивных соединений. Исследовали активность свободных соединений-агонистов STING (заштрихованные кружки) и соединений-агонистов STING, загруженных на экзосомы (незаштрихованные кружки). Ехо CP227 представляет собой CP227, конъюгированный с ВВ посредством Val-Ala, связанного с малеимидным фрагментом; Ехо-CP229 представляет собой CP229, конъюгированный с ВВ посредством Val-Cit, связанного с малеимидным фрагментом; Ехо-CP232 представляет собой CP232, конъюгированный с ВВ без какого-либо линкера; Ехо-CP246 представляет собой CP246, конъюгированный с ВВ посредством Val-Cit, связанного с сукцинимидом; и Ехо-CP250 представляет собой CP250, конъюгированный с ВВ посредством Val-Cit, связанного с малеимидным фрагментом. 500000 РВМС/лунка инкубировали в течение ночи с экзосомами. Высвобождение интерферона бета (IFN- β) в супернатант клеточной культуры измеряли с помощью ELISA.

[0038] На **Фиг. 3А-3С** представлены результаты анализов РВМС, сравнивающих химические структуры, реагирующие с сульфгидрилом и ассоциированных с липидами, для загрузки агонистов STING (графики в центре). На **Фиг. 3А** представлено сравнение высвобождения IFN γ и EC₅₀ CP227 и EхоCP227, который представляет собой CP227, конъюгированный с ВВ посредством Val-Ala, связанного с малеимидным фрагментом. На **Фиг. 3В** представлено сравнение высвобождения IFN γ и EC₅₀ CP229 и EхоCP229, который представляет собой CP229, конъюгированный с ВВ посредством Val-Cit, связанного с малеимидным фрагментом. На **Фиг. 3С** представлено сравнение высвобождения IFN γ и EC₅₀ CP238 и EхоCP238, который представляет собой CP238, конъюгированный с ВВ посредством Val-Ala, связанного с холестерином.

[0039] На **Фиг. 4А** представлены данные сравнения высвобождения IFN γ в анализах РВМС между ADUS100 и EхоADUS100, который представляет собой ADUS100, инкапсулированный (в просвете) в ВВ. На **Фиг. 4В** представлены данные сравнения высвобождения IFN γ в анализах РВМС между CL656 и EхоCL656, который представляет собой CL656, инкапсулированный (в просвете) в ВВ. На **Фиг. 4С** представлены EC₅₀ различных агонистов STING и агонистов Eхо-STING, описанных на **Фиг. 3А-3С** и **4А-4В**.

[0040] На **Фиг. 5А** представлена эффективность загрузки ВВ: ехоCP227, ехоCP229, ехоCP250, ехоCP238, ехоCP232 и ехоCP246. Структура ВВ описана выше. Количество агонистов STING, загруженных на каждую ВВ, показано для двух экспериментов. На **Фиг. 5В** представлено сравнение EC₅₀ различных агонистов STING и ВВ: CP227, ехо-CP227, CP229, ехо-CP229, CP238, ехо-CP238, ADUS100, ехоADUS100, CL656, ехоCL656 и ехоCP250.

[0041] На **Фиг. 6** представлена структура монометилауристатина Е (ММАЕ) и малеимид-Val-Cit-РАВС-ММАЕ (vc-ММАЕ).

[0042] На **Фиг. 7** представлена цитотоксичность ММАЕ, оцененная на клетках RAW264.7 (RAW), клеточной линии макрофагов человека. Дозозависимые эффекты ММАЕ в отношении роста клеток RAW изображены на микрофотографиях (вверху) и измерениях роста клеток (внизу слева) и конфлюентности (внизу справа).

[0043] На **Фиг. 8А** представлены данные конфлюентности, сравнивающие эффективность ММАЕ в свободной форме (ММАЕ) или с линкером малеимид-Val-Cit-РАВС (vc-ММАЕ).

[0044] На **Фиг. 8В** представлены данные конфлюентности, измеряющие эффективность ММАЕ после очистки экзосом после инкубации экзосом со свободным ММАЕ. Экзосомы промывали гидрохлоридом гуанидиния в концентрациях от 0,1 М до 2 М.

[0045] На **Фиг. 8С** представлены данные конфлюентности, измеряющие эффективность ММАЕ после очистки экзосом после инкубации экзосом с Val-Cit-MMAE. Экзосомы промывали гидрохлоридом гуанидиния в концентрациях от 0,1 М до 2 М.

[0046] На **Фиг. 8D** представлены данные конфлюентности, измеряющие эффективность ММАЕ после инкубации экзосом с Val-Cit-MMAE или свободным ММАЕ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях. Экзосомы инкубировали с Val-Cit-MMAE или ММАЕ в присутствии или в отсутствие 5 мМ ТСЕР.

[0047] На **Фиг. 9А** изображено влияние восстанавливающих условий (от 0 мМ ТСЕР до 50 мМ ТСЕР), загрузочной концентрации соединения (от 10 Мк до 100 мкМ vs-MMAE) и присутствия или отсутствия гидрохлорида гуанидиния (0 М или 1 М) в отношении эффективности экзосом, загруженных Val-Cit-MMAE. На **Фиг. 9В** изображено влияние восстанавливающих условий (от 0 мМ ТСЕР до 50 мМ ТСЕР), загрузочной концентрации соединения (100 Мк или 300 мкМ vs-MMAE) и присутствия или отсутствия гидрохлорида гуанидиния (0 М или 1 М) в отношении эффективности экзосом, загруженных Val-Cit-MMAE.

[0048] На **Фиг. 10А** схематически представлен PROTAC (химерное соединение, нацеленное на протеолиз).

[0049] На **Фиг. 10В** схематично представлен механизм действия PROTAC.

[0050] На **Фиг. 10С** изображена формула, соответствующая PROTAC, содержащему фрагмент лиганда, связывающий VHL (E3-лигазу), линкер и лиганд нацеливания на TBK1 (TANK-связывающую киназу 1). Формула демонстрирует потенциальные сайты (обозначены звездочками) на фрагменте лиганда, связывающего VHL (E3-лигаза), которые чувствительны к дериватизации с малеимидным линкером для химического связывания PROTAC с внеклеточной везикулой, например, экзосомой.

[0051] На **Фиг. 11** схематично представлен механизм действия CLIPAC.

[0052] На **Фиг. 12** изображены химические структуры AM152 (циклопропанкарбоновая кислота, 1-[4'-[3-метил-4-[[[(1R)-1-фенилэтокси]карбонил]амино]-5-изоксазолил][1,1'-бифенил]-4-ил]-) и AM095 (1,1'-бифенил]-4-уксусная кислота, 4'-[3-метил-4-[[[(1R)-1-фенилэтокси]карбонил]амино]-5-изоксазолил]-). Стрелки, обозначенные 1 и 2, указывают места (карбоновая кислота и карбамат), подходящие для образования реакционноспособной группы с малеимидом. Соответствующие сайты, указанные в AM152, также присутствуют в AM095.

[0053] На **Фиг. 13** представлено схематическое изображение, показывающее конъюгацию антагониста LPA1 (AM152) с экзосомами с получением популяции экзосом, содержащих множество молекул антагониста LPA1 на своей поверхности.

[0054] На Фиг. 14 представлен пример того, как реакционноспособная группа с малеимидом может быть добавлена к AM152 посредством его группы карбоновой кислоты. В примере показана малеимидная группа как часть реактивного комплекса, включающего расщепляемый линкер Ala-Val и спейсер C5, расположенный между малеимидной группой и хлорметилбензольной группой, реагирующей с карбоновой кислотой.

[0055] На Фиг. 15 представлены два иллюстративных реагента, которые можно использовать для дериватизации AM152. Верхний реагент содержит (i) хлорметилбензольную группу, которая может реагировать с группой карбоновой кислоты AM152, и (ii) малеимидную группу. Между (i) и (ii) расположены расщепляемый дипептид Cit-Val и спейсер C5. Нижний реагент содержит (i) хлорметилбензольную группу, которая может реагировать с группой карбоновой кислоты AM152, и (ii) малеимидную группу, и между (i) и (ii) расположены расщепляемый дипептид Ala-Val и спейсер C5.

[0056] На Фиг. 16 изображен продукт, полученный в результате расщепления дипептида Cit-Val или Ala-Val (например, катепсином В) в продукте конъюгации. Продукт, сложный эфир анилина AM152, может быть дополнительно обработан эндогенной эстеразой с получением продукта AM152 в виде свободной кислоты.

[0057] На Фиг. 17 и 18 изображены несколько производных AM152, содержащих свободную малеимидную группу и различные комбинации спейсеров.

[0058] На Фиг. 19 представлено, что после защиты группы карбоновой кислоты можно использовать те же реагенты, которые использовались для дериватизации группы карбоновой кислоты для дериватизации AM152 по его карбаматной группе. В полученном продукте впоследствии будет снята защита, чтобы освободить группу карбоновой кислоты.

[0059] На Фиг. 20 представлен пример, в котором комплекс с малеимидной группой химически связан с карбаматной группой AM152 посредством линкера. Подходящие линкеры включают любые линкеры, раскрытые в настоящем описании.

[0060] На Фиг. 21 изображено, что AM152 может быть химически связан с дериватизированным каркасным фрагментом вместо того, чтобы дериватизироваться и впоследствии присоединяться к каркасному фрагменту посредством реакционноспособной малеимидной группы.

[0061] На Фиг. 22 изображены структуры (i) MCC950, (ii) бифункциональных реагентов, которые можно использовать для дериватизации MCC950 для введения реакционноспособной группы с малеимидом, и (iii) производных MCC950, содержащих реакционноспособную группу с малеимидом. Бензольные группы бифункциональных реагентов (**) могут реагировать с карбаматной группой MCC950 (*), приводя к образованию изображенных производных MCC950.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0062] Настоящее изобретение направлено на внеклеточные везикулы (ВВ), *например*, экзосомы, содержащие по меньшей мере одну биологически активную молекулу, ковалентно связанную с ВВ, *например*, экзосому, посредством малеимидного фрагмента, и пути их применения. ВВ, *например*, экзосомы, содержащие биологически активную молекулу, связанную посредством малеимидного фрагмента, демонстрируют более эффективные свойства по сравнению с обычными фрагментами, *например*, холестерином или сукцинимидом. В настоящем изобретении представлены неограничивающие примеры различных аспектов.

[0063] Прежде чем настоящее изобретение будет описано более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями или стадиями процессов, поскольку таковые, конечно, могут варьироваться. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого раскрытия, каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других аспектов без отклонения от объема или сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ может выполняться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0064] Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть определены со ссылкой на описание в целом. Следует также понимать, что терминология, используемая в данном документе, применяется только для описания конкретных аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0065] Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

I. Определения

[0066] Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0067] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или несколько; *например*, «нуклеотидная последовательность» означает

одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Следует также отметить, что в формулу настоящего 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 ограничения.

[0068] Кроме того, в контексте настоящего изобретения «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0069] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по сути из».

[0070] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалисту общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0071] Единицы, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. При приведении диапазона значений следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его часть между указанными верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут независимо включаться в этот диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в который включены любой из пределов, ни один из пределов либо оба предела, также охватывается настоящим изобретением. Таким образом, считается, что

диапазоны, указанные в данном документе, являются сокращением для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, под диапазоном «от 1 до 10» понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

[0072] Если значение указано явно, следует понимать, что значения, которые имеют приблизительно такое же количество или количество, как и указанное значение, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. При раскрытии комбинации, каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и находится в пределах объема настоящего изобретения. И наоборот, если по отдельности раскрываются различные элементы или группы элементов, также раскрываются их комбинации. Если любой элемент настоящего изобретения раскрывается как имеющий множество альтернатив, также в данном документе раскрываются примеры настоящего изобретения, в которых каждая альтернатива исключена по отдельности или в любой комбинации с другими альтернативами; более чем один элемент настоящего изобретения может иметь такие исключения, и тем самым раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[0073] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5'- до 3'-конца. Нуклеотиды обозначаются их общеизвестными однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Соответственно, А представляет собой аденин, С представляет собой цитозин, G представляет собой гуанин, Т представляет собой тимин, U представляет собой урицил.

[0074] Аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от амино до карбокси. Аминокислоты обозначаются в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[0075] В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «приблизительно» применяется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «приблизительно» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0076] Термины «введение», «осуществление введения» и их грамматические варианты относятся к введению композиции, такой как ВВ (*например* экзосома) по настоящему изобретению, в организм субъекта фармацевтически приемлемым путем.

Введение композиции, такой как ВВ (*например* экзосома) по настоящему изобретению, в организм субъекта любым подходящим путем, включая внутритуморально, перорально, пульмонально, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно, или подкожно), ректально, внутрилимфатически, интратекально, периокулярно или местно. Введение включает в себя самовведение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту выполнять свою предполагаемую функцию. Например, если подходящим путем является внутривенный, композицию вводят путем введения композиции или агента в вену субъекта.

[0077] В контексте данного документа термин «агонист» относится к молекуле, которая связывается с рецептором и активирует рецептор, вызывая биологический ответ. Рецепторы могут активироваться либо эндогенным, либо экзогенным агонистом. Неограничивающие примеры эндогенных агонистов включают гормоны, нейромедиаторы и циклические динуклеотиды. Неограничивающие примеры экзогенных агонистов включают лекарственные средства, малые молекулы и циклические динуклеотиды. Агонист может представлять собой полный, частичный или обратный агонист.

[0078] Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или референтной последовательности (*например* последовательности дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или референтной последовательности (*например* в последовательности полипептида дикого типа), например, с помощью химического пептидного синтеза или рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. В некоторых аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, которая присутствует в природе или изначально в положении n, и Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замен могут быть описаны в соответствии со схемой An (YZ), при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y и Z представляют собой альтернативные заменяющие аминокислотные остатки, которые могут заменить A.

[0079] В контексте данного документа термин «антагонист» относится к молекуле, которая блокирует или подавляет опосредованный агонистом ответ, а не сам вызывает биологический ответ при связывании с рецептором. Многие антагонисты достигают своей эффективности за счет конкуренции с эндогенными лигандами или субстратами в

структурно определенных сайтах связывания рецепторов. Неограничивающие примеры антагонистов включают альфа-блокаторы, бета-блокаторы и блокаторы кальциевых каналов. Антагонист может представлять собой конкурентный, неконкурентный или внеконкурентный антагонист.

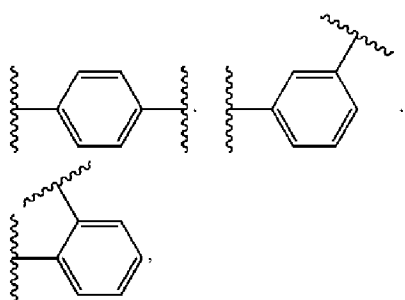
[0080] В контексте данного документа термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью полученный синтетическим путем, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, гомологичный связывающему домену иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывается и распознает антиген. Подразумевается, что использование термина «антитело» включает полные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и, кроме того, включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например* scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', and F(ab')₂, F(ab)₁₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой антитело или молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[0081] Термины «конъюгат антитело-лекарственное средство» и «ADC» используются взаимозаменяемо и относятся к антителу, связанному, *например*, ковалентно с терапевтическим агентом (иногда называемым в данном документе агентом, лекарственным средством или активным фармацевтическим ингредиентом) или агентами. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0082] В контексте данного документа термин «примерно» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично указанному референтному значению. В определенных аспектах термин «примерно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного референтного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[0083] Термин «арил» относится к карбоциклической ароматической группе. Примеры арильных групп включают, но не ограничиваясь ими, фенил, нафтил и антраценил. Карбоциклическая ароматическая группа может быть незамещенной или замещенной одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь ими, $-C_{1-8}$ алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -галоген, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо представляет собой H , $-C_{1-8}$ алкил или арил.

[0084] Термин «арилен» относится к арильной группе, которая имеет две ковалентные связи и может находиться в орто-, мета- или пара-конфигурациях, как изображено в следующих структурах:



в которых фенильная группа может быть незамещенной или замещенной до четырех групп, включая, но не ограничиваясь ими, $-C_{1-8}$ алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -галоген, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо представляет собой H , $-C_{1-8}$ алкил или арил.

[0085] Термин «биологически активная молекула» в контексте данного документа относится к любой молекуле, которая может быть связана с ВВ, *например*, экзосомой, *например*, химически связанной посредством малеимидного фрагмента, при этом молекула может оказывать терапевтический или профилактический эффект у субъекта, нуждающегося в этом, или использоваться в диагностических целях. Соответственно, в качестве примера термин биологически активная молекула включает белки (*например*, антитела, белки, полипептиды и их производные, фрагменты и варианты), липиды и их производные, углеводы (*например*, гликановые части в гликопротеинах) или малые молекулы. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой радиоизотоп. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой детектируемый фрагмент, *например*, радионуклид, флуоресцентную молекулу или контрастный агент.

[0086] Термин «C₁₋₈ алкил» в контексте данного документа относится к насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 1 до 8 атомов углерода. Типичные группы «C₁₋₈ алкила» включают, но не ограничиваясь ими, метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и 2-метилбутил.

[0087] Термин «C₁₋₁₀ алкилен» относится к насыщенной углеводородной группе с прямой цепью формулы $-(CH_2)_{1-10}-$. Примеры C₁₋₁₀ алкилена включают метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен и декален.

[0088] Термин «C₃₋₈ карбоцикл» относится к 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членному насыщенному или ненасыщенному неароматическому карбоциклическому кольцу. Типичные C₃₋₈ карбоциклы включают, но не ограничиваясь ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил. C₃₋₈ карбоциклическая группа может быть незамещенной или замещенной одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь ими, -C₁₋₈ алкил, -O-(C₁₋₈ алкил), арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -галоген, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо представляет собой H, -C₁₋₈ алкил или арил.

[0089] Термин «C₃₋₈ карбоцикло» относится к C₃₋₈ карбоциклической группе, определенной выше, в которой один или несколько атомов водорода карбоцикла заменены связью.

[0090] Термин «C₃₋₈ гетероцикл» относится к ароматическому или неароматическому C₃₋₈ карбоциклу, в котором от одного до четырех кольцевых атомов углерода независимо замещены гетероатомом, выбранным из группы, состоящей из O, S и N. Типичные примеры C₃₋₈ гетероцикла включают, но не ограничиваясь ими, бензофуранил, бензотиофен, индолил, бензопиразолил, кумаринил, изохинолинил, пирролил, тиофенил, фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, хинолинил, пиримидинил, пиридинил, пиридонил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил, изоксазолил и тетразолил. C₃₋₈ гетероцикл может быть незамещенным или замещенным до семи группами, включая, но не ограничиваясь ими, -C₁₋₈ алкил, -O-(C₁₋₈ алкил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -галоген, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо представляет собой H, -C₁₋₈ алкил или арил.

[0091] Термин «C₃₋₈ гетероцикло» относится к C₃₋₈ гетероциклической группе, определенной выше, в которой один из атомов водорода гетероцикла заменен связью. C₃₋₈

гетероцикл может быть незамещенным или замещенным до шести группам, включая, но не ограничиваясь ими, $-C_{1-8}$ алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -галоген, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо представляет собой H , $-C_{1-8}$ алкил или арил.

[0092] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменяется другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0093] В контексте настоящего документа термин «консервативный» относится к нуклеотидами или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности соответственно, которые встречаются неизменными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются сравнительно консервативными, представляют собой такие, которые консервативны в наиболее родственных последовательностях по сравнению с нуклеотидами или аминокислотами, встречающимися в других местах в последовательности.

[0094] В некоторых аспектах две или более последовательности являются «полностью консервативными» или «идентичными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «высококонсервативными», если они на по меньшей мере приблизительно 70% идентичны, по меньшей мере приблизительно 80% идентичны, по меньшей мере приблизительно 90% идентичны или по меньшей мере приблизительно 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «консервативными», если они на по

меньшей мере приблизительно 30% идентичны, по меньшей мере приблизительно 40% идентичны, по меньшей мере приблизительно 50% идентичны, по меньшей мере приблизительно 60% идентичны, по меньшей мере приблизительно 70% идентичны, по меньшей мере приблизительно 80% идентичны, по меньшей мере приблизительно 90% идентичны или по меньшей мере приблизительно 95% идентичны друг другу. Консервативность последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или характеристике.

[0095] В контексте данного документа термин «обычный белок ВВ» означает белок, о котором ранее было известно, что он обогащен в ВВ.

[0096] В контексте данного документа термин «обычный экзосомный белок», означает белок, ранее известный как обогащенный в экзосомах, включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним.

[0097] В контексте данного документа термин «производное» относится к ВВ, *например*, экзосоме, компоненту (*например*, каркасному белку, такому как каркас X и/или каркас Y, липиду или углеводу) или к биологически активной молекуле (*например*, полипептиду, полинуклеотиду, липиду, углеводу, антителу или их фрагменту, PROTAC и т. д.), которая была химически модифицирована для введения либо реакционноспособной малеимидной группы, либо тиоловой группы, чувствительной к реакции с малеимидной группой. Например, антитело, модифицированное бифункциональным реагентом, содержащим (i) группу, реагирующую, *например*, со свободными аминогруппами, и (ii) малеимидную группу, может приводить к образованию производного антитела, содержащего реакционноспособную малеимидную группу, которая может реагировать со свободными тиоловыми группами в белке каркаса X на ВВ, *например*, экзосоме. Напротив, каркас X на ВВ, *например*, экзосоме, может быть модифицирован бифункциональным реагентом, содержащим (i) группу, реагирующую, *например*, со свободными аминогруппами, и (ii) малеимидную группу, в результате чего образуется производное каркаса X, содержащее реакционноспособную малеимидную группу, которая может реагировать со свободными тиоловыми группами в биологически активной молекуле, *например*, антителе.

[0098] Термины «наполнитель» и «носитель» используются взаимозаменяемо и относятся к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения.

[0099] В контексте данного документа термины «внеклеточная везикула», «ВВ» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к везикуле

клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая окружает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы включают все связанные с мембраной везикулы (*например*, экзосомы, нановезикулы), которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. В некоторых аспектах везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различную макромолекулярную полезную нагрузку, которая может находиться во внутреннем пространстве (*т.е.* просвете), располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. В некоторых аспектах полезная нагрузка может содержать аденоассоциированный вирус (AAV), нуклеиновые кислоты (*например*, ДНК или РНК, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, siRNA, shRNA или mRNA), морфолино, белки, углеводы, липиды, малые молекулы, антигены, вакцины, адъюванты вакцин и/или их комбинации. Дополнительные полезные нагрузки описаны подробно ниже. В некоторых аспектах ВВ, *например* экзосома, может дополнительно содержать нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма или их комбинацию. В некоторых аспектах термин внеклеточные везикулы или ВВ относится к популяции внеклеточных везикул (ВВ).

[0100] В некоторых аспектах внеклеточный носитель содержит каркасный фрагмент. В качестве примера и не ограничиваясь этим внеклеточные везикулы включают апоптотические тельца, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым или косвенным воздействием (*например* путем серийной экструзии или обработки щелочными растворами), везикулярные 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, прокариотических или эукариотических клеток и/или культивируемых клеток. В некоторых аспектах внеклеточные везикулы продуцируются клетками, которые экспрессируют один или несколько продуктов трансгена.

[0101] В контексте данного документа термин «экзосома» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от 20 до 300 нм (*например*, от 40 до 200 нм). Экзосомы содержат мембрану, которая окружает внутреннее пространство (*т.е.* просвет), и, в некоторых аспектах, могут быть получены из клетки (*например*, клетки-продуцента) путем прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или путем слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных аспектах экзосома содержит каркасный фрагмент. Как описано ниже, экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основании ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В некоторых аспектах экзосомы по настоящему

изобретению продуцируются клетками, которые экспрессируют один или несколько трансгенных продуктов. В некоторых аспектах термин экзосома относится к популяции экзосом.

[0102] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, *например*, нановезикулы по настоящему изобретению сконструированы путем химического связывания по меньшей мере одной биологически активной молекулы (*например*, белка, такого как антитело или ADC, РНК или ДНК, такой как антисмысловый олигонуклеотид, низкомолекулярное лекарственное средство, токсин, PROTAC, AAV или морфолино) с ВВ, *например*, экзосомой, *например*, нановезикулой посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент является частью бифункционального реагента.

[0103] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы или нановезикулы по настоящему изобретению могут содержать различные макромолекулярные полезные нагрузки либо во внутреннем пространстве (*т.е.* просвете), экспонируемом на внешней (внешней) поверхности, либо на внутренней (просветной) поверхности ВВ, и/или охватывать мембрану. В некоторых аспектах полезная нагрузка может содержать, *например*, нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В определенных аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит каркасный фрагмент, *например*, белок каркаса X или его фрагмент. ВВ, *например*, экзосомы, могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов, прокариотических или эукариотических клеток и/или культивируемых клеток. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, продуцируются клетками, которые экспрессируют один или несколько трансгенных продуктов. В других аспектах ВВ по настоящему изобретению представляют собой, но не ограничиваясь ими, нановезикулы, микросомы, микровезикулы, внеклеточные тельца или апоптотические тельца.

[0104] В контексте данного документа термин «фрагмент» белка (*например*, биологически активная молекула, такая как терапевтический белок, или каркасный белок, такой как белок каркаса X или его фрагмент, или белок каркаса Y, или его фрагмент) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче, чем встречающаяся в природе последовательность, делетирована на N- и/или C-конце или любая часть белка делетирована по сравнению с встречающимся в природе белком.

[0105] В контексте данного документа термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка, *например*, фрагмент белка каркаса X, сохраняет способность связывать или присоединять фрагмент, *например*, биологически активную молекулу, на просветной поверхности или на внешней

поверхности ВВ, *например*, экзосомы, например, посредством малеимидного фрагмента. Аналогичным образом, в некоторых аспектах функциональный фрагмент белка каркаса Y сохраняет способность присоединять фрагмент, например, биологически активную молекулу, на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы, например, посредством малеимидного фрагмента.

[0106] Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом, можно выполнить любыми известными в данной области техники способами определения содержания белка ВВ, *например* экзосом, включая вестерн-блоты, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, *например*, такими как GFP. В определенных аспектах функциональный фрагмент белка каркаса X удерживает, *например*, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 100% способности встречающегося в природе белка каркаса X присоединять биологически активную молекулу на просвете или на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосоме, например, посредством малеимидного фрагмента.

[0107] В контексте данного документа термин «связывание» или «прикрепление» биологически активной молекулы к просветной или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению включает как (i) «химическое связывание», так и «конъюгирование» биологически активной молекулы, например, посредством химического линкера, такого как малеимидный фрагмент, и (ii) «нехимическое связывание», также называемое «осуществление слияния» или «слияние» (например, посредством пептидной связи, аминокислотного линкера и/или каркасного белка) биологически активной молекулы с ВВ (например, экзосомой) или частью каркасного белка, расположенной на просветной или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы).

[0108] В контексте данного документа термины «осуществление слияния», «слитие», «слияние» или «нехимическое связывание» биологически активной молекулы на просветной или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению посредством, например, каркасного белка, относится к связыванию биологически активной молекулы с частью каркасной молекулы (например, белка), расположенной на просветной или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы) соответственно. В некоторых аспектах слияние биологически активной молекулы может быть выполнено посредством генетического слияния (т.е. химерной экспрессии).

[0109] В контексте данного документа термины «химическое связывание» и «конъюгирование» используются взаимозаменяемо, и каждый из них относится к

ковалентному присоединению двух или более фрагментов, каждый из которых содержит, например, ВВ, каркасный фрагмент, биологически активный фрагмент, линкер или линкеры, нацеливающий фрагмент и/или фрагмент тропизма, или любую их комбинация с использованием химического фрагмента, например, малеимидного фрагмента. В результате первый фрагмент (например, каркас, такой как белок каркаса X или липид, такой как холестерин) станет «химически связанным» со вторым фрагментом, например, биологически активным фрагментом, посредством тиоэфирной связи, образованной в результате реакции между малеимидной группой, присутствующей в одном фрагменте, и сульфгидрильной группой, присутствующей в другом фрагменте.

[0110] В контексте данного документа термин «внеклеточный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «внешний», «наружный» и «экстравезикулярный», при этом каждый термин относится к элементу, который находится за пределами мембраны, которая окружает ВВ, например, экзосому. В контексте данного документа термин «внутриклеточный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «интернальный», «внутренний» и «интравезикулярный», при этом каждый термин относится к элементу, который находится внутри мембраны, которая окружает ВВ, например, экзосому. Термин «просвет» относится к пространству внутри мембраны, окружающей ВВ, например, экзосому. Соответственно, элемент, который находится внутри просвета ВВ, например, экзосомы, может упоминаться в данном документе как «расположенный в просвете» или «просветный».

[0111] В контексте данного документа термин «гомология» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновой кислоты (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Обычно термин «гомология» подразумевает эволюционные отношения между двумя молекулами. Таким образом, две гомологичные молекулы будут иметь общего эволюционного предка. В контексте данного документа термин «гомология» охватывает как идентичность, так и сходство.

[0112] В некоторых аспектах полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере

приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% мономеров в молекуле идентичны (точно такой же мономер) или подобны (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[0113] В контексте настоящего изобретения замены (даже если они называются аминокислотными заменами) осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты, *т.е.*, замена аминокислотного остатка на альтернативный аминокислотный остаток осуществляется путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту, кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[0114] В контексте данного документа термин «идентичность» относится к общей консервативности мономера между полимерными молекулами, *например*, между молекулами полипептидов или молекулами полинуклеотидов (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК). Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных определителей, *например*, белок А идентичен белку В, подразумевает, что последовательности идентичны на 100% (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, *например*, на «70% идентичные» эквивалентно описанию их как имеющих, *например*, «70% идентичность последовательностей».

[0115] Например, вычисление процентной идентичности двух полипептидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (*например*, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй полипептидных последовательностей для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В определенных аспектах длина выравниваемой последовательности для сравнительных целей составляет по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 100% от длины референтной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих аминокислотных положениях.

[0116] Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо

вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма.

[0117] Подходящие программы доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процента идентичности последовательностей является bl2seq, часть набора программ BLAST, доступная на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, *например*, Needle, Stretcher, Water или Matcher, часть пакета программ биоинформатики EMBOSS, которые также доступны в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0118] Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, известных из уровня техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[0119] Каждая из различных областей в одной полинуклеотидной или полипептидной целевой последовательности, которая выравнивается с полинуклеотидной или полипептидной референтной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности последовательностей. Следует отметить, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[0120] В определенных аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) к второй аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) рассчитывается как $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков (или азотистых оснований), оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании путем визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй

последовательности, процент идентичности первой последовательности к второй последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности к первой последовательности.

[0121] Специалисту в данной области техники будет понятно, что получение выравнивания последовательностей для вычисления процента идентичности последовательностей не ограничивается сравнениями бинарных последовательностей, обусловленными исключительно данными первичной последовательности. Также будет понятно, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательностей с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (*например*, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (*например*, местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, *например*, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, может быть проведено автоматически или вручную.

[0122] В контексте данного документа термин «иммуномодулятор» относится к агенту, который действует на мишень (*например*, целевую клетку), которая контактирует с ВВ (*например*, экзосомой) и регулирует иммунную систему. Неограничивающие примеры иммуномодулятора, который может быть введен в ВВ (*например*, экзосому) и/или клетку-продуцент, включают агенты, такие как модуляторы ингибиторов контрольных точек, лиганды ингибиторов контрольных точек, цитокины, их производные или любую их комбинацию. Иммуномодулятор может также включать агонист, антагонист, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, такой как siRNA, miRNA, lncRNA, mRNA или ДНК или малую молекулу. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой иммуномодулятор.

[0123] В контексте данного документа термин «иммунный ответ» относится к биологическому ответу у позвоночных организмов на чужеродные агенты или аномальные, *например*, раковые клетки, который защищает организм от этих агентов и заболеваний, вызываемых ими. Иммунный ответ опосредован действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток или нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и систему комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из

тела позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, *например*, активацию или ингибирование Т-клетки, *например*, эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки или Treg-клетки, или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, *например*, NK-клетки. Соответственно, иммунный ответ может включать гуморальный иммунный ответ (*например*, опосредованный В-клетками), клеточный иммунный ответ (*например*, опосредованный Т-клетками) или как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой молекулу, способную вызывать иммунный ответ.

[0124] В некоторых аспектах иммунный ответ представляет собой «ингибирующий» иммунный ответ. Ингибирующий иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который блокирует или уменьшает действие раздражителя (*например*, антигена). В определенных аспектах ингибирующий иммунный ответ включает образование ингибирующих антител против раздражителя. В некоторых аспектах иммунный ответ представляет собой «стимулирующий» иммунный ответ. Стимулирующий иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который приводит к образованию эффекторных клеток (*например*, цитотоксических Т-лимфоцитов), которые могут разрушать и устранять целевой антиген (*например*, опухолевый антиген или вирусы).

[0125] В контексте данного документа термин «иммуноконъюгат» относится к соединению, содержащему связывающую молекулу (*например*, антитело) и один или несколько фрагментов, *например*, терапевтических или диагностических фрагментов, химически конъюгированных со связывающей молекулой. Обычно иммуноконъюгат определяется общей формулой: A-(L-M)_n, где А представляет собой связывающую молекулу (*например*, антитело), L представляет собой необязательный линкер и М представляет собой гетерологичный фрагмент, который может представлять собой, например, терапевтический агент, детектируемую метку и т. д., а n представляет собой целое число. В некоторых аспектах несколько гетерологичных фрагментов могут быть химически конъюгированы с разными точками присоединения в одной и той же связывающей молекуле (*например*, антителе). В других аспектах множественные гетерологичные фрагменты могут быть конкатенированы и присоединены к точке присоединения в связывающей молекуле (*например*, антителе). В некоторых аспектах множественные гетерологичные фрагменты (одинаковые или разные) могут быть конъюгированы со связывающей молекулой (*например*, антителом).

[0126] Иммуноконъюгаты также могут быть определены с помощью общей формулы в обратном порядке. В некоторых аспектах иммуноконъюгат представляет собой «конъюгат антитело-лекарственное средство» («ADC»). В контексте настоящего изобретения термин «иммуноконъюгат» не ограничивается химически или ферментативно конъюгированными молекулами. В контексте настоящего изобретения термин «иммуноконъюгат» также включает генетические слияния. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой иммуноконъюгат.

[0127] В контексте данного документа термины «выделенный», «очищенный», «экстрагированный» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию получения необходимых ВВ (*например*, множества ВВ известного или неизвестного количества и/или концентрации), которые подверглись одному или нескольким процессам очистки, *например*, отбору или обогащению необходимой ВВ, *например*, экзосомы, препарата. В некоторых аспектах настоящего изобретения выделение или очистка в контексте данного документа представляют собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) ВВ, *например* экзосом, из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых аспектах композиция выделенной ВВ, *например* экзосомы не имеет детектируемой нежелательной активности или, в качестве альтернативы, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других аспектах композиция выделенной ВВ, *например*, экзосомы имеет количество и/или концентрацию необходимых ВВ, *например*, экзосом в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других аспектах композиция выделенной ВВ, *например*, экзосомы, обогащена по сравнению с исходным материалом (*например*, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 99,9%, по меньшей мере приблизительно 99,99%, по меньшей мере приблизительно 99,999%, по меньшей мере приблизительно 99,9999% или более

приблизительно 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых аспектах выделенные препараты ВВ (например, экзосомы) по сути не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах препараты выделенной ВВ, *например*, экзосомы, на 100%, на по меньшей мере приблизительно 99%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 94%, на по меньшей мере приблизительно 93%, на по меньшей мере приблизительно 92%, на по меньшей мере приблизительно 91% или на по меньшей мере приблизительно 90% не содержат какого-либо контаминирующего биологического материала. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. Термин «по сути не содержащий остаточных биологических продуктов» может также означать, что ВВ, *например* экзосомы, не содержит обнаружимых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только ВВ, *например* экзосомы.

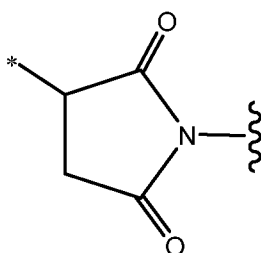
[0128] В контексте данного документа термин «ВВ со сконструированным просветом» относится к ВВ, *например*, экзосоме с просветной поверхностью мембраны или просвету ВВ, *например*, экзосоме, модифицированной по своему составу, так что просветная поверхность или просвет сконструированной ВВ, *например*, экзосомы, отличается от таковой ВВ, *например*, экзосомы, до модификации, или встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы.

[0129] Конструирование может происходить непосредственно в просвете (т.е., пустоте внутри ВВ) или в мембране ВВ (*например*, экзосоме), в частности, на просветной поверхности ВВ, так что просвет и/или просветная поверхность ВВ, *например*, экзосомы, изменяется. Например, мембрана модифицирована по своему составу белка, липида, малой молекулы, углевода *и т.д.*, так что просветная поверхность ВВ, *например*, экзосомы, модифицируется. Аналогично можно изменить содержимое в просвете. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной с помощью генной инженерии. В некоторых аспектах ВВ со сконструированным просветом, *например* экзосома со сконструированным просветом, содержит экзогенный белок (*т.е.*, белок, который ВВ, *например* экзосома, не экспрессирует в естественных условиях) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на просветной поверхности или просвета ВВ, *например* экзосомы, или может связывать фрагмент с просветной поверхностью ВВ, *например*, экзосомы, с ВВ. В других аспектах ВВ

со сконструированным просветом, *например* экзосома со сконструированным просветом, включает более высокую экспрессию природного белка ВВ, *например* белка экзосомы (*например* каркаса X или каркаса Y) или его фрагмента или варианта, которые могут экспонироваться в просвете ВВ, *например* экзосомы, или могут связывать фрагмент с просветной поверхностью ВВ, *например*, экзосомы.

[0130] В контексте данного документа термин «макромолекула» относится к нуклеиновым кислотам, белкам, липидам, углеводам, метаболитам или их комбинациям.

[0131] В контексте данного документа термин «малеимидный фрагмент» или «ММ» относится к химическому фрагменту, связывающему ВВ, *например*, экзосому, с линкером или биологически активной молекулой, и содержит малеимидную группу:



где * указывает точку присоединения к любой тиоловой группе на ВВ, *например*, экзосоме (*например*, свободному тиолу, присутствующему в белке каркаса X), а волнистая линия указывает на сайт присоединения к остальной части малеимидного фрагмента.

[0132] В некоторых аспектах * указывает на точку присоединения к любой тиоловой группе на антителе, PROTAC или любой другой биологически активной молекуле, а волнистая линия указывает на сайт присоединения к остальной части малеимидного фрагмента к ВВ, *например*, экзосоме (*например*, белка каркаса X).

[0133] В контексте данного документа термин «макромолекула» относится к нуклеиновым кислотам, белкам, липидам, углеводам, метаболитам или их комбинациям.

[0134] Термин «модифицированный» при использовании в контексте ВВ, *например*, экзосом, описанных в настоящем документе, относится к изменению или конструированию ВВ, *например*, экзосомы и/или ее клетки-производителя, так что модифицированная ВВ, *например*, экзосома, отличается от встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах модифицированная ВВ, *например*, экзосома, описанная в настоящем документе, содержит мембрану, которая отличается по составу белка, липида, малой молекулы, углевода и *т.д.* по сравнению с мембраной встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы. Например, мембрана содержит более высокую плотность или количество природных белков ВВ, *например*, белков экзосомы, и/или мембрана содержит белки, которые в природе не встречаются в ВВ, *например*, экзосомах. В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют внешнюю поверхность ВВ, *например*,

экзосомы (*например*, ВВ со сконструированной поверхностью и экзосом, описанных в данном документе). В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют просветную поверхность ВВ, *например*, экзосомы (*например*, ВВ со сконструированным просветом и экзосом, описанных в данном документе).

[0135] В контексте данного документа термины «модифицированный белок» или «модификация белка» относятся к белку, имеющему по меньшей мере приблизительно 15% идентичности с немутантной аминокислотной последовательностью белка. Модификация белка включает фрагмент или вариант белка. Модификация белка может дополнительно включать химическую или физическую модификацию фрагмента или варианта белка.

[0136] В контексте данного документа термины «модулировать», «модифицировать» и их грамматические варианты обычно относятся, когда они применяются к конкретной концентрации, уровню, экспрессии, функции или поведению, к способности изменять, увеличивая или уменьшая, *например*, непосредственно или косвенно способствовать/стимулировать/повышать или препятствовать/ингибировать/снижать конкретную концентрацию, уровень, экспрессию, функцию или поведение, такие как, *например*, действовать в качестве антагониста или агониста. В некоторых случаях модулятор может увеличивать и/или уменьшать определенную концентрацию, уровень, активность или функцию относительно контроля или относительно среднего уровня активности, который обычно ожидается или относительно контрольного уровня активности.

[0137] В контексте данного документа термин «нановезикула» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от приблизительно 20 нм до приблизительно 250 нм (*например*, от приблизительно 30 до приблизительно 150 нм) и образуется из клетки (*например*, клетки-продуцента) с помощью прямой или косвенной манипуляции, так что нановезикулы не будут продуцироваться клеткой без манипуляции. Соответствующие манипуляции с клеткой для получения нановезикул включают, но не ограничиваясь ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. В некоторых аспектах продуцирование нановезикул может приводить к разрушению клетки-продуцента. В некоторых аспектах популяция нановезикул, описанная в данном документе, по сути не содержат везикул, которые происходят из клеток путем прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных аспектах нановезикулы содержат каркасный фрагмент, *например*, белок каркаса X или его фрагмент и/или белок каркаса Y или его фрагмент. Нановезикулы, сразу после получения из клетки-продуцента, могут быть

выделены из клетки-продуцента на основании их размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0138] В контексте данного документа термин «полезная нагрузка» относится к биологически активной молекуле (*например*, терапевтическому агенту), которая действует на мишень (*например*, целевую клетку), которую приводят в контакт с ВВ, *например*, экзосомой по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры полезных нагрузок, которые могут быть введены в ВВ, *например*, экзосому, включают терапевтические агенты, такие как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или mRNA, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как miRNA, dsDNA, lncRNA и siRNA), аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные препараты и токсины). В определенных аспектах полезная нагрузка содержит антиген. В контексте данного документа термин «антиген» относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает у него иммунный ответ (клеточный или гуморальный). В некоторых аспектах антиген используется для индукции иммунного ответа, т.е. в качестве вакцины. В других аспектах полезная нагрузка содержит адъювант. В некоторых аспектах молекулы полезной нагрузки ковалентно связаны с ВВ, *например* экзосомой, посредством малеимидного фрагмента.

[0139] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый наполнитель» и их грамматические вариации охватывают все агенты, 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 образования нежелательных физиологических эффектов до такой степени, что запрещается введение композиции субъекту, и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены наполнители и носители, которые пригодны при приготовлении фармацевтической композиции и обычно безопасны, нетоксичны и желательны.

[0140] В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к одному или нескольким соединениям, описанным в данном документе, таким как, *например*, ВВ, такая как экзосома по настоящему изобретению, смешанная или перемешанная с одним или несколькими другими химическими компонентами или суспендированная в них, такими как фармацевтически приемлемые носители и

наполнители. Одна из целей фармацевтической композиции состоит в том, чтобы облегчить введение препаратов ВВ, *например*, экзосом, субъекту, нуждающемуся в этом.

[0141] В контексте данного документа термин «полинуклеотид» относится к полимерам нуклеотидов любой длины, включая рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, их аналоги или их смеси. Этот термин относится к первичной структуре молекулы. Таким образом, термин включает трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту («ДНК»), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту («РНК»). Он также включает модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термин «полинуклеотид» включает полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезоксид-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), включая tRNA, rRNA, hRNA, siRNA и mRNA, сплайсированные или несплайсированные, любой другой тип полинуклеотида, который представляет собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие не нуклеотидные остовы, например, полиамид (*например*, пептидные нуклеиновые кислоты «PNA») и полиморфолиновые полимеры, а также другие синтетические полимеры нуклеиновых кислот, специфичные для последовательности, при условии, что полимеры содержат нуклеиновые основания в конфигурации, которая допускает спаривание оснований и стэкинг оснований, как, например, в ДНК и РНК. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула, присоединенная к ВВ, *например*, экзосоме, посредством малеимидного фрагмента, представляет собой полинуклеотид, *например*, антисмысловый олигонуклеотид. В конкретных аспектах полинуклеотид содержит mRNA. В другом аспекте mRNA представляет собой синтетическую mRNA. В некоторых аспектах синтетическая mRNA содержит по меньшей мере одно неприродное нуклеиновое основание. В некоторых аспектах все нуклеиновые основания определенного класса заменены неприродными нуклеиновыми основаниями (*например*, все уридины в полинуклеотиде, раскрываемом в данном документе, могут быть заменены неприродным нуклеиновым основанием, *например*, 5-метоксиуридином). В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой полинуклеотид.

[0142] В некоторых аспектах полинуклеотид, раскрываемый в данном документе, может быть модифицирован для введения тиоловой группы, которую можно использовать для взаимодействия с малеимидным фрагментом. В некоторых аспектах полинуклеотид, раскрываемый в данном документе, может быть модифицирован для введения группы

малеимидного фрагмента, который можно использовать для взаимодействия с тиоловой группой.

[0143] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты, такие как гомоцистеин, орнитин, п-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а также другие модификации, известные из уровня техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула, присоединенная к ВВ, *например*, экзосоме, посредством малеимидного фрагмента, представляет собой полипептид, *например*, антитело или его производное, такое как ADC, PROTAC, токсин, гибридный белок или фермент.

[0144] Термин «полипептид» в контексте данного документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой отдельный полипептид или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. Чаще всего дисульфидные связи обнаруживаются в многоцепочечных полипептидах. Термин «полипептид» может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственным химическим аналогом соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. В некоторых аспектах «пептид» может иметь длину не более 50 аминокислот, *например*, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[0145] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, может быть модифицирован для введения тиоловой группы, которая может быть использована для взаимодействия с малеимидным фрагментом. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, может быть модифицирован для введения малеимидной части, которая может использоваться для взаимодействия с тиоловой группой.

[0146] Термины «предупреждать», «предупреждение» и их варианты в контексте данного документа относятся к частичной или полной отсрочке начала заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или нескольких симптомов, признаков или клинических проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или нескольких симптомов, признаков или проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования определенного заболевания, нарушения и/или состояния; и/или снижению риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения.

[0147] В контексте данного документа термин «клетка-продуцент» относится к клетке, используемой для создания ВВ, *например*, экзосомы. Клетка-продуцент может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro*, или клетку *in vivo*. Клетка-продуцент включает, но не ограничиваясь ими, клетку, которая, как известно, эффективно генерирует ВВ, *например*, экзосомы, *например*, клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (CHO), мезенхимальные стволовые клетки (МСК), клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1. В определенных аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, В-клеткой, тучной клеткой, макрофагом, нейтрофилом, клеткой Купфера-Бровича, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

[0148] Термин «профилактический» в контексте данного документа относится к терапевтическому или курсовому действию, используемому для предупреждения начала заболевания или состояния, или для предупреждения или отсрочки появления симптома, ассоциированного с заболеванием или состоянием.

[0149] Термин «профилактика» в контексте данного документа относится к мере, предпринимаемой для поддержания здоровья и предупреждения или отсрочки начала кровотечения, или для предупреждения или отсрочки появления симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

[0150] «Рекомбинантный» полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученному с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессируемые в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, как и

нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были разделены, фракционированы или частично или по сути очищены с помощью любой подходящей методики. Полипептиды, раскрываемые в данном документе, могут быть получены рекомбинантным путем с использованием способов, известных из уровня техники. В качестве альтернативы белки и пептиды, раскрываемые в данном документе, могут быть синтезированы химическим путем. В некоторых аспектах настоящего изобретения белок каркаса X и/или белок каркаса Y, присутствующие в ВВ, *например*, экзосомах, могут быть получены рекомбинантным путем с помощью сверхэкспрессии каркасных белков в клетках-продуцентах, так что уровни каркасных белков в полученных ВВ, *например*, экзосомах, значительно увеличиваются по сравнению с уровнями каркасных белков, присутствующих в ВВ, *например*, экзосомах, клеток-продуцентов, не сверхэкспрессирующих такие каркасные белки.

[0151] **[0149]** Термин «каркасный фрагмент» в контексте данного документа относится к молекуле, *например*, белку или его фрагменту (*например*, его функциональному фрагменту), который можно использовать для связывания полезной нагрузки, *например*, биологически активной молекулы или любого другого соединения, представляющего интерес (*например*, AAV), с ВВ, *например*, экзосомой, либо на просветной поверхности (*например*, белок Y каркаса), либо на внешней поверхности (*например*, белок X каркаса) ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой полипептид, который в природе не существует в ВВ, *например*, экзосоме. В определенных аспектах фрагмент каркаса содержит синтетическую молекулу. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит неполипептидный фрагмент. В других аспектах каркасный фрагмент включает, *например*, липид, углевод, белок или их комбинацию (*например*, гликопротеин или протеолипид), которые в природе существуют в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит липид, углевод или белок, который в природе не присутствует в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит липид или углевод, который в природе существует в ВВ, *например*, экзосоме, но был обогащен в ВВ, *например*, экзосоме, по отношению к базальному/нативному уровням/уровням дикого типа. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит белок, который в природе существует в ВВ, *например*, экзосоме, но был обогащен в ВВ, *например*, экзосоме, *например*, путем рекомбинантной сверхэкспрессии в клетке-продуценте по отношению к базальным/нативным уровням/уровням дикого типа. В определенных аспектах каркасный фрагмент представляет собой белок каркаса X или его фрагмент. В некоторых аспектах каркасный фрагмент

представляет собой белок каркаса Y или его фрагмент. В дополнительных аспектах ВВ содержит как белок каркаса X или его фрагмент, так и белок каркаса Y или его фрагмент.

[0152] В контексте данного документа термин «каркас X» относится к белкам ВВ, *например*, экзосомы, которые были идентифицированы на поверхности ВВ, *например*, экзосом, и могут быть сконструированы для сверхэкспрессии в ВВ. *См., например*, патент США № 10195290, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Неограничивающие примеры белков каркаса X включают: отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 («PTGFRN»); басигин («BSG»); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8); интегрин бета-1 («ITGB1»); интегрин альфа-4 («ITGA4»); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 («SLC3A2»); и класс белков-переносчиков АТФ («ATP1A1», «ATP1A2», «ATP1A3», «ATP1A4», «ATP1B3», «ATP2B1», «ATP2B2», «ATP2B3», «ATP2B»), их фрагмент, и любую их комбинацию. В некоторых аспектах белок каркаса X может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, который способен связывать другой фрагмент на внешней поверхности или на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркас X может связывать биологически активную молекулу с внешней поверхностью или просветом ВВ, *например* экзосомой. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула может быть химически связана с белком каркаса X или его фрагментом посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах биологически активная молекула может быть химически связана с белком каркаса X или его фрагментом посредством малеимидного фрагмента на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают: аминопептидазу N (CD13); неприлизин (мембранная металлоэндопептидаза; MME); представителя 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1); нейропилин-1 (NRP1); CD9, CD63, CD81, PDGFR, белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B, их фрагменты и любую их комбинацию.

[0153] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (*например*, белок ВВ, описанный в патенте США № 10195290, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме) образует слияние с партнером по связыванию (*например*, антигенсвязывающим доменом, капсидным белком, Fc-рецептором, партнером по связыванию химически индуцированного димера или любой их комбинацией), который

можно использовать для связывания другой молекулы (т.е. второго партнера по связыванию).

[0154] В контексте данного документа термин «партнер по связыванию» относится к одному представителю по меньшей мере из двух элементов, которые взаимодействуют друг с другом с образованием мультимера (*например*, димера). В некоторых аспектах партнер по связыванию является первым партнером по связыванию, который взаимодействует со вторым партнером по связыванию. В некоторых аспектах партнер по связыванию является первым партнером по связыванию, который взаимодействует со вторым партнером по связыванию и/или третьим партнером по связыванию. Любые партнеры по связыванию можно использовать в композициях и способах, раскрываемых в данном документе. В некоторых аспектах партнер по связыванию может представлять собой полипептид, полинуклеотид, жирную кислоту, малую молекулу или любую их комбинацию. В определенных аспектах партнер по связыванию (*например*, первый партнер по связыванию и/или второй партнер по связыванию) выбран из первого и второго партнеров по связыванию химически индуцированного димера.

[0155] В контексте данного документа термин «каркас Y» относится к белкам BB, *например*, экзосомы, которые были идентифицированы в просвете BB, *например*, экзосом, и могут быть сконструированы для сверхэкспрессии в BB. См., *например*, международную заявку № PCT/US2018/061679, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Неограничивающие примеры белков каркаса Y включают: миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C («MARCKS»); миристоилированный богатый аланином субстрат протеинкиназы C-подобный белок 1 («MARCKSL1»); и растворимый в кислоте белок головного мозга 1 («BASP1»), их фрагмент и любую их комбинацию. В некоторых аспектах белок каркаса Y может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьшим фрагментом, который способен связывать фрагмент с просветной поверхностью BB, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах белок каркаса Y или его фрагмент может связывать фрагмент с просветной поверхностью BB, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах настоящего изобретения фрагмент, например, биологически активная молекула может быть связан, например, химически связан с белком каркаса Y или его фрагментом. В некоторых аспектах фрагмент, например, биологически активная молекула может быть связан, например, химически связан с белком каркаса Y или его фрагментом на просветной поверхности BB, *например*, экзосомы.

[0156] В определенных аспектах каркасный белок содержит фрагмент белка BB. В некоторых аспектах каркасный белок содержит фрагмент MARCKS, MARCKSL1 или

BASP1. В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17). В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), при этом С-концевой остаток глицина является миристоилированным.

[0157] В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой трансмембранный белок. В контексте данного документа термин «трансмембранный белок» относится к любому белку, который содержит внеклеточный домен (*например*, по меньшей мере, одну аминокислоту, которая расположена вне мембраны ВВ, *например*, экзосомы, *например*, вневезикулярной), трансмембранный домен (*например*, по меньшей мере одну аминокислоту, которая расположена внутри мембраны ВВ, *например*, внутри мембраны экзосомы) и внутриклеточный домен (*например*, по меньшей мере одну аминокислоту, которая расположена внутри мембраны ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркасный белок, описанный в данном документе, представляет собой трансмембранный белок I типа, при этом N-конец трансмембранного белка расположен во внеклеточном пространстве, *например*, вне мембраны, которая окружает ВВ, *например*, экзосому, *например*, экстравезикулярно. В некоторых аспектах каркасный белок, описанный в данном документе, представляет собой трансмембранный белок II типа, при этом N-конец трансмембранного белка расположен во внутриклеточном пространстве, *например*, внутри мембраны, *например*, на просветной стороне мембраны, которая окружает ВВ, *например*, экзосому, *например*, интравезикулярно.

[0158] В контексте данного документа термин «саморасщепляющийся спейсер» относится к спейсеру, как определено ниже, который будет самопроизвольно отделяться от второго фрагмента (*например*, биологически активной молекулы), если ее связь с первым фрагментом (*например*, расщепляемым линкером) расщепляется.

[0159] В контексте данного документа термин «сходство» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например* между полинуклеотидными молекулами (*например* молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Расчет процентного сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как и расчет процентной идентичности, за исключением того, что при расчете процентного сходства учитываются консервативные замены, как понимается в данной области техники. Следует понимать, что процент сходства зависит от используемой шкалы сравнения, т.е. от того, сравниваются ли аминокислоты, *например*, в соответствии с их эволюционной близостью, зарядом, объемом, гибкостью, полярностью, гидрофобностью, ароматичностью, изоэлектрической точкой, антигенностью или их комбинациями.

[0160] В контексте данного документа термин «спейсер» относится к бифункциональному химическому фрагменту, который способен ковалентно связывать вместе два разделенных в пространстве фрагмента (*например*, расщепляемый линкер и биологически активную молекулу) в обычно стабильную молекулу из двух частей.

[0161] Если не указано иное, ссылка на соединение, которое имеет один или несколько стереоцентров, означает каждый стереоизомер и все их комбинации стереоизомеров.

[0162] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и «хозяин» и их варианты используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, включая, но не ограничиваясь ими, людей, домашних животных (*например*, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (*например*, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (*например*, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т.п.), для которых требуется диагностика, лечение или терапия, в частности, людей. Способы, описанные в настоящем документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии.

[0163] В контексте настоящего документа термин «по сути не содержит» означает, что образец, содержащий ВВ, *например* экзосомы, содержит менее 10% макромолекул, *например* контаминантов, в процентной концентрации масса/объем (масс./об.). Некоторые фракции могут содержать менее чем приблизительно 0,001%, менее чем приблизительно 0,01%, менее чем приблизительно 0,05%, менее чем приблизительно 0,1%, менее чем приблизительно 0,2%, менее чем приблизительно 0,3 %, менее чем приблизительно 0,4%, менее чем приблизительно 0,5%, менее чем приблизительно 0,6%, менее чем приблизительно 0,7%, менее чем приблизительно 0,8%, менее чем приблизительно 0,9%, менее чем приблизительно 1%, менее чем приблизительно 2%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 6%, менее чем приблизительно 7%, менее чем приблизительно 8%, менее чем приблизительно 9% или менее чем приблизительно 10% (масс./об.) макромолекул.

[0164] В контексте данного документа термин «ВВ со сконструированной поверхностью» (*например*, экзосома со сконструированным каркасом X) относится к ВВ с мембраной или поверхностью ВВ, модифицированной в своем составе, так что поверхность сконструированной ВВ отличается от таковой ВВ до модификации или встречающейся в природе ВВ.

[0165] В контексте данного документа термин «экзосома со сконструированной поверхностью» (*например*, экзосома со сконструированным каркасом X) относится к экзосоме с мембраной или поверхностью экзосомы (наружной поверхностью или

просветной поверхностью) в своем составе, так что поверхность сконструированной экзосомы отличается от таковой экзосомы до модификации или встречающейся в природе экзосомы.

[0166] Конструирование может происходить на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или на мембране ВВ, *например*, экзосомы, так что поверхность ВВ, *например*, экзосомы, изменяется. Например, мембрана может быть модифицирована по своему составу, *например*, белка, липида, малой молекулы, углевода или их комбинации. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее или одновременно модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной с помощью генной инженерии. В некоторых аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например* экзосома, содержит экзогенный белок (*т.е.*, белок, который ВВ, *например* экзосома, не экспрессирует в естественных условиях) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на поверхности ВВ, *например* экзосомы, или может связывать фрагмент с поверхностью ВВ, *например*, экзосомы. В других аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, включает более высокую экспрессию (*например*, более высокое количество) природного белка ВВ, *например*, белка экзосомы (*например*, белка каркаса X) или его фрагмента или варианта, которые могут экспонироваться на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или могут связывать фрагмент с поверхностью ВВ, *например*, экзосомы. В конкретном аспекте ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, содержит модификацию одного или нескольких компонентов мембраны, *например*, белка, такого как белок каркаса X или его фрагмент, липида, малой молекулы, углевода или любой их комбинации, при этом по меньшей мере один из компонентов связан, например, химически, с биологически активной молекулой, например, посредством малеимидного фрагмента.

[0167] В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество реагента или фармацевтического соединения, содержащего ВВ или экзосому по настоящему изобретению, которое достаточно для получения необходимого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического эффекта у субъекта, нуждающегося в этом. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может считаться терапией.

[0168] Термины «лечить», «лечение» или «осуществление лечения» в контексте данного документа относятся, *например*, к снижению тяжести заболевания или состояния;

сокращению продолжительности течения болезни; нормализации или устранению одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием; обеспечению благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или состоянием без обязательного излечения заболевания или состояния, или любой их комбинации. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или патологического состояния, или их симптомов. В одном аспекте термин «осуществление лечения» или «лечение» означает индукцию иммунного ответа против антигена у субъекта, нуждающегося в этом, например, путем введения ВВ, например, экзосомы, содержащей антиген (антиген вакцины) и необязательно адъювант на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы.

[0169] В контексте данного документа термин «вариант» молекулы (*например*, функциональной молекулы, антигена, адъюванта, белка каркаса X или его фрагмента и/или белка каркаса Y или его фрагмента) относится к молекуле, которая имеет определенные структурные и функциональные идентичности с другой молекулой при сравнении с помощью способа, известного из уровня техники. Например, вариант белка может содержать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или реаранжировку в другом белке.

[0170] В некоторых аспектах вариант каркаса X или его производное включает вариант каркаса X, имеющий по меньшей мере приблизительно 70% идентичности по отношению к полноразмерному зрелому PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белкам-переносчикам АТФ или их фрагменту (*например*, функциональному фрагменту) PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белков-переносчиков АТФ.

[0171] В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента белка каркаса X, раскрытого в данном документе, или его производных сохраняет способность специфически нацеливаться на ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркас X или производное каркаса X содержит одну или несколько мутаций, например, консервативные аминокислотные замены.

[0172] В некоторых аспектах вариант каркаса Y или его производного включает вариант, имеющий по меньшей мере 70% идентичности по отношению к MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагменту MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0173] В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента белка каркаса Y или его производного сохраняет способность специфически нацеливаться на просветную поверхность ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах белок каркаса Y содержит одну или несколько мутаций, *например*, консервативные аминокислотные замены.

[0174] Встречающиеся в природе варианты называются «аллельными вариантами» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего данный локус

в хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьироваться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в настоящее раскрытие. В качестве альтернативы не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с помощью методик мутагенеза или прямым синтезом.

[0175] Используя известные способы белковой инженерии и технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или несколько аминокислот могут быть делетированы с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В работе Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме, сообщается о вариантах белков KGF, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Аналогично гамма-интерферон проявлял в десять раз более высокую активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков с карбоксиконца этого белка. (Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.)

[0176] Более того, имеется множество свидетельств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, аналогичную активности встречающегося в природе белка. Например, в работе Gayle и сотрудников (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме) проведен обширный мутационный анализ цитокина IL-1a человека. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a, в которых в среднем изменяли 2,5 аминокислоты на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации были исследованы во всех возможных положениях аминокислот. Исследователи обнаружили, что «[основная часть] молекулы может быть изменена с небольшим влиянием на [связывание или биологическую активность]». (См. Реферат). Фактически, только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей продуцировали белок, который значительно отличался по активности от белка дикого типа.

[0177] Как указано выше, варианты или производные включают, *например*, модифицированные полипептиды. В некоторых аспектах варианты или производные, *например* полипептидов, полинуклеотидов, липидов, гликопротеинов, являются результатом химической модификации и/или эндогенной модификации. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in vivo*. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in*

vitro. В других аспектах вариант или производные являются результатом внутриклеточной модификации в клетках-продуцентах.

[0178] Модификации, присутствующие в вариантах и производных, включают, *например* ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, ковалентное присоединение гликозилфосфатидилинозита (GPI), гидроксилирование, иодирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (работа Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование.

[0179] В некоторых аспектах белок каркаса X белок и/или белок каркаса Y может модифицироваться в любом удобном месте. В некоторых аспектах биологически активная молекула может быть модифицирована в любом удобном месте. В конкретных аспектах настоящего изобретения компонент ВВ, *например*, экзосомы (*например*, белок, такой как белок X каркаса, белок Y каркаса, липид, гликан или их комбинация) и/или биологически активную молекулу (*например*, антитело или ADC, PROTAC, малую молекулу, такую как циклический динуклеотид, токсин, такой как MMAE, агонист STING, агент, повышающий толерантность, антисмысловой олигонуклеотид, антиген, такой как антиген вакцины, адъювант, нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма или любая их комбинация) можно модифицировать с получением производного, содержащего по меньшей мере один малеимидный фрагмент.

II. Конъюгированные ВВ, например, экзосомы

[0180] Внеклеточные везикулы (ВВ) обычно имеют диаметр от 20 до 1000 нм; *например*, экзосомы, которые представляют собой малые внеклеточные везикулы, обычно имеют диаметр от 100 до 200 нм. ВВ, *например*, экзосомы, состоят из ограничивающего липидного бислоя и разнообразного набора белков и нуклеиновых кислот (Maas, S.L.N., *et al.*, *Trends. Cell Biol.* 27(3):172-188 (2017)). ВВ, *например*, экзосомы, проявляют преимущественное поглощение в отдельных типах клеток и тканях, и их тропизм можно

регулировать путем добавления на их поверхность белков, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности целевых клеток (Alvarez-Erviti, L., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 29(4):341-345 (2011)).

[0181] В отличие от антител, ВВ, например, экзосомы, могут вмещать большое количество молекул, прикрепленных к их поверхности, от тысяч до десятков тысяч молекул на ВВ (*например*, экзосому). Конъюгаты ВВ (*например*, экзосома)-лекарственное средство представляют собой платформу для доставки высокой концентрации терапевтического соединения к отдельным типам клеток, в то же время ограничивая общее системное воздействие соединения, что, в свою очередь, снижает нецелевую токсичность.

[0182] В настоящем изобретении предложены ВВ, например, экзосомы, которые были сконструированы путем взаимодействия первого молекулярного объекта, содержащего свободную тиольную группу, со вторым молекулярным объектом, содержащим малеимидную группу, при этом малеимидный фрагмент ковалентно связывает первый молекулярный объект (*например*, ВВ, *например*, экзосому или ее компонент, такой как белок каркаса X или липид) со вторым молекулярным объектом (*например*, биологически активной молекулой) посредством малеимидного фрагмента, как представлено на Фиг. 1А.

[0183] Неограничивающие примеры биологически активных молекул, которые могут присоединяться к ВВ (*например*, экзосоме) посредством малеимидного фрагмента, включают такие агенты, как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие детектируемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или mRNA, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как miRNA, dsDNA, lncRNA или siRNA), морфолино, аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы, малые молекулы (*например*, низкомолекулярные препараты и токсины), антигены (*например*, антигены вакцины), адъюванты (*например*, адъюванты вакцины) и т.д.

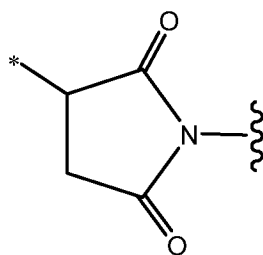
[0184] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению может содержать более одного типа биологически активной молекулы. В некоторых аспектах биологически активные молекулы могут представлять собой, *например*, малые молекулы, такие как циклические динуклеотиды, токсины, такие как ауристатин (например, моноэтилауристатин E, MMAE), антитела (*например*, голые антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство), агонисты STING, агенты, повышающие толерантность, антисмысловые олигонуклеотиды, PROTAC, морфолино, антагонисты

рецептора лизофосфатидной кислоты (например, антагонисты LPA1) или любые их комбинации. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) по настоящему изобретению может содержать, например, антиген вакцины и необязательно адъювант вакцины. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) по настоящему изобретению может содержать терапевтическую полезную нагрузку (например, STING или одну полезную нагрузку, описанную ниже) и нацеливающий фрагмент и/или фрагмент тропизма.

[0185] Соответственно, способы, раскрываемые в данном документе, могут приводить к образованию молекул, представленных на **Фиг. 1А**, при этом ВВ (например, экзосома) или любой ее молекулярный компонент, такой как полипептид (*например*, белок каркаса X или его фрагмент), липид, липопротеин, гликопротеин или любой вариант или производное встречающегося в природе или не встречающийся в природе белка, расположенного на ВВ (*например*, экзосоме), может быть химически связан посредством малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой, например, терапевтической полезной нагрузкой, нацеливающим фрагментом, фрагментом тропизма или любой их комбинацией. Как показано на **Фиг. 1А**, в некоторых аспектах ВВ (например, экзосома) или ее молекулярный компонент, содержащий сульфгидрильную (тиольную) группу, может реагировать с малеимидной группой, присоединенной к биологически активному фрагменту. В других аспектах ВВ (например, экзосома) или ее молекулярный компонент, содержащий малеимидную группу, может реагировать с сульфгидрильной (тиоловой) группой, присутствующей в биологически активной части. В обоих случаях конечный продукт представляет собой биологически активную молекулу, химически присоединенную к ВВ (например, экзосоме) посредством тиоэфирной связи.

II.A. Малеимидный фрагмент

[0186] Малеимидный фрагмент может представлять собой любой химический фрагмент, содержащий малеимидную группу (*например*, бифункциональный химический фрагмент, который соединяет ВВ, *например*, экзосому, с линкером, *например*, пептидом):



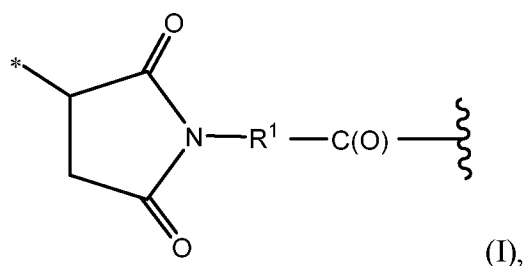
где

(i) * указывает точку присоединения к любой доступной реагирующей с малеимидом группе, присутствующей на ВВ (*например*, экзосоме), *например*, к свободной тиольной группе белка каркаса X; и

(ii) волнистая линия указывает сайт присоединения к остальной части малеимидного фрагмента.

[0187] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент присоединяется к атому серы, присоединенному к ВВ (*например*, экзосоме), *например*, встречающемуся в природе атому серы в тиольной группе или атому серы, введенному посредством химической модификации или мутации.

[0188] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (I):



где

(i) R¹ выбран из группы, состоящей из -C₁₋₁₀ алкилен-, -C₃₋₈ карбоцикло-, -O-(C₁₋₈ алкилен)-, -арил-, -C₁₋₁₀ алкилен-арил-, -арил-C₁₋₁₀ алкилен-, -C₁₋₁₀ алкилен-(C₃₋₈ карбоцикло)-, -(C₃₋₈ карбоцикло)-C₁₋₁₀ алкилен-, -C₃₋₈ гетероцикло-, -C₁₋₁₀ алкилен-(C₃₋₈ гетероцикло)-, -(C₃₋₈ гетероцикло)-C₁₋₁₀ алкилен-, -(CH₂CH₂O)_г- и -(CH₂CH₂O)_г-CH₂-;

(ii) г является целым числом, *например*, от 1 до 10;

(iii) * указывает точку присоединения к любому доступному реакционноспособному атому серы, *например*, к сере в тиольной группе, присутствующей на ВВ (*например*, экзосоме); и

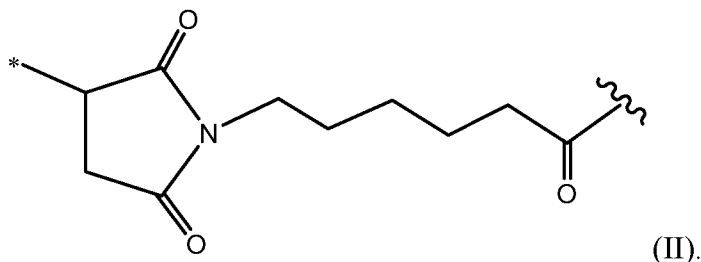
(iv) волнистая линия указывает сайт присоединения малеимидного фрагмента к биологически активной молекуле.

[0189] В некоторых аспектах R¹ представляет собой -C₁₋₈ алкилен-, -C₃₋₆ карбоцикло-, -O-(C₁₋₆ алкилен)-, -арил-, -C₁₋₈ алкилен-арил-, -арил-C₁₋₈ алкилен-, -C₁₋₈ алкилен-(C₃₋₆ карбоцикло)-, -(C₃₋₆ карбоцикло)-C₁₋₈ алкилен-, -C₃₋₆ гетероцикло-, -C₁₋₈ алкилен-(C₃₋₆ гетероцикло)-, -(C₃₋₆ гетероцикло)-C₁₋₈ алкилен-, -(CH₂CH₂O)_г- и -(CH₂CH₂O)_г-CH₂-; где г равно целое число, *например*, от 1 до 10;

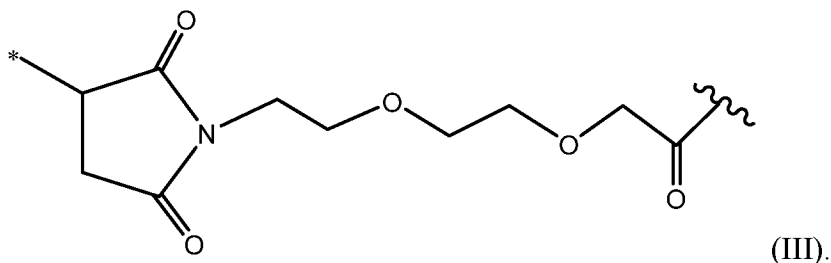
[0190] В некоторых аспектах R¹ представляет собой -(CH₂)_с-, цикlopентил-, циклогексил-, -O-(CH₂)_с-, -фенил-, -CH₂-фенил-, -фенил-CH₂-, -CH₂-циклопентил-, -циклопентил-CH₂-, -CH₂-циклогексил-, -циклогексил-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_г- и -(CH₂CH₂O)_г-CH₂-; где г равно целое число, *например*, от 1 до 6.

[0191] В некоторых аспектах R^1 представляет собой $-(CH_2)_s-$, где s равно, *например*, 4, 5 или 6.

[0192] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (II), где R^1 представляет собой $-(CH_2)_5-$:



[0193] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент имеет формулу (III), где R^1 представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, и где r равно 2:



[0194] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ, *например*, экзосоме, где функциональная группа представляет собой сульфгидрильную (тиоловую) группу. В одном аспекте сульфгидрильная группа находится на белке на поверхности ВВ (*например*, экзосоме), *например*, в белке каркаса X или его фрагменте или варианте. *Например*, в некоторых аспектах сульфгидрильная группа может присутствовать в тиоловом липиде, *например*, холестерин-SH, DSPE-SH или их производных, *например*, холестерин-PEG-SH или DSPE-PEG-SH.

[0195] В других аспектах малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ (*например*, экзосоме), которая была химически дериватизирована с образованием малеимидного фрагмента. *Например*, в одном аспекте функциональная группа амина, присутствующая на ВВ (*например*, экзосоме) (*например*, амине на боковой цепи лизина или аргинина, или концевой аминогруппе белка), может быть дериватизирована бифункциональным реагентом, содержащим, *например*, сукцинимидный фрагмент и малеимидный фрагмент.

[0196] В других аспектах карбоксильная функциональная группа, присутствующая в ВВ (*например*, экзосоме) (*например*, карбоксильная группа в боковой цепи глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, или концевая карбоксильная группа белка), может быть дериватизирована с помощью бифункционального реагента, содержащего, *например*,

изоцианатный фрагмент и малеимидный фрагмент. В других аспектах карбонил (окисленный углевод), присутствующий на ВВ (*например*, экзосоме), может быть дериватизирован бифункциональным реагентом, содержащим, например, гидразиновый фрагмент и малеимидный фрагмент.

[0197] В целом, способы, раскрываемые в данном документе, могут быть применены на практике с использованием любого реагента, например, бифункционального или многофункционального реагента, который при взаимодействии с молекулой, присутствующей на поверхности (внешней поверхности или просветной поверхности) ВВ (*например*, экзосомы) (*например*, белком, липидом, сахаром) будет ковалентно или нековалентно модифицировать молекулу с получением модифицированной молекулы, содержащей по меньшей мере один малеимидный фрагмент. Молекула, присутствующая на поверхности (внешней поверхности или просветной поверхности) ВВ (*например*, экзосомы), может быть встречающийся в природе или она может быть не встречающейся в природе, т.е. она была модифицирована, *например*, посредством химической модификации, инкубации с композицией, содержащая не встречающуюся в природе молекулу, или путем мутации (*например*, путем введения одной или нескольких аминокислот цистеина в белок посредством мутации).

[0198] Бифункциональные реагенты, содержащие малеимидный фрагмент, реагенты, в которых ряд малеимид-содержащих единиц может мультимеризоваться, или малеимид-содержащие реагенты, которые могут добавлять функциональный фрагмент (*например*, ПЭГ) посредством малеимидной группы, включают, например, бифункциональные реагенты, содержащие гидразиновый фрагмент и малеимидный фрагмент, бифункциональные реагенты, содержащие изоцианатный фрагмент и малеимидный фрагмент, бифункциональные реагенты, содержащие фрагмент N-гидроксисукцинимидилового эфира и малеимидный фрагмент, бифункциональные реагенты, содержащие фрагмент сукцинимид и малеимидный фрагмент, биотин-малеимид, стрептавидин-малеимид, N-4-малеимид-масляную кислоту, N-(4-малеимидбутилокси)сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбоксипентил]иминодиуксусную кислоту, малеимид-ПЭГ-сукцинимидиловые сложные эфиры (*например*, малеимид-PEG₁₂-сукцинимидиловый сложный эфир, малеимид-PEG₂-сукцинимидиловый сложный эфир, малеимид-PEG₂₀₀₀-сукцинимидиловый сложный эфир, малеимид-PEG₅₀₀₀-сукцинимидиловый сложный эфир или малеимид-PEG_n-сукцинимидиловый сложный эфир, где $1 < n < 5000$), малеимид-ПЭГ-малеимид (*например*, малеимид-PEG₁₂-малеимид, малеимид-PEG₂-малеимид, малеимид-PEG₂₀₀₀-малеимид, малеимид-PEG₅₀₀₀-малеимид или малеимид-PEG_n-малеимид, где $1 < n < 5000$), малеимид-

ОН, малеимид-PEG_n-ОН, где 1 < n < 5000, малеимид-поли(этиленгликоль)-b-поли (ε-капролактон), (S)-(-)-N-(1-фенилэтил)малеимид, N-(4-хлорфенил)малеимид, N-(1-пиренил)малеимид, метоксиполиэтиленгликоль-малеимид, полиэтиленгликоль-метиловый эфир-малеимид, N-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-гептадекафторундецил)малеимид, дефероксамин-малеимид (т.е. хелатор-малеимид), малеимид-глицидиловый эфир, бифункциональный малеимидо DTPA, бифункциональные NOTA-хелаторы малеимида, гомобифункциональные малеимидные сшивающие агенты (т.е. те, которые имеют малеимидную группу на каждом конце), бис-малеимидополиалкиленгликоль, DBCO-малеимид, бензотриазолмалеимид, алкинмалеимид, функционализированные малеимидом липиды, функционализированный малеимидом липид ПЭГ, и в целом любая молекула, содержащая по меньшей мере один малеимидный фрагмент, по меньшей мере один дополнительный реакционноспособный фрагмент (например, малеимид или другую реакционноспособную группу) и один или несколько необязательных линкеров (например, ПЭГ или другой полимер, такой как полиглицерин).

II.B. Линкеры

[0199] ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению могут содержать один или несколько линкеров, которые связывают (т.е. соединяют) малеимидный фрагмент с биологически активной молекулой или с ВВ (*например*, экзосомой). В некоторых аспектах малеимидный фрагмент связан с биологически активной молекулой с помощью линкера. Линкер может представлять собой любой химический фрагмент, способный, *например*, связывать малеимидный фрагмент, *например*, формулы (II) или (III), с биологически активной молекулой. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент может содержать один или несколько линкеров. В некоторых аспектах линкеры, раскрываемые в данном документе, или их комбинации могут быть использованы для соединения, например, малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой, первого биологически активного фрагмента со вторым биологически активным фрагментом, ВВ (*например*, мембранного липида или его каркасного белка) с малеимидным фрагментом или ВВ (*например*, мембранного липида или его каркасного белка) с биологически активным фрагментом.

[0200] В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например*, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, *например*, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкера могут быть связаны в тандеме. Когда в малеимидном фрагменте, раскрытом в данном документе, присутствует несколько

линкеров, каждый из линкеров может быть одинаковым или разным. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предупреждают/ослабляют стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно в некоторых аспектах линкер может содержать один или несколько сайтов, расщепляемых протеазой, которые могут располагаться внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности.

[0201] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере приблизительно два, по меньшей мере приблизительно три, по меньшей мере приблизительно четыре, по меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 55, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 65, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 95 или по меньшей мере приблизительно 100 аминокислот.

[0202] В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере приблизительно 110, по меньшей мере приблизительно 120, по меньшей мере приблизительно 130, по меньшей мере приблизительно 140, по меньшей мере приблизительно 150, по меньшей мере приблизительно 160, по меньшей мере приблизительно 170, по меньшей мере приблизительно 180, по меньшей мере приблизительно 190 или по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот.

[0203] В других аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700, по меньшей мере приблизительно 800, по меньшей мере приблизительно 900 или по меньшей мере приблизительно 1000 аминокислот. Пептидный линкер может содержать от 1 до приблизительно 5 аминокислот, от 1 до приблизительно 10 аминокислот, от 1 до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 10 до приблизительно 50 аминокислот, от приблизительно 50 до приблизительно 100 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 200 до

приблизительно 300 аминокислот, от приблизительно 300 до приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 400 до приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 500 до приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 600 до приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 700 до приблизительно 800 аминокислот, от приблизительно 800 до приблизительно 900 аминокислот или от приблизительно 900 до приблизительно 1000 аминокислот.

[0204] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$ (SEQ ID NO: 46), при этом n представляет собой любое целое число от 1 до 100, а m представляет собой любое целое число от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$ (SEQ ID NO: 47), при этом x представляет собой целое число от 1 до 4, y представляет собой 0 или 1, а z представляет собой целое число от 1 до 50. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность Gn (SEQ ID NO: 48), при этом n может представлять собой целое число от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$ (SEQ ID NO: 49), при этом n представляет собой целое число от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$ (SEQ ID NO: 50), при этом n представляет собой целое число от 1 до 100.

[0205] В конкретном аспекте последовательность пептидного линкера представляет собой GGGG (SEQ ID NO: 30).

[0206] В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$, при этом n представляет собой целое число от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$, при этом n представляет собой целое число от 1 до 100.

[0207] В других аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 31). В других аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGS})_n(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 217). В этих случаях n может представлять собой целое число от 1 до 100. В других случаях n может представлять собой целое число от 1 до 20, т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых аспектах n представляет собой целое число от 1 до 100.

[0208] Дополнительные примеры линкеров включают, но не ограничиваясь ими, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO:218), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO:219), GGSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:220), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:221) или GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:222). В некоторых аспектах линкер представляет

собой последовательность поли-G (GGGG)_n (SEQ ID NO: 223), где n может представлять собой целое число от 1 до 100.

[0209] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер содержит пептиды (или полипептиды) (*например*, природные или не встречающиеся в природе пептиды), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не связан в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (*например* содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция).

[0210] В других аспектах пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. В других аспектах пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе аминокислоты, встречающиеся в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В других аспектах пептидный линкер может содержать природную полипептидную последовательность.

[0211] В некоторых аспектах линкер включает непептидный линкер. В других аспектах линкер состоит из непептидного линкера. В некоторых аспектах непептидный линкер может представлять собой, *например*, малеимидокапроил (MC), малеимидопропаноил (MP), метоксилполиэтиленгликоль (MPEG), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (МБС), сукцинимидил-4-(пара-малеимидофенил)бутират (SMPB), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензонат (SIAB), сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)-пропионамид]гексаноат (LC-SPDP), 4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа (2-пиридилдитио)толуол (SMPT) и т.д. (см., *например*, патент США № 7375078).

[0212] Линкеры могут быть введены в малеимидные фрагменты с использованием методик, известных из уровня техники (*например*, химической конъюгации, рекомбинантных методик или пептидного синтеза). В некоторых аспектах линкеры можно вводить с использованием рекомбинантных методик. В других аспектах линкеры можно вводить с использованием твердофазного пептидного синтеза. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент, раскрываемый в данном документе, может содержать одновременно один или несколько линкеров, которые были введены с использованием рекомбинантных методик, и один или несколько линкеров, которые были введены с

использованием твердофазного пептидного синтеза или способов химической конъюгации, известных из уровня техники.

[0213] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы. Таким образом, в некоторых аспектах малеимидный фрагмент, раскрываемый в данном документе, может содержать расщепляемый линкер. Такие расщепляемые линкеры могут быть чувствительны, например, к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых биологически активная молекула остается активной. В качестве альтернативы линкеры могут быть по сути устойчивыми к расщеплению («нерасщепляемый линкер»).

[0214] Некоторые расщепляемые линкеры расщепляются протеазами («линкеры, расщепляемые протеазой»). Только определенные пептиды легко расщепляются внутри или за пределами клеток. См., *например*, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) and Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Расщепляемый линкер может содержать расщепляемые сайты, состоящие из α -аминокислотных единиц и пептидных связей, которые химически представляют собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и α -аминокислотной группой лизина, считаются непептидными связями и считаются нерасщепляемыми.

[0215] В некоторых аспектах расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления для протеазы, *например*, неприлизина (CALLA или CD10), тиметологопептидазы (TOP), лейкотриеновой гидролазы A4, эндотелин-конвертирующих ферментов, протеазы ste24, нейролизина, митохондриальной промежуточной пептидазы, интерстициальных коллагеназ, коллагеназ, стромелизинов, эластазы макрофагов, матрилизина, желатиназы, мепринов, проколлагеновых C-эндопептидаз, проколлагеновых N-эндопептидаз, металлопротеиназ ADAM и ADAMT, миелинассоциированных металлопротеиназ, энамелизина, фактор некроза опухоли α -конвертирующего фермента, инсулизина, нардилизина, митохондриальной процессинговой пептидазф, магнолизина, дактилизин-подобных металлопротеиназ, нейтрофильной коллагеназы, матриксных металлопептидаз, матриксных металлопротеиназ мембранного типа, эндопептидазы SP2, простатоспецифического антигена (PSA), плазмина, урокиназы, белка активации фибробластов человека (FAP α), трипсина, химотрипсинов, кальдекрина, панкреатических эластаз, панкреатической эндопептидазы, энтеропептидазы, лейкоцитарной эластазы, миелобластов, химазы, триптазы, гранзима, химотриптического фермента рогового слоя,

акрозина, калликреинов, компонентов и факторов комплемента, конвертазы c3/c5 альтернативного пути комплемента, сериновой протеазы, ассоциированной с маннозо-связывающим белком, факторов коагуляции, тромбина, протеина с, активатора плазминогена u и t, катепсина G, гепсина, простаина, эндопептидазы, активирующей фактор роста гепатоцитов, пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа, фурина, пропротеинконвертаз, пролилпептидаз, ациламиноацилпептидазы, пептидилгликаминазы, сигнальной пептидазы, n-концевых нуклеофильных аминогидролаз, 20s протеасомы, γ -глутамилтранспептидазы, митохондриальной эндопептидазы, митохондриальной эндопептидазы Ia, htra2-пептидазы, матриптазы, протеазы сайта 1, легумаина, катепсинов, цистеиновых катепсинов, кальпаинов, убиквитинизопептидазы T, каспаз, гликозилфосфатидилинозитолпротеинтрансмидазы, прокоагулянта рака, прогормона тиолпротеазы, γ -глутамилгидролазы, блеомицингидролазы, сепразы, катепсина B, катепсина D, катепсина L, катепсина M, протеиназы K, пепсинов, химозина, гастриксина, ренина, япсина и/или карпинов, простатоспецифического антигена (PSA) или любой протеазы Asp-N, Glu- C, Lys-C или Arg-C в целом. См., *например*, Cancer Res. 77(24):7027-7037 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах расщепляемый линкерный компонент содержит пептид, содержащий от одного до десяти аминокислотных остатков. В этих аспектах пептид позволяет расщеплять линкер протеазой, тем самым облегчая высвобождение биологически активной молекулы при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Примеры пептидов включают, но не ограничиваются ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, пентапептиды и гексапептиды. Примеры дипептидов включают, но не ограничиваясь ими, валин-аланин (val-ala), валин-цитруллин (val-cit), фенилаланин-лизин (phe-lys), N-метил-валин-цитруллин, циклогексилаланин-лизин и бета-аланин-лизин. Примеры трипептидов включают, но не ограничиваясь ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).

[0216] Пептид может содержать встречающиеся в природе и/или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Термин «встречающаяся в природе аминокислота» относится к Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp и Tyr. «Неприродные аминокислоты» (т.е. аминокислоты, которые не встречаются в природе) включают, в качестве неограничивающего примера, гомосерин, гомоаргинин, цитруллин, фенилглицин, таурин, йодтирозин, селеноцистеин, норлейцин («Nle»), норвалин («Nva»), бета-аланин, L- или D-нафталанин, орнитин («Orn») и т.п. Пептиды могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления

конкретным ферментом, например, опухолессоциированной протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмينا.

[0217] Аминокислоты также включают D-формы природных и неприродных аминокислот. «D-» обозначает аминокислоту, имеющую «D»- (правовращающую) конфигурацию, в отличие от конфигурации во встречающихся в природе («L-») аминокислотах. Природные и неприродные аминокислоты можно приобрести коммерчески (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) или синтезировать с использованием способов, известных из уровня техники.

[0218] Некоторые линкеры расщепляются эстеразами («линкеры, расщепляемые эстеразой»). Только определенные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами, присутствующими внутри или вне клеток. Сложные эфиры образуются при конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с простыми спиртами, такими как алифатические спирты, а также с малыми циклическими и малыми ароматическими спиртами.

[0219] В некоторых аспектах линкер представляет собой «линкер, чувствительный к восстанавливающим условиям». В некоторых аспектах линкер, чувствительный к восстанавливающим условиям, содержит дисульфидную связь. В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер». В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит гидразон. Подходящие кислотолабильные линкеры также включают, например, цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

[0220] В некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Нерасщепляемые линкеры представляют собой любой химический фрагмент, способный связывать малеимидный фрагмент с биологически активной молекулой стабильным, ковалентным образом и не подпадающий под категории, перечисленные выше для расщепляемых линкеров. Таким образом, нерасщепляемые линкеры по сути устойчивы к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Кроме того, термин нерасщепляемый относится к способности химической связи в линкере или примыкающего к линкеру участка противостоять расщеплению, индуцированному кислотой, агентом, расщепляющим фотолабильные соединения, пептидазой, эстеразой или химическим или физиологическим соединением, которое расщепляет дисульфидную связь в условиях, при которых циклический динуклеотид и/или антитело не теряют своей активности. В некоторых аспектах биологически активная молекула присоединяется к линкеру посредством

спейсера. В одном аспекте спейсер представляет собой саморасщепляющийся спейсер. В другом аспекте спейсер представляет собой несаморасщепляющийся спейсер.

[0221] В некоторых аспектах линкер содержит нерасщепляемый линкер, содержащий, например, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), гексаэтиленгликоль (HEG), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером. В некоторых аспектах один или несколько нерасщепляемых линкеров содержат более мелкие единицы (например, HEG, ТЭГ, глицерин, C2-C12-алкил и т.п.), связанные вместе. В одном аспекте связь представляет собой сложноэфирную связь (например, сложный эфир фосфодиэфира или фосфоротиоата) или другую связь.

II.B.1 Линкеры на основе этиленгликоля (HEG, ТЭГ, ПЭГ) линкеры

[0222] В некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер, при этом нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), характеризуемый формулой $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$, при этом R^3 представляет собой водород, метил или этил, а n имеет значение от 2 до 200. В некоторых аспектах линкер содержит спейсер, при этом спейсер представляет собой ПЭГ.

[0223] В некоторых аспектах линкер ПЭГ представляет собой линкер на основе олигоэтиленгликоля, например, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, тетраэтиленгликоля (ТЭГ), пентаэтиленгликоля или гексаэтиленгликоля (HEG).

[0224] В некоторых аспектах n имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0225] В некоторых аспектах n составляет от 2 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 100 до 110, от 110 до 120, от 120 до 130, от 130 до 140, от 140 до 150, от 150 до 160, от 160 до 170, от 170 до 180, от 180 до 190 или от 190 до 200.

[0226] В некоторых конкретных аспектах n имеет значение от 3 до 200, от 3 до 20, от 10 до 30 или от 9 до 45.

[0227] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой разветвленный ПЭГ. Разветвленные ПЭГ содержат от трех до десяти цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра.

[0228] В определенных аспектах фрагмент ПЭГ представляет собой монодисперсный полиэтиленгликоль. В контексте настоящего изобретения монодисперсный полиэтиленгликоль (mdPEG) представляет собой ПЭГ, который имеет одну заданную длину цепи и молекулярную массу. mdPEG обычно получают путем выделения из смеси для полимеризации с помощью хроматографии. В определенных формулах монодисперсный фрагмент ПЭГ обозначается аббревиатурой mdPEG.

[0229] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой звездчатый ПЭГ. Звездчатые ПЭГ содержат от 10 до 100 цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра.

[0230] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой гребенчатый ПЭГ. Гребенчатые ПЭГ имеют несколько цепей ПЭГ, обычно привитых к остову полимера.

[0231] В определенных аспектах ПЭГ имеет молярную массу от 100 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 100 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 100 г/моль до 2000 г/моль. В определенных аспектах ПЭГ имеет молярную массу от 200 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 300 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 400 г/моль до 2000 г/моль.

[0232] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой PEG₁₀₀, PEG₂₀₀, PEG₃₀₀, PEG₄₀₀, PEG₅₀₀, PEG₆₀₀, PEG₇₀₀, PEG₈₀₀, PEG₉₀₀, PEG₁₀₀₀, PEG₁₁₀₀, PEG₁₂₀₀, PEG₁₃₀₀, PEG₁₄₀₀, PEG₁₅₀₀, PEG₁₆₀₀, PEG₁₇₀₀, PEG₁₈₀₀, PEG₁₉₀₀, PEG₂₀₀₀, PEG₂₁₀₀, PEG₂₂₀₀, PEG₂₃₀₀, PEG₂₄₀₀, PEG₂₅₀₀, PEG₁₆₀₀, PEG₁₇₀₀, PEG₁₈₀₀, PEG₁₉₀₀, PEG₂₀₀₀, PEG₂₁₀₀, PEG₂₂₀₀, PEG₂₃₀₀, PEG₂₄₀₀, PEG₂₅₀₀, PEG₂₆₀₀, PEG₂₇₀₀, PEG₂₈₀₀, PEG₂₉₀₀ или PEG₃₀₀₀. В одном конкретном аспекте ПЭГ представляет собой PEG₄₀₀. В другом конкретном аспекте ПЭГ представляет собой PEG₂₀₀₀.

[0233] В некоторых аспектах линкер по настоящему изобретению может содержать несколько линкеров на основе ПЭГ, например, расщепляемый линкер, фланкированный линкерами на основе ПЭГ, HEG или ТЭГ.

[0234] В некоторых аспектах линкер содержит (HEG) n и/или (ТЭГ) n , при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством линкера на основе сложного эфира фосфорной кислоты, связи сложного эфира фосфороксиата или их сочетания.

II.B.2 Глицерин и полиглицерины (PG)

[0235] В некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер, содержащий глицериновую единицу или полиглицерин (PG), описываемую формулой $((R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2O)_n-)$, где R^3 представляет собой водород, метил или этил, а n имеет значение от 3 до 200. В некоторых аспектах n имеет значение от 3 до 20. В некоторых аспектах n имеет значение от 10 до 30.

[0236] В некоторых аспектах линкер на основе PG представляет собой линкер на основе диглицерина, триглицерина, тетраглицерина (TG), пентаглицерина или гексаглицерина (HG).

[0237] В некоторых аспектах n имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0238] В некоторых аспектах n составляет от 2 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 100 до 110, от 110 до 120, от 120 до 130, от 130 до 140, от 140 до 150, от 150 до 160, от 160 до 170, от 170 до 180, от 180 до 190 или от 190 до 200.

[0239] В некоторых альтернативах этих аспектов n имеет значение от 9 до 45. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой разветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, при этом R^5 представляет собой водород или линейную цепь глицерина, описываемую формулой $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$ и R^3 представляет собой водород, метил или этил. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой гиперразветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, при этом R^5 представляет собой водород или цепь глицерина, описываемую формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^6-CH_2-O)_n-)$, при этом R^6 представляет собой водород или цепь глицерина, описываемую формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^7-CH_2-O)_n-)$, при этом R^7 представляет собой водород или линейную цепь глицерина, описываемую формулой $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$ и R^3 представляет собой водород, метил или этил. Гиперразветвленный глицерин и способы его синтеза описаны в Oudshorn et al. (2006)

Biomaterials 27:5471-5479; Wilms et al. (2010) Acc. Chem. Res. 43, 129-41 и литературных источниках, цитируемые в данном документе.

[0240] В определенных аспектах PG имеет молярную массу от 100 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 100 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 100 г/моль до 2000 г/моль. В определенных аспектах PG имеет молярную массу от 200 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 300 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 400 г/моль до 2000 г/моль.

[0241] В некоторых аспектах PG представляет собой PG₁₀₀, PG₂₀₀, PG₃₀₀, PG₄₀₀, PG₅₀₀, PG₆₀₀, PG₇₀₀, PG₈₀₀, PG₉₀₀, PG₁₀₀₀, PG₁₁₀₀, PG₁₂₀₀, PG₁₃₀₀, PG₁₄₀₀, PG₁₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₂₆₀₀, PG₂₇₀₀, PG₂₈₀₀, PG₂₉₀₀ или PG₃₀₀₀. В одном конкретном аспекте PG представляет собой PG₄₀₀. В другом конкретном аспекте PG представляет собой PG₂₀₀₀.

[0242] В некоторых аспектах линкер содержит (глицерин)_n и/или (HG)_n и/или (TG)_n, при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством линкера на основе сложного эфира фосфорной кислоты, связи сложного эфира фосфотиоата или их сочетания.

II.B.3 Алифатические (алкильные) линкеры

[0243] В некоторых аспектах линкер представляет собой по меньшей мере один алифатический (алкильный) линкер, например, пропил, бутил, гексил или C₂-C₁₂ алкил, такой как C₂-C₁₀ алкил или C₂-C₆ алкил.

[0244] В некоторых аспектах линкер содержит алкильную цепь, например, незамещенный алкил. В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкенилилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил или алкенилгетероциклилалкенил.

[0245] Необязательно эти компоненты могут быть заменены. Заместители включают спирт, алкокси (такой как метокси, этокси и пропокси), алкил с прямой или разветвленной цепью (такой как C1-C12 алкил), амин, аминокл (такой как аминокл C1-C12 алкил), фосфорамидит, фосфат, фосфорамидат, фосфородитиоат, тиофосфат, гидразид, гидразин, галоген (такой как F, Cl, Br или I), амид, алкиламид (такой как амид C1-C12 алкил), карбоновая кислота, сложный эфир карбоновой кислоты, ангидрид карбоновой кислоты, галогенид карбоновой кислоты, простой эфир, сульфониалогенид, имидатный эфир, изоцианат, изотиоцианат, галоформиат, карбодуимидный аддукт, альдегиды, кетон, сульфгидрил, галогенацетил, алкилгалогенид, алкилсульфонат, $C(=O)CH=CHC(=O)$ (малеимид), тиоэфир, циано, сахар (такой как, манноза, галактоза и глюкоза), α,β -ненасыщенный карбонил, алкилртутиевый или α,β -ненасыщенный сульфен.

[0246] Термин «алкил», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, углеводородный радикал с прямой или разветвленной цепью, имеющий обозначенное число атомов углерода (*например*, C₁-C₁₀ означает от одного до восьми атомов углерода). Обычно алкильная группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода, от 1 до 8 атомов углерода или от 1 до 6 атомов углерода. Группа «низший алкил» представляет собой алкильную группу, имеющую от 1 до 4 атомов углерода. Термин «алкил» включает двух- и мновалентные радикалы. Например, термин «алкил» включает «алкилен», где это уместно, *например*, когда формула указывает, что алкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца. Примеры алкильных радикалов включают, но не ограничиваясь ими, метил, этил, *n*-пропил, *изо*-пропил, *n*-бутил, *трет*-бутил, *изо*-бутил, *втор*-бутил, а также гомологи и изомеры, например, *n*-пентила, *n*-гексила, *n*-гептила и *n*-октила.

[0247] Термин «алкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную (бирадикальную) алкильную группу, в которой алкил определен в данном документе. Примером «алкилена» является, но не ограничиваясь им, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. Обычно «алкиленовая» группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, например, 10 или меньше атомов углерода (*например*, от 1 до 8 или от 1 до 6 атомов углерода). Группа «низший алкилен» представляет собой группу алкилена, содержащую от 1 до 4 атомов углерода.

[0248] Термин «алкенил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 2 до 24 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. Типичная алкенильная группа имеет от 2 до 10 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. В одном аспекте

алкенильные группы содержат от 2 до 8 атомов углерода или от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 двойных связей. Примеры алкенильных групп включают винил, 2-пропенил, 1-бут-3-енил, кротил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), 2-изопентенил, 1-пент-3-енил, 1-гекс-5-енил и т.п.

[0249] Термин «алкинил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к ненасыщенному или полиненасыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 2 до 24 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Типичная «алкинильная» группа имеет от 2 до 10 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. В одном аспекте настоящего изобретения алкинильные группы содержат от 2 до 6 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Примеры алкинильных групп включают проп-1-инил, проп-2-инил (*т.е.* пропаргил), этинил и 3-бутинил.

[0250] Термины «алкокси», «алкиламино» и «алкилтио» (или тиаалкокси) используются в их общепринятом смысле и относятся к алкильным группам, которые присоединены к остальной части молекулы посредством атома кислорода, аминогруппы или атома серы соответственно.

[0251] Термин «гетероалкил» по себе или в сочетании с другим термином означает стабильный углеводородный радикал с прямой или разветвленной цепью, состоящий из указанного числа атомов углерода (*например*, C₂-C₁₀ или C₂-C₈) и по меньшей мере одного гетероатома, выбранные, *например*, из N, O, S, Si, B и P (в одном аспекте, N, O и S), где атомы азота, серы и фосфора необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован (кватернизированы). Гетероатом (гетероатомы) помещен/помещены в любое внутреннее положение гетероалкильной группы. Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваясь ими, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -CH₂-Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ и -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. До двух гетероатомов могут быть последовательными, например, -CH₂-NH-OCH₃ и -CH₂-O-Si(CH₃)₃.

[0252] Аналогично термин «гетероалкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как проиллюстрировано, но без ограничения ими, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- и -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Обычно гетероалкильная группа будет иметь от 3 до 24 атомов (углерод и гетероатомы, за исключением водорода) (3-24-членный гетероалкил). В другом примере гетероалкильная группа содержит всего от 3 до 10 атомов (3-10-членный гетероалкил) или от 3 до 8 атомов (3-8-членный гетероалкил). Термин «гетероалкил» включает «гетероалкилен», где это уместно, *например*, когда формула указывает, что

гетероалкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца.

[0253] Термин «циклоалкил» сам по себе или в сочетании с другими терминами представляет собой насыщенный или ненасыщенный, неароматический карбоциклический радикал, имеющий от 3 до 24 атомов углерода, например, содержащий от 3 до 12 атомов углерода (*например*, C₃-C₈ циклоалкил или C₃-C₆ циклоалкил). Примеры циклоалкила включают, но без ограничения ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Термин «циклоалкил» также включает мостиковые, полициклические (*например*, бициклические) структуры, такие как норборнил, адамантил и бицикло[2.2.1]гептил. «Циклоалкильная» группа может быть конденсирована по меньшей мере с одним (*например*, от 1 до 3) другим кольцом, выбранным из арильного (*например*, фенильного), гетероарильного (*например*, пиридинного) и неароматического (*например*, карбоциклического или гетероциклического) колец. Когда «циклоалкильная» группа включает конденсированное арильное, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, тогда «циклоалкильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством карбоциклического кольца.

[0254] Термин «гетероциклоалкил», «гетероциклический», «гетероцикл» или «гетероциклил» сам по себе или в сочетании с другими терминами представляет собой карбоциклическое неароматическое кольцо (*например*, 3-8-членное кольцо и, например, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо), содержащее по меньшей мере от одного до 5 гетероатомов, выбранных, *например*, из N, O, S, Si, B и P (например, N, O и S), при этом атомы азота, серы и фосфора необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован (кватернизованы) (*например*, от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы), или конденсированную кольцевую систему из 4-8 членных кольца, содержащих по меньшей мере от одного до 10 гетероатомов (*например*, от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из N, O и S) в стабильных комбинациях, известных специалистам в данной области. Примеры гетероциклоалкильных групп включают конденсированное фенильное кольцо. Когда «гетероциклическая» группа включает конденсированное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо, тогда «гетероциклическая» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством гетероцикла. Гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остальной части молекулы.

[0255] Типичные гетероциклоалкильные или гетероциклические группы по настоящему изобретению включают морфолинил, тиоморфолинил, тиоморфолинил S-оксид, тиоморфолинил S,S-диоксид, пиперазинил, гомопиперазинил, пирролидинил, пирролинил, имидазолидинил, тетрагидропиранил, пиперидинил, тетрагидрофуранил,

тетрагидротиенил, пиперидинил, гомопиперидинил, гомоморфолинил, гомотиоморфолинил, гомотиоморфолинил S,S-диоксид, оксазолидинонил, дигидропиразолил, дигидропирролил, дигидропиразолил, дигидропиридил, дигидропиримидинил, дигидрофурил, дигидропиранил, тетрагидротиенил S-оксид, тетрагидротиенил S,S-оксид, гомотиоморфолинил S-оксид, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и т.п.

[0256] Под «арилом» подразумевается 5-, 6- или 7-членная ароматическая карбоциклическая группа, имеющая одно кольцо (*например*, фенил), или конденсированная с другими ароматическими или неароматическими кольцами (*например*, от 1 до 3 других колец). Когда «арильная» группа содержит неароматическое кольцо (*например*, в 1,2,3,4-тетрагидронафтиле) или гетероарильную группу, тогда «арильная» группа связана с остальной частью молекулы посредством арильного кольца (*например*, фенильного кольца). Арильная группа необязательно замещена (*например*, от 1 до 5 заместителей, описанных в данном документе). В одном примере арильная группа содержит от 6 до 10 атомов углерода. Неограничивающие примеры арильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, хинолин, инданил, инденил, дигидронафтил, флуоренил, тетралинил, бензо[d][1,3]диоксолил или 6,7,8,9-тетрагидро-5H-бензо[a]циклогептенил. В одном аспекте арильная группа выбрана из фенила, бензо[d][1,3]диоксолила и нафтила. Арильная группа в еще одном аспекте представляет собой фенил.

[0257] Термин «арилалкил» или «аралкил» предназначен для включения тех радикалов, в которых арильная группа или гетероарильная группа присоединена к алкильной группе с образованием радикалов -алкиларил и -алкилгетероарил, где алкил, арил и гетероарил определены в данном документе. Иллюстративные «арилалкильные» или «аралкильные» группы включают бензил, фенетил, пиридилметил и т.п.

[0258] Под «арилокси» подразумевается группа -О-арил, где арил имеет значения, указанные в данном документе. В одном примере арильная часть арилоксигруппы представляет собой фенил или нафтил. Арильная часть арилоксигруппы в одном аспекте представляет собой фенил.

[0259] Термин «гетероарильный» или «гетероароматический» относится к полиненасыщенному, 5-, 6- или 7-членному ароматическому фрагменту, содержащему по меньшей мере один гетероатом (*например*, от 1 до 5 гетероатомов, таких как 1-3 гетероатома), выбранных из N, O, S, Si и B (*например*, N, O и S), где атомы азота и серы необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован

(кватернизованы). «Гетероарильная» группа может представлять собой одно кольцо или быть конденсированной с другими арильными, гетероарильными, циклоалкильными или гетероциклоалкильными кольцами (*например*, от 1 до 3 других колец). Когда «гетероарильная» группа содержит конденсированное арильное, циклоалкильное или гетероциклоалкильное кольцо, тогда «гетероарильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством гетероарильного кольца. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы посредством атома углерода или гетероатома.

[0260] В одном примере гетероарильная группа имеет от 4 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из O, S и N. Неограничивающие примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиримидинил, хинолинил, бензотиенил, индолил, индолинил, пиридазинил, пиразинил, изоиндолил, изохинолил, хиназолинил, хиноксалинил, фталазинил, имидазолил, изоксазолил, пиразолил, оксазолил, тиазолил, индолизинил, индазолил, бензотиазолил, бензимидазолил, бензофуранил, фуранил, тиенил, пирролил, оксадиазолил, тиадиазолил, триазолил, тетразолил, изотиазолил, нафтиридинил, изохроманил, хроманил, тетрагидроизохинолинил, изоиндолинил, изобензотетрагидрофуранил, изобензотетрагидротенил, изобензотиенил, бензоксазолил, пиридопиридил, бензотетрагидрофуранил, бензотетрагидротенил, пуринил, бензодиоксолил, триазинил, птеридинил, бензотиазолил, имидазопиридил, имидазотиазолил, дигидробензизоксазинил, бензизоксазинил, бензоксазинил, дигидробензизотиазинил, бензопиранил, бензотиопиранил, хромонил, хроманонил, пиридил-N-оксид, тетрагидрохинолинил, дигидрохинолинил, дигидрохинолинонил, дигидроизохинолинонил, дигидрокумаринил, дигидроизокумаринил, изоиндолинонил, бензодиоксанил, бензоксазолинонил, пирролил N-оксид, пиримидинил N-оксид, пиридазинил N-оксид, пиразинил N-оксид, хинолинил N-оксид, индолил N-оксид, индолинил N-оксид, изохинолил N-оксид, хиназолинил N-оксид, хиноксалинил N-оксид, фталазинил N-оксид, имидазолил N-оксид, изоксазолил N-оксид, оксазолил N-оксид, тиазолил N-оксид, индолизинил N-оксид, индазолил N-оксид, бензотиазолил N-оксид, бензимидазолил N-оксид, пирролил N-оксид, оксадиазолил N-оксид, тиадиазолил N-оксид, триазолил N-оксид, тетразолил N-оксид, бензотиопиранил S-оксид, бензотиопиранил S,S-диоксид. Иллюстративные гетероарильные группы включают имидазолил, пиразолил, тиадиазолил, триазолил, изоксазолил, изотиазолил, имидазолил, тиазолил, оксадиазолил и пиридил. Другие иллюстративные гетероарильные группы включают 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-

пиридил, 3-пиридил, пиридин-4-ил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из вышеупомянутых арильных и гетероарильных кольцевых систем выбраны из группы приемлемых заместителей арильной группы, описанной ниже.

[0261] Примеры алифатических линкеров включают следующие структуры: —O— , CO—O— , —NH—CO—O— , —NH—CO—NH— , $\text{—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—}$, $\text{—S—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—}$, $\text{—CO—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—CO—}$, $\text{—CO—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—}$, $\text{—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—}$, $\text{—CO—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—C—(=S)—}$, $\text{—CO—O—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—CO—}$, $\text{—C(=S)—O—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—CO—}$, $\text{—C(=S)—O—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—C—(=S)—}$, $\text{—CO—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—C—(=S)—}$, $\text{—CO—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—CO—}$, $\text{—C(=S)—O—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—CO—}$, $\text{—C(=S)—NH—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—O—C—(=S)—}$, $\text{—NH—(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n2}\text{—CH(CH}_2\text{OH)—}$, $\text{—NH—(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n2}\text{—CH}_2\text{—}$, $\text{—NH—(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n2}\text{—CH}_2\text{—CO—}$, $\text{—O—(CH}_2\text{)}_{n3}\text{—S—S—(CH}_2\text{)}_{n4}\text{—O—P(=O)}_2\text{—}$, $\text{—CO—(CH}_2\text{)}_{n3}\text{—O—CO—NH—(CH}_2\text{)}_{n4}\text{—}$, $\text{—CO—(CH}_2\text{)}_{n3}\text{—CO—NH—(CH}_2\text{)}_{n4}\text{—}$, $\text{—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{NH—}$, $\text{—C(O)(CH}_2\text{)}_{n1}\text{NH—}$, $\text{—C(O)—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—C(O)—}$, $\text{—C(O)—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—C(O)O—}$, —C(O)—O— , $\text{—C(O)—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—C(O)—}$, $\text{—C(O)—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—}$, —C(O)—NH— , —C(O)— , $\text{—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—C(O)—}$, $\text{—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—C(O)O—}$, $\text{—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—}$, $\text{—(CH}_2\text{)}_{n1}\text{—NH—C(O)—}$, где $n1$ представляет собой целое число от 1 до 40 (например, от 2 до 20 или от 2 до 12); $n2$ представляет собой целое число от 1 до 20 (например, от 1 до 10 или от 1 до 6); $n3$ и $n4$ могут быть одинаковыми или разными и представляют собой целое число от 1 до 20 (например, от 1 до 10 или от 1 до 6).

[0262] В некоторых аспектах линкер содержит $(C3)_n$, $(C4)_n$, $(C5)_n$, $(C6)_n$, $(C7)_n$ или $(C8)_n$, или их комбинацию, где n представляет собой целое число от 1 и 50, и каждая единица связана, например, посредством линкера на основе сложного фосфатного эфира, связи на основе сложного эфира фосфоротиоата или их комбинации.

II.B.4 Расщепляющиеся линкеры

[0263] В некоторых аспектах линкер может представлять собой расщепляемый линкер. Термин «расщепляемый линкер» относится к линкеру, содержащему по меньшей мере одну связь или химическую связь, которая может быть разорвана или расщеплена. В контексте данного документа термин «расщепление» относится к разрыву одной или нескольких химических связей в относительно большой молекуле таким образом, что образуются две или несколько молекул относительно меньшего размера. Расщепление

может быть опосредовано, например, нуклеазой, пептидазой, протеазой, фосфатазой, оксидазой или редуктазой, например, или конкретными физико-химическими условиями, например окислительно-восстановительной средой, рН, присутствием активных форм кислорода или определенными длинами волн света.

[0264] В некоторых аспектах термин «расщепляемый» в контексте данного документа относится, например, к быстро разлагаемым линкерам, таким как, например, фосфодиэфир и дисульфиды, тогда как термин «нерасщепляемый» относится, например, к более стабильным связям, таким как, например, устойчивые к нуклеазам фосфоротиоаты. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой динуклеотидный или тринуклеотидный линкер, дисульфид, имин, тиокеталь, дипептид val-cit или любую их комбинацию. В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

II.B.4.a Редокс-расщепляемые линкеры

[0265] В некоторых аспектах линкер представляет собой редокс-расщепляемый линкер. В качестве неограничивающего примера одним типом расщепляемого линкера является редокс-расщепляемая связывающая группа, которая расщепляется при восстановлении или при окислении. В некоторых аспектах редокс-расщепляемый линкер содержит дисульфидную связь, т.е. он представляет собой расщепляемый дисульфидом линкер. Редокс-расщепляемые линкеры могут быть восстановлены, например, внутриклеточными меркаптанами, оксидазами или редуктазами.

II.B.4.b Линкеры, расщепляемые реактивными формами кислорода (ROS)

[0266] В некоторых аспектах линкер может содержать расщепляемый линкер, который может расщепляться реактивными формами кислорода (ROS), такими как супероксид (O_2^-) или пероксид водорода (H_2O_2), генерируемыми, например, в результате процессов воспаления, например, активированными нейтрофилами. В некоторых аспектах расщепляемый линкер ROS представляет собой расщепляемый тиокеталом линкер. См., например, патент США № 8354455B2, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

II.B.4.c рН-зависимые расщепляемые линкеры

[0267] В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер», содержащий расщепляемую кислотой связывающую группу, которая

представляет собой связывающую группу, которая селективно расщепляется в кислых условиях ($\text{pH} < 7$). В качестве неограничивающего примера расщепляемая кислотой связывающая группа отщепляется в кислой среде, например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или меньше. В некоторых аспектах pH составляет приблизительно 6,5 или меньше. В некоторых аспектах линкер расщепляется агентом, таким как фермент, который может действовать как обычная кислота, например, пептидаза (которая может быть субстратспецифичной) или фосфатаза. Внутри клеток определенные органеллы с низким значением pH , такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемой кислотой связывающей группы. Хотя pH сыворотки крови человека составляет 7,4, среднее значение pH в клетках немного ниже, от приблизительно 7,1 до 7,3. Эндосомы также имеют кислое значение pH в диапазоне от 5,5 до 6,0, а лизосомы – приблизительно 5,0 при еще более кислом значении pH . Соответственно, pH -зависимые расщепляемые линкеры иногда в данной области техники называют эндосомно лабильными линкерами.

[0268] Расщепляемая кислотой группа может иметь общую формулу $-\text{C}=\text{NN}-$, $\text{C}(\text{O})\text{O}$ или $-\text{OC}(\text{O})-$. В другом неограничивающем примере углерод, присоединенный к сложноэфирному кислороду (алкоксигруппе), присоединен к арильной группе, замещенной алкильной группой или третичной алкильной группой, такой как, например, диметилпентил или трет-бутил. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваясь ими, амин, имин, сложный аминокэфир, бензойный имин, диортоэфир, полифосфэфир, полифосфазен, ацеталь, виниловый эфир, гидразон, цис-аконитат, гидразид, тиокарбамоил, имизин, азидометилметилмалеиновый ангидрид, тиопропионат, замаскированный эндосомолитический агент, цитраконильную группу или любую их комбинацию. Дисульфидные связи также чувствительны к pH .

[0269] В некоторых аспектах линкер содержит гидразоновую связь, неустойчивую к pH . Такие неустойчивые к кислотам связи широко используются в области конъюгатов, например, конъюгатов антитело-лекарственное средство. См., например, Zhou et al. (2011) *Biomacromolecules* 12:1460-7; Yuan et al. (2008) *Acta Biomater.* 4:1024-37; Zhang et al. (2008) *Acta Biomater.* 6:838-50; Yang et al. (2007) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321:462-8; Reddy et al. (2006) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58:229-36; Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnol.* 21:778-84, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0270] В определенных аспектах линкер содержит лабильную связь при низком значении pH , выбранную из следующего: кетали, которые лабильны в кислой среде (например, pH менее 7, более чем приблизительно 4) с образованием диола и кетона;

ацетали, которые в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) лабильны с образованием диола и альдегида; имины или иминий, которые лабильны в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) с образованием амина и альдегида или кетона; связи кремний-кислород-углерод, неустойчивые в кислых условиях; кремний-азотные (силазановые) связи; кремний-углеродные связи (например, арилсиланы, винилсиланы и аллилсиланы); малеаматы (амидные связи, синтезированные из производных малеинового ангидрида и аминов); ортоэфиры; гидразоны; активированные производные карбоновой кислоты (например, сложные эфиры, амиды), предназначенные для кислотно-катализируемого гидролиза); или виниловые эфиры.

[0271] Дополнительные примеры можно найти в патентах США No. №№ 9790494B2 и 8137695B2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

II.B.4.d Ферментативные расщепляемые линкеры

[0272] В некоторых аспектах линкер может содержать линкер, расщепляемый внутриклеточными или внеклеточными ферментами, например протеазами, эстеразами, нуклеазами, амидазами. Диапазон ферментов, которые могут расщеплять конкретный линкер в комбинации линкеров, зависит от конкретных связей и химической структуры линкера. Соответственно, пептидные линкеры можно расщеплять, например, пептидазами, линкеры, содержащие сложноэфирные связи, можно расщеплять, например, эстеразами; линкеры, содержащие амидные связи, могут расщепляться, например, амидазами; и т.п.

II.B.4.e Линкеры, расщепляемые протеазой

[0273] В некоторых аспектах линкер включает линкер, расщепляемый протеазой, т.е. линкер, который может расщепляться эндогенной протеазой. Только определенные пептиды легко расщепляются внутри или за пределами клеток. См., например, Trout et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629, и Umemoto et al. (1989) Int. J. Cancer 43:677-684. Расщепляемые линкеры могут содержать расщепляемые сайты, состоящие из α -аминокислотных единиц и пептидных связей, которые химически представляют собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и α -аминокислотной группой лизина, считаются непептидными связями и считаются нерасщепляемыми.

[0274] В некоторых аспектах расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления для протеазы, *например*, неприлизина (CALLA или CD10),

тиметополигопептидазы (TOP), лейкотриеновой гидролазы A4, эндотелин-конвертирующих ферментов, протеазы ste24, нейтролизина, митохондриальной промежуточной пептидазы, интерстициальных коллагеназ, коллагеназ, стромелизинов, эластазы макрофагов, матрилизина, желатиназы, мепринов, проколлагеновых С-эндопептидаз, проколлагеновых N-эндопептидаз, металлопротеиназ ADAM и ADAMT, миелинассоциированных металлопротеиназ, энамелизина, фактор некроза опухоли α -конвертирующего фермента, инсулизина, нардилизина, митохондриальной процессинговой пептидазы, магнолизина, дактилизин-подобных металлопротеиназ, нейтрофильной коллагеназы, матриксных металлопептидаз, матриксных металлопротеиназ мембранного типа, эндопептидазы SP2, простатоспецифического антигена (PSA), плазмина, урокиназы, белка активации фибробластов человека (FAP α), трипсина, химотрипсинов, кальдекрина, панкреатических эластаз, панкреатической эндопептидазы, энтеропептидазы, лейкоцитарной эластазы, миелобластов, химазы, триптазы, гранзима, химотриптического фермента рогового слоя, акрозина, калликреинов, компонентов и факторов комплемента, конвертазы c3/c5 альтернативного пути комплемента, сериновой протеазы, ассоциированной с маннозо-связывающим белком, факторов коагуляции, тромбина, протеина c, активатора плазминогена u и t, катепсина G, гепсина, простаина, эндопептидазы, активирующей фактор роста гепатоцитов, пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа, фурина, пропротеинконвертаз, пролилпептидаз, ациламиноацилпептидазы, пептидглициназы, сигнальной пептидазы, n-концевых нуклеофильных аминогидролаз, 20s протеасомы, γ -глутамилтранспептидазы, митохондриальной эндопептидазы, митохондриальной эндопептидазы Ia, htra2-пептидазы, матриптазы, протеазы сайта 1, легумаина, катепсинов, цистеиновых катепсинов, кальпаинов, убиквитинизопептидазы T, каспаз, гликозилфосфатидилинозитолпротеинтрансмидазы, прокоагулянта рака, прогормона тиолпротеазы, γ -глутамилгидролазы, блеомицингидролазы, сепразы, катепсина B, катепсина D, катепсина L, катепсина M, протеиназы K, пепсинов, химозина, гастриксина, ренина, япсина и/или карпинов, простатоспецифического антигена (PSA) или любой протеазы Asp-N, Glu-C, Lys-C или Arg-C в целом. См., например, Cancer Res. 77(24):7027-7037 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах расщепляемый линкерный компонент содержит пептид, содержащий от одного до десяти аминокислотных остатков. В этих аспектах пептид позволяет расщеплять линкер протеазой, тем самым облегчая высвобождение биологически активной молекулы при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Примеры пептидов включают, но не

ограничиваются ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, пентапептиды и гексапептиды.

[0275] Пептид может содержать встречающиеся в природе и/или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Термин «встречающаяся в природе аминокислота» относится к Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp и Tyr. «Неприродные аминокислоты» (т.е. аминокислоты, которые не встречаются в природе) включают, в качестве неограничивающего примера, гомосерин, гомоаргинин, цитруллин, фенилглицин, таурин, йодтирозин, селеноцистеин, норлейцин («Nle»), норвалин («Nva»), бета-аланин, L- или D-нафталанин, орнитин («Orn») и т.п. Пептиды могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухолессоциированной протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмينا.

[0276] Аминокислоты также включают D-формы природных и неприродных аминокислот. «D-» обозначает аминокислоту, имеющую «D»- (правовращающую) конфигурацию, в отличие от конфигурации во встречающихся в природе («L-») аминокислотах. Природные и неприродные аминокислоты можно приобрести коммерчески (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) или синтезировать с использованием способов, известных из уровня техники.

[0277] Примеры дипептидов включают, но не ограничиваясь ими, валин-аланин, валин-цитруллин, фенилаланин-лизин, N-метил-валин-цитруллин, циклогексилаланин-лизин и бета-аланин-лизин. Примеры трипептидов включают, но не ограничиваясь ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).

II.B.4.f Линкеры, расщепляемые эстеразой

[0278] Некоторые линкеры расщепляются эстеразами («линкеры, расщепляемые эстеразой»). Только определенные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами и амидазами, присутствующими внутри или вне клеток. Сложные эфиры образуются при конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с простыми спиртами, такими как алифатические спирты, а также с малыми циклическими и малыми ароматическими спиртами. Примеры расщепляемых связующих групп на основе сложных эфиров включают, но без ограничения ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемая сложным эфиром связывающая группа имеет общую формулу -C (O) O- или -OC (O)-.

II.B.4.g Линкеры, расщепляемые фосфатазой

[0279] В некоторых аспектах комбинация линкеров может включать расщепляемую связывающую группу на основе фосфата, отщепляемую агентом, который разрушает или гидролизует фосфатные группы. Примером агента, расщепляющего внутриклеточные фосфатные группы, является фермент, такой как внутриклеточная фосфатаза. Примеры связывающих групп на основе фосфата являются $\text{—O—P (O) (OR}_k\text{)—O—}$, $\text{—O—P (S) (OR}_k\text{)—O—}$, $\text{—O—P (S) (SR}_k\text{)—O—}$, $\text{—S—P (O) (OR}_k\text{)—O—}$, $\text{—O—P (O) (OR}_k\text{)—S—}$, $\text{—S—P (O) (OR}_k\text{)—S—}$, $\text{—O—P (S) (OR}_k\text{)—S—}$, $\text{—SP (S) (OR}_k\text{)—O—}$, $\text{—OP (O) (R}_k\text{)—O—}$, $\text{—OP (S) (R}_k\text{)—O—}$, $\text{—SP (O) (R}_k\text{)—O—}$, $\text{—SP (S) (R}_k\text{)—O—}$, $\text{—SP (O) (R}_k\text{)—S—}$, $\text{—OP (S) (R}_k\text{)—S—}$, где R_k представляет собой NH_2 , BH_3 , CH_3 , C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{1-6} алкокси или C_{6-10} арилокси. В некоторых аспектах C_{1-6} алкил и C_{6-10} арил являются незамещенными. Дополнительными неограничивающими примерами являются —O—P (O) (OH)—O— , —O—P (S) (OH)—O— , —O—P (S) (SH)—O— , —S—P (O) (OH)—O— , —O—P (O) (OH)—S— , —S—P (O) (OH)—S— , —O—P (S) (OH)—S— , —S—P (S) (OH)—O— , —O—P (O) (H)—O— , —O—P (S) (H)—O— , —S—P (O) (H)—O— , —SP (S) (H)—O— , —SP (O) (H)—S— , —OP (S) (H)—S— или —O—P (O) (OH)—O— .

II.B.4.h Фотоактивированные расщепляемые линкеры

[0280] В некоторых аспектах комбинация включает фотоактивированный расщепляемый линкер, например, нитробензильный линкер или линкер, содержащий нитробензильную реактивную группу.

II.C Саморасщепляющийся спейсер

[0281] В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер в ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,4-элиминированию после ферментативного расщепления линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер в ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,6-элиминированию после ферментативного расщепления линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер представляет собой, например, пара-аминобензилкарбамат (РАВС), пара-аминобензиловый эфир (РАВЕ), пара-аминобензилкарбонат или их комбинацию.

[0282] В определенных аспектах саморасщепляющийся спейсер содержит ароматическую группу. В некоторых аспектах ароматическая группа выбрана из группы, состоящей из бензила, циннамила, нафтила и бифенила. В некоторых аспектах ароматическая группа является гетероциклической. В других аспектах ароматическая группа содержит по меньшей мере один заместитель. В некоторых аспектах по меньшей мере один заместитель выбран из группы, состоящей из F, Cl, I, Br, OH, метила, метокси,

NO₂, NH₂, NO³⁺, NHCOCH₃, N(CH₃)₂, NHCOCF₃, алкила, галоалкила, C₁-C₈ алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната.

[0283] В других аспектах по меньшей мере один С в ароматической группе замещен N, O или C-R", где R" независимо выбран из H, F, Cl, I, Br, OH, метила, метокси, NO₂, NH₂, NO³⁺, NHCOCH₃, N(CH₃)₂, NHCOCF₃, алкила, галоалкила, C₁-C₈ алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната.

[0284] В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер содержит аминокбензилкарбаматную группу, аминокбензилэфирную группу или аминокбензилкарбонатную группу. В одном аспекте саморасщепляющийся спейсер представляет собой пара-аминокбензилкарбамат (РАВС). Пара-аминокбензилкарбамат (РАВС) является наиболее эффективным и наиболее распространенным соединительным звеном для саморасщепляющейся сайт-специфической активации пролекарства (см., *например*, Carl *et al.* (1981) J. Med. Chem. 24:479-480; WO 1981/001145; Rautio *et al.* (2008) Nature Reviews Drug Discovery 7:255-270; Simplicio *et al.* (2008) Molecules 13:519-547, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). РАВС позволяет высвободить любые аминоквенные средства, пептиды и белки при расщеплении протеазой и 1,6-спонтанной фрагментации.

[0285] В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер соединяет биологически активную молекулу (*например*, антитело) с расщепляемым протеазой субстратом. В конкретных аспектах карбаматная группа саморасщепляющегося спейсера РАВС соединена с N-концом биологически активной молекулы (*например*, антитела), а аминокгруппа саморасщепляющегося спейсера РАВС связана с расщепляемым протеазой субстратом.

[0286] Ароматическое кольцо аминокбензильной группы необязательно может быть замещено одним или несколькими (*например*, R₁ и/или R₂) заместителями в ароматическом кольце, которые заменяют водород, который в противном случае присоединен к одному из четырех незамещенных атомов углерода, которые образуют кольцо. В контексте данного документа символ «R_x» (*например*, R₁, R₂, R₃, R₄) представляет собой общее сокращение, обозначающее группу заместителей, как описано в данном документе.

[0287] Группы заместителей могут улучшать способность пара-аминокбензильной группы к саморазрушению. См. Hay *et al.* (1999) J. Chem Soc., Perkin Trans. 1:2759-2770; см. также Sykes *et al.* J. (2000) Chem. Soc., Perkin Trans. 1:1601-1608.

[0288] Саморасщепление может происходить, *например*, посредством 1,4-элиминирования, 1,6-элиминирования (*например*, РАВС), 1,8-элиминирования (*например*, пара-аминокциннамиловый спирт), □-элиминирования, циклизации-элиминирования

(например, сложный эфир 4-аминобутанола и этилендиамина), циклизации/лактонизации, циклизации/лактолизации и *т.д.* См., например, Singh *et al.* (2008) Curr. Med. Chem. 15:1802-1826, и Greenwald *et al.* (2000) J. Med. Chem. 43:475-487.

[0289] В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер может содержать, например, циннамильную, нафтильную или бифенильную группы (см., например, Blencowe *et al.* (2011) Polym. Chem. 2:773-790). В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер содержит гетероциклическое кольцо (см., например, патенты США №№ 7375078; 7754681). Многочисленные гомоароматические группы (см. например, Carl *et al.* (1981) J. Med. Chem. 24:479; Senter *et al.* (1990) J. Org. Chem. 55:2975; Taylor *et al.* (1978) J. Org. Chem. 43:1197; Andrianomenjanahary *et al.* (1992) Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1903) и гетероароматические группы на основе кумарина (см., например, Weinstein *et al.* (2010) Chem. Commun. 46:553), фурана, тиофена, тиазола, оксазола, изоксазола, пиррола, пиразола (см., например, Hay *et al.* (2003) J. Med. Chem. 46:5533), пиридина (см., например, Perry-Feigenbaum *et al.* (2009) Org. Biomol. Chem. 7:4825), имидазона (см., например, Nailor *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1267; Hay and Denny (1997) Tetrahedron Lett. 38:8425) и триазола (см., например, Bertrand and Gesson (2007) J. Org. Chem. 72:3596), которые являются саморасщепляющимися как в водных, так и в физиологических условиях, известны из уровня техники. См. также патенты США №№ 7691962; 7091186; и патентные публикации США №№ US2006/0269480; US2010/0092496; US2010/0145036; US2003/0130189; и US2005/0256030, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0290] В некоторых аспектах малеимидный фрагмент, раскрытый в данном документе, содержит более одного саморасщепляющегося спейсера в тандеме, например, две или более единиц PABC. См., например, de Groot *et al.* (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830. В некоторых аспектах малеимидный фрагмент может содержать саморасщепляющийся спейсер (например, пара-аминобензиловый спирт или гемитиоаминальное производное пара-карбоксибензальдегида или глиоксиловой кислоты), связанный с фторуглеродным зондом (см., например, Meyer *et al.* (2010) Org. Biomol. Chem. 8:1777-1780).

[0291] Если группы заместителей в саморасщепляющихся линкерах определены их общепринятыми химическими формулами, записанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые возникли бы в результате написания структуры справа налево. Например, «-CH₂O-» также означает «-OCH₂-».

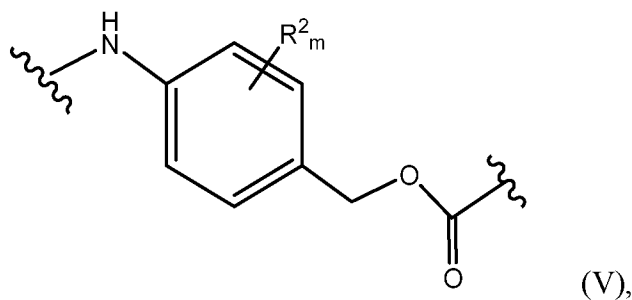
[0292] Группы заместителей в саморасщепляющемся линкере, например, заместители R_1 и/или R_2 в пара-аминобензильном саморасщепляющемся линкере, как обсуждалось выше, могут включать, *например*, алкил, алкилен, алкенил, алкинил, алкокси, алкиламино, алкилтио, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, ариалалкил, арилокси, гетероарил и *т.д.* Когда соединение по настоящему изобретению содержит более одного заместителя, тогда каждый из заместителей выбран независимо.

[0293] В некоторых конкретных аспектах линкер имеет формулу (IV):



где каждый $-A-$ независимо представляет собой аминокислотную единицу, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; $-Y-$ представляет собой спейсерную единицу, а y равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах $-A_a-$ представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид. В некоторых аспектах $-A_a-$ выбран из группы, состоящей из валин-аланина, валин-цитруллина, фенилаланин-лизина, N-метилвалин-цитруллина, циклогексилаланин-лизина и бета-аланин-лизина. В некоторых аспектах $-A_a-$ представляет собой валин-аланин или валин-цитруллин. В некоторых аспектах y равно 1. В некоторых аспектах $-Y-$ представляет собой саморасщепляющийся спейсер.

[0294] В некоторых аспектах саморасщепляющийся спейсер $-Y_y-$ имеет формулу (V):



где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; a является целым числом от 0 до 4. В некоторых аспектах m равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах m равно 0.

[0295] В некоторых аспектах расщепляемый линкер формулы (IV) содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат. В некоторых аспектах спейсерная единица $-Y-$ представляет собой несаморасщепляющийся спейсер, например, $-Gly-$ или $-Gly-Gly-$.

[0296] В некоторых аспектах линкер представляет собой кислотолабильный линкер. В некоторых аспектах кислотолабильный линкер представляет собой цис-аконитовый

линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию. В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с кислотолабильным линкером. Подходящие спейсерные единицы описаны выше в связи с $-Y_y-$.

[0297] В некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер, содержащий, *например*, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером.

[0298] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена ВВ (*например*, экзосома), содержащая биологически активную молекулу и расщепляемый линкер, при этом расщепляемый линкер соединяет ВВ (*например*, экзосому), с биологически активной молекулой, и расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), дополнительно содержит малеимидный фрагмент, который связывает ВВ (*например*, экзосому), с расщепляемым линкером посредством функциональной группы, присутствующей на ВВ (*например*, экзосоме). Подходящими малеимидными фрагментами являются те, что описаны выше, такие как, *например*, малеимидные фрагменты формул (I), (II) и (III). В некоторых аспектах малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ (*например*, экзосоме), при этом функциональная группа представляет собой сульфгидрил (тиол), при этом сульфгидрильная группа находится на белке на поверхности ВВ (*например*, экзосоме), *например*, внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы).

[0299] В настоящем изобретении также предложена ВВ (*например*, экзосома), содержащая малеимидный фрагмент, расщепляемый линкер и биологически активную молекулу, при этом малеимидный фрагмент связывает ВВ (*например*, экзосому), с расщепляемым линкером, а расщепляемый линкер связывает малеимидный фрагмент биологически активной молекулы.

II.D Биологически активные молекулы

[0300] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), раскрываемая в данном документе, способна доставлять полезную нагрузку (*например*, биологически активную молекулу, химически связанную с ВВ, *например*, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента) к мишени. Полезная нагрузка представляет собой агент, который действует на мишень (*например*, целевую клетку), которая приведена в контакт с ВВ (*например*,

экзосомой). Приведение в контакт может происходить *in vitro* или в организме субъекта. Неограничивающие примеры полезных нагрузок, которые могут быть связаны с ВВ (*например*, экзосомой), например, химически связаны посредством малеимидного фрагмента, включают такие агенты, как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или mRNA, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такую как miRNA, dsDNA, lncRNA или siRNA), морфолино, аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, которые нарушают трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы, малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарственные средства и токсины), антигены (*например*, антигены вакцинны), адъюванты или их комбинации.

[0301] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) может содержать более одной полезной нагрузки, *например*, первую полезную нагрузку в растворе просвета ВВ (*например*, экзосомы) и вторую полезную нагрузку, связанную, *например*, с внешней поверхностью ВВ (*например*, экзосомы) посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит малую молекулу. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит пептид. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит антиген, например, антиген вакцины. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит адъювант вакцины.

II.D.1 Полезные нагрузки, нацеленные на антигены и антигены вакцин

[0302] В некоторых аспектах полезная нагрузка взаимодействует с антигеном, например, опухолевым антигеном. В некоторых аспектах биологическая функция антигена, например опухолевого антигена, модулируется взаимодействием с полезной нагрузкой (*например*, если антиген является рецептором, полезная нагрузка может представлять собой агонист рецептора или антагонист рецептора). В других аспектах полезная нагрузка содержит антиген, способный вызывать иммунную реакцию (т.е. антиген вакцины). В некоторых аспектах полезная нагрузка может содержать антиген, способный индуцировать иммунную реакцию (т.е. антиген вакцины), и адъювант (т.е. адъювант вакцины). В некоторых аспектах антиген вакцины и адъювант вакцины могут находиться на одной и той же ВВ, например, экзосоме. В других аспектах вакцина и адъювант вакцины могут находиться в разных ВВ, например, экзосомах.

[0303] Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают: альфа-фетопrotein (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), эпителиальный опухолевый

антиген (ETA), муцин 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцин 16 (MUC16), тирозиназу, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), опухолевый белок p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, лиганда 1 белка программируемой гибели (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой гибели (PD-L2), NY-ESO-1, ССПА, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, мезотелин, VEGFR, альфа-фолатный рецептор, CE7R, IL-3, раково-тестикулярный антиген (CTA), MART-1 gp100, TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд или их комбинации.

[0304] Полезные нагрузки, взаимодействующие с биологической функцией опухолевых антигенов и, например, модулирующие ее, включают, например, антитела и их связывающие фрагменты, аптамеры, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) и малые молекулы.

[0305] В некоторых аспектах антиген является универсальным опухолевым антигеном. В контексте данного документа термин «универсальный опухолевый антиген» относится к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая, как правило, экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в неопухолевых клетках, а также экспрессируется в опухолях различного происхождения. В некоторых аспектах универсальный опухолевый антиген экспрессируется более чем в приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или более случаев рака (*например*, видов рака человека). В некоторых аспектах универсальный опухолевый антиген может экспрессироваться в неопухолевых клетках (*например*, нормальных клетках), но при более низких уровнях, чем он экспрессируется в опухолевых клетках. В некоторых аспектах уровень экспрессии универсального опухолевого антигена больше в приблизительно 1 раз, в приблизительно 2 раза, в приблизительно 3 раза, в приблизительно 4 раза, в приблизительно 5 раз, в приблизительно 6 раз, в приблизительно 7 раз, в приблизительно 8 раз, в приблизительно 9 раз, в приблизительно 10 раз или более раз на опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми клетками. В некоторых аспектах универсальный опухолевый антиген не экспрессируется в нормальных клетках, а экспрессируется только в опухолевых клетках. Неограничивающие примеры универсальных опухолевых антигенов, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают антигены эндотелиальной выстилки в сосудистой сети опухоли, сурвивин, опухолевый белок D52 (TPD52), эпитопы андрогеновых рецепторов, рецептор 2 эфрина типа A (EphA2), обратную теломеразу человека, транскриптазу (hTERT), мышинный двойной микробелок 2 (MDM2), цитохром P450 1B1 (CYP1B), HER2/neu, ген 1 опухоли Вильмса (WT1), ливин, альфа-

фетопропротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), муцин 16 (MUC16), MUC1, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), p53 или циклин (D1).

[0306] В дополнительных аспектах антиген может включать неоантиген. В контексте данного документа термин «неоантиген» относится к антигенам, кодируемым опухолеспецифическими мутированными генами.

[0307] В некоторых аспектах антиген получают из бактерии, вируса, грибка, простейших или любой их комбинации. В некоторых аспектах антиген происходит от онкогенного вируса (также называемого в данном документе вирусами, ассоциированными с раком (CAV)). В дополнительных аспектах антиген получают из группы, включающей: гаммагерпесвирус человека 4 (т.е. вирус Эпштейна-Барра (EBV)), вирус гриппа А, вирус гриппа В, *staphylococcus aureus*, *mycobacterium tuberculosis*, *chlamydia trachomatis*, ВИЧ-1, ВИЧ-2, коронавирус (например, COVID-19, MERS-CoV и SARS CoV), филовирус (например, Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, виды *Plasmodia* (например, *vivax* и *falciparum*), вирус чикунгунья, вирус папилломы человека (HPV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), Т-лимфотропный вирус человека (HTLV1), вирус герпеса человека 8 типа (HHV8), полиомавирус клеток Меркеля (MCV), вирус простого герпеса 2 типа (HSV-2), *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Actinobacter* sp., коагулазонегативные стафилококки (CoNS), *Mycoplasma* sp., аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV) или их комбинации.

[0308] В некоторых аспектах антиген, полученный из EBV, представляет собой BZLF1. BZLF1 (также известный как Zta или EB1) представляет собой ранний вирусный ген EBV, который вызывает рак и инфицирует в первую очередь В-клетки у 95% населения человека. Этот ген (наряду с другими) вызывает экспрессию других генов EBV на других стадиях прогрессирования заболевания и участвует в преобразовании вируса из латентной формы в литическую. ZEBRA (активатор репликации вируса BamHI Z Эпштейна-Барра, также известный как Zta и BZLF1)) представляет собой ранний литический белок EBV, кодируемый BZLF1. См. Hartlage et al. (2015) *Cancer Immunol. Res.* 3(7): 787-94, и Rist et al. (2015) *J. Virology* 70:703-12, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе, содержащие антиген EBV, например, BZLF1, можно использовать, например, для лечения посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD). Такой ВВ можно вводить EBV-отрицательным пациентам, получавшим EBV-положительные трансплантаты. BZLF1 представляет собой доминантный Т-клеточный антиген, ассоциированный с устойчивой ремиссией у пациентов с PTLD. ВВ, например, экзосомы,

раскрытые в данном документе, содержащие BZLF1, могут вызывать мощный CD8-опосредованный Т-клетками иммунитет к BZLF1. Соответственно, иммунитет слизистой оболочки и резидентные клетки памяти могут защитить пациента от развития PTLDF. Неограничивающие иллюстративные антигены включают, но не ограничиваясь ими, антигены, раскрытые в патенте США № 8617564B2.

[0309] В некоторых аспектах антиген происходит от *Mycobacterium tuberculosis* для индукции клеточного и/или гуморального иммунного ответа. В некоторых аспектах антиген содержит один или несколько эпитопов *Mycobacterium tuberculosis* (антиген TB). С инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* ассоциированы различные антигены, включая ESAT-6, TB10.4, CFP10, Rv2031 (hspX), Rv2654c (TB7.7) и Rv1038c (EsxJ). См., например, Lindestam et al., J. Immunol. 188(10):5020-31 (2012), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов ESAT6. В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов TB10.4. В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов CFP10. В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов Rv2031 (hspX). В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов Rv2654c (TB7.7). В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит один или несколько эпитопов Rv1038c (EsxJ). В некоторых аспектах антиген, применимый для настоящего изобретения, содержит эпитоп, выбранный из группы, состоящей из ESAT6, TB10.4 (ESAT-6-подобный белок EsxH; cfp7), CFP10, Rv2031 (hspX), Rv2654c (TB7.7), Rv1038c (EsxJ) и любую их комбинацию.

[0310] В некоторых аспектах антиген TB содержит конкретный эпитоп антигена TB, например, конкретный эпитоп ESAT6 или TB10.4. В некоторых аспектах антиген ESAT6 содержит эпитоп, содержащий по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере десять аминокислот, по меньшей мере одиннадцать аминокислот, по меньшей мере двенадцать аминокислот, по меньшей мере тринадцать аминокислот, по меньшей мере четырнадцать аминокислот, по меньшей мере пятнадцать аминокислот из аминокислотной последовательности, как указано в MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEGGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQK WDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEGNVTGMFA (SEQ ID NO: 230; GenBank:

AWM98862.1). В некоторых аспектах, в которых антиген ТВ10.4 содержит эпитоп, содержащий по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере десять аминокислот, по меньшей мере одиннадцать аминокислот, по меньшей мере двенадцать аминокислот, по меньшей мере тринадцать аминокислот, по меньшей мере четырнадцать аминокислот, по меньшей мере пятнадцать аминокислот из аминокислотной последовательности, как указано в MSQIMYNYPAMLGHAGDMAGYAGTLQSLGAEIAVEQAALQSAWQGDTGITYQAWQA QWNQAMEDLVRAHYHAMSSTHEANTMAMMARDPAEAAKWGG (SEQ ID NO: 231; эталонная последовательность в NCBI: WP_057308237.1).

[0311] В некоторых аспектах антиген представляет собой аутоантиген. В контексте данного документа термин «аутоантиген» относится к антигену, который экспрессируется клеткой или тканью хозяина. В нормальном здоровом состоянии такие антигены распознаются организмом как собственные и не вызывают иммунного ответа. Однако при определенных болезненных состояниях собственная иммунная система организма может распознавать аутоантигены как чужеродные и вызывать иммунный ответ против них, что приводит к развитию аутоиммунитета. В определенных аспектах ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению могут содержать аутоантиген (т.е. собственный белок (зародышевый), на который были индуцированы ответы Т-клеток, что привело к развитию аутоиммунитета). Такие ВВ, например, экзосомы, можно использовать для нацеливания на аутореактивные Т-клетки и подавления их активности. Неограничивающие примеры аутоантигенов (включая ассоциированное заболевание или нарушение) включают: (i) белки бета-клеток, инсулин, островковый антиген 2 (IA-2), декарбоксилазу глутаминовой кислоты (GAD65) и переносчик цинка 8 (ZNT8) (сахарный диабет I типа), (ii) миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (MOG), основной белок миелина (MBP), протеолипидный белок (PLP) и миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) (рассеянный склероз), (iii) цитруллинированные антигены и синовиальные белки (ревматоидный артрит), (iv) аквапорин-4 (AQP4) (нейромиелит зрительного нерва), (v) никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) (миастения гравис), (vi) десмоглеин-1 (DSG1) и десмоглеин-2 (DSG2) (пузырчатка обыкновенная), (v) рецептор тиреотропина (болезнь Грейвса), (vi) коллаген IV типа (синдром Гудпастура), (vii) тиреоглобулин, тиреоидная пероксидаза и рецептор тиреотропного гормона (TSHR) (тиреоидит Хашимото), или (viii) их комбинации.

II.D.2 PROTAC

[0312] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит химерное соединение, нацеленное на протеолиз (PROTAC). PROTAC представляют собой гетеробифункциональные молекулы, состоящие из лиганда целевого белка, лиганда E3-убиквитинирующей лигазы и линкера, соединяющего два лиганда. После образования тройного комплекса мишень: PROTAC:E3, E2-убиквитинконъюгирующие ферменты переносят убиквитин к остаткам лизина на поверхности целевого белка. В некоторых аспектах мишенью PROTAC является, *например*, ER α , BCR-ABL, BRD4, PDE4, ERR α , RIPK2, c-ABL, BRD2, BRD3, BRD4, FKBP12, TBK1, BRD9, EGFR, c-Met, Sirt2, CDK9, FLT3, BTK, ALK, AR, TRIM24, SMAD3, RAR, PI3K, PCAF, METAP2, HER2, HDAC6, GCN5, ERK1/2, DHODH, CRABP-II, FLT4 или CK2. В некоторых аспектах целевой лиганд PROTAC представляет собой, *например*, 4-ОХТ, дазатиниб, JQ1, ингибитор PDE4, JQ1, хлоралкан, лиганд на основе тизолидиндиона, ингибитор RIPK2, босутиниб, производное JQ1, OTX015, стальной фактор, ингибитор TBK1, BI-7273, лапатиниб, gefitinib, афатиниб, фортетиниб, ингибитор 3b Sirt2, HJB97, SNS-032, аналог аминопиразола, AC220, RN-486, церитиниб, антагонист AR, IACS-7e или производное ибрутиниба. В некоторых аспектах лиганд PROTAC E3 представляет собой, *например*, производное LCL161, VHL1, производное гидроксипролина, помалидомид, талидомид, (R)-гидроксипролин-производное HIF-1 α , лиганд 2 VHL, производное VH032, леналидомид, производное талидомида или VL-269. В некоторых аспектах E3-лигаза представляет собой, *например*, IAP, VHL или CRBN. См., например, An & Fu (2018) EBioMedicine 36:553-562, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0313] PROTACS и родственные технологии, которые могут использоваться в соответствии со способами, раскрываемыми в данном документе, раскрыты, например, в WO2018106870, US2018155322, WO2018098288, WO2018098280, WO2018098275, WO2018089736, WO2018085247, US20180125821, US20180099940, WO2018064589, WO2018053354, WO2017223452, WO2017201449, WO2017197056, WO2017197051, WO2017197046, WO2017185036, WO2017185034, WO2017185031, WO2017185023, WO2017182418, US20170305901, WO2017176708, US20170281784, WO2017117474, WO2017117473, WO2017079723, US9938264, US20170065719, WO2017024319, WO2017024318, WO2017024317, US20170037004, US20170008904, US20180147202, WO2018051107, WO2018033556, US20160272639, US20170327469, WO2017212329, WO2017211924, US20180085465, US20160045607, US20160022642, WO2017046036, US20160058872, US20180134688, US20180118733, US20180050021, US9855273, US20140255361, US9115184, US20180093990, US20150119435, US20140356322,

US20140112922, US9765019, US20180100001, US7390656 или US7208157, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0314] В некоторых аспектах, когда несколько PROTAC присутствуют на ВВ (*например*, экзосоме), такие PROTAC могут быть одинаковыми или разными. В некоторых аспектах, когда несколько PROTAC присутствуют на ВВ (*например*, экзосоме), раскрываемые в данном документе, такие PROTAC могут быть одинаковыми или разными. В некоторых аспектах композиция ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению может содержать две или более популяции ВВ, например, экзосомы, где каждая популяция ВВ, например, экзосом, содержит различный PROTAC или их комбинацию.

[0315] В некоторых аспектах PROTAC содержит по меньшей мере одну сульфгидрильную группу, при этом малеимидный фрагмент связывает ВВ, *например*, экзосому, с PROTAC. В некоторых аспектах сульфгидрильная группа расположена на фрагменте лиганда ЕЗ в PROTAC. В некоторых аспектах сульфгидрильная группа расположена на фрагменте лиганда целевого белкового PROTAC. В некоторых аспектах сульфгидрильная группа расположена на фрагменте линкера PROTAC. В некоторых аспектах сульфгидрильная группа представляет собой встречающуюся в природе реакционноспособную группу в PROTAC.

[0316] В других аспектах малеимидный фрагмент вводится в PROTAC, например, посредством химической дериватизации. В некоторых аспектах химическая дериватизация происходит посредством бифункционального линкера (бифункционального реагента), который содержит фрагмент, способный реагировать с химической группой, присутствующей в PROTAC, фрагмент, содержащий фрагмент, способный реагировать с малеимидным фрагментом, раскрываемым в данном документе.

[0317] В некоторых аспектах лиганд ЕЗ-лигазы присоединен к PROTAC посредством расщепляемого линкера, например, PABC. В других аспектах целевой лиганд присоединен к PROTAC посредством расщепляемого линкера, например, PABC. В других аспектах как лиганд ЕЗ-лигазы, так и целевой лиганд присоединены к PROTAC посредством расщепляемых линкеров. В некоторых аспектах оба расщепляемых линкера могут представлять собой один и тот же расщепляемый линкер. В других аспектах оба расщепляемых линкера являются различными.

[0318] Функциональность PROTAC, например, PROTAC, связанных с ВВ, например, экзосомой, раскрываемой в данном документе, можно оценить в соответствии со способами *in vitro* и *in vivo*, известными из уровня техники. Например, поскольку PROTAC индуцирует опосредованное убиквитином расщепление целевого белка, активность PROTAC может быть определена с использованием анализов, которые непосредственно

измеряют расщепление целевого белка (например, вестерн-блоттинг) или измеряют функциональную активность, опосредованную целевым белком (например, изменения в фосфорилировании или опосредуемой фосфорилированием клеточной сигнализации, если целевой белок является протеинкиназой).

[0319] В некоторых конкретных аспектах PROTAC содержит ТВК1-нацеливающий лиганд, линкер и лиганды, связывающие VHL (лигаза E3) (см., например, Фиг. 10С).

[0320] В других аспектах ВВ, например экзосома, содержит два предшественника для образования CLIPAC (PROTAC, образованного с помощью клик-химии). Соответственно, ВВ, например, экзосома по настоящему изобретению, может содержать две популяции предшественников CLIPAC, связанных с ВВ посредством малеимидных фрагментов. После связывания ВВ с целевой клеткой предшественники CLIPAC можно комбинировать внутриклеточно с помощью биоортогональной комбинации клик-химии, чтобы получить гетеробифункциональный PROTAC. См. Lebraud et al. (2016) ACS Cent. Sci. 2:927-934, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0321] В общем, PROTAC может быть описан в соответствии с формулой [ULM]-[L]-[PTM], где [ULM] представляет собой убиквитин-L связывающий фрагмент (первый лиганд), [L] представляет собой линкер и [PTM] представляет собой нацеленную на белок группу (второй лиганд). Иллюстративные PROTAC представлены в следующей таблице. В таблице указаны убиквитинирующий фермент, на который нацелен [ULM], и соответствующий ему лиганд [ULM], а также на белок, на который нацелен [PTM], и соответствующий ему лиганд [ULM].

ТАБЛИЦА 1: Иллюстративные PROTAC

Литературный источник	Связывающий лиганд [ULM]	Целевой фермент [ULM]	Целевой белок [PTM]	Лиганд [PTM]
US7041298 B2	Пептид IκB-альфа или IκB-альфа	SCF E3-убиквитинлигаза	MetAP-2 (метионинамино пептидаза-2)	Овалицин
US7208157 B2	Пептид IκB-альфа или IκB-альфа	SCF E3-убиквитинлигаза	Эстрогеновый рецептор	Эстрадиол
US6638734 B1	Связывающий домен Siah-1 при деградации белка	E3-убиквитинпротеинлигаза SIAH1	Любой	Любой

US7390656 B2	Специфические лиганды, раскрытые в литературном источнике	Е3-убиквитинпротеинлигазы BAG-1, APC, SIP-L, SIP-S или Siah-1	Любой	Любой
US9163330 B2	Штапелированные или прошитые лиганды, раскрытые в литературном источнике	Любой убиквитинирующий фермент	Любой	Штапелированные или прошитые лиганды, раскрытые в литературном источнике
US9765019 B2	Arg-Tag, раскрытые в литературном источнике	Отсутствует (Arg-Tag запускает расщепление, направляя комплекс в протеасому)	Любой	Любой
US2014011 2922A1	Мотив U-бокса	Отсутствует (PROTAC включает мотив U-бокса, т.е. функциональную Е3-лигазу, которая способна убиквитинировать мишень)	Любой	Любой (например, антитело)
US2014035 6322A1	Фрагмент, связывающий низкомолекулярную убиквитинлигазу	Любая Е3-убиквитинлигаза	Любой	Любой

	с -ОН или пролильной группой			
US2015011 9435A1	Низкомолекулярная гидрофобная метка (метка расщепления или дегрон), которая индуцирует расщепление протеасом	Отсутствует	Любой	Любой
US9758522 B2	Низкомолекулярная гидрофобная метка (метка расщепления или дегрон), которая индуцирует расщепление протеасом	Отсутствует	Любой	Любой
US2018005 0021A1	Специфические лиганды, нацеленные на E3-убиквитинлигазу, раскрыты в литературном источнике	Любая E3-убиквитинлигаза	Любой	Любой
US2018011 8733A1	Связывающее соединение IAP	E3-убиквитинпротеинлигаза IAP	Любой	Любой
US2018013 4688A1	Связывающее соединение IAP	E3-убиквитинпротеинлигаза IAP	RIP2-киназа	Ингибитор RIP2-киназы

US2015029 1562A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу цереблон (например, талидомид, леналидомид, помалидомид, их аналоги, их изостеры или их производные)	E3-убиквитинлигаза цереблон	Любой	Любой
US2016005 8872A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу цереблон (например, талидомид, леналидомид, помалидомид, их аналоги, их изостеры или их производные)	E3-убиквитинлигаза цереблон	Бромодомен-содержащий белок или полипептид	Связывание лиганда с бромодомен-содержащим белком или полипептидом
WO201704 6036A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу Cereblon	E3-убиквитинлигаза цереблон	RIP2-киназа	Низкомолекулярный лиганд RIP2-киназы
US2016002 2642A1	Любой	Любой	Андрогеновый рецептор	Низкомолекулярный лиганд андрогенового рецептора

US2016004 5607A1	Низкомолекулярный убиквитинлигаза-связывающий фрагмент с функциональной группой, которая может метаболизироваться до –ОН	Любой	Рецептор альфа, связанный с эстрогеном	Нацеленный на лиганд рецептор альфа, связанный с эстрогеном
US9694084 B2	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой является цереблон)	SMARCA2 или RAS	Малая молекула с определенной формулой, которая связывается с SMARCA2 или RAS
US9821068 B2	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой является цереблон)	CREBBP, TRIM24, BRPF1, глюкокортикоидный рецептор, эстрогеновый рецептор, андрогеновый рецептор, DOT1L, BRAF, HER3, Bcl-2, Bcl-XL, HDAC или PPAR-гамма	Малая молекула с конкретной формулой, раскрытой в литературном источнике
US9770512 B2	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-	E3-убиквитинлигаза	SMARCA2 или RAS	Малая молекула с определенной

	убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	(предпочтительной лигазой является цереблон)		формулой, которая связывается с SMARCA2 или RAS
US9750816 B2	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой является цереблон)	CREBBP, TRIM24, BRPF1, глюкокортикоидный рецептор, эстрогеновый рецептор, андрогеновый рецептор, DOT1L, BRAF, HER3, Bcl-2, Bcl-XL, HDAC или АСПЕКТPPAR-гамма	Малые молекулы с конкретной формулой, раскрытой в литературном источнике
US2018000 9779A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой является цереблон)	Бромодомен-содержащий белок BET (предпочтительным аспектом является BRD4)	Специфические низкомолекулярные лиганды, связывающиеся с бромодоменом, раскрытые в литературном источнике
US2018008 5465A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой	FKBP12 (FK506-связывающий белок массой 12 кДа; регулятор	Специфические низкомолекулярные лиганды, связывающиеся

	специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	является (цереблон)	клеточного цикла)	я с FKBP12, раскрытые в литературном источнике
US20180134684A1	Низкомолекулярные лиганды, связывающие E3-убиквитинлигазу, со специфическими формулами, раскрытыми в литературном источнике	E3-убиквитинлигаза (предпочтительной лигазой является (цереблон)	FKBP12 (FK506-связывающий белок массой 12 кДа; регулятор клеточного цикла)	Специфические низкомолекулярные лиганды, связывающиеся с FKBP12, раскрытые в литературном источнике
WO2017211924A1 US20190152946A1	Связывающее соединение IAP	E3-убиквитинпротеинлигаза IAP	IRAK3, GAK, TEC, PTK2B(PYK2), AURKA, RPS6KA1(RSK3), MAPK9(JNK2), BTK, PTK2 или AKT2	Связывание лиганда с IRAK3, GAK, TEC, PTK2B(PYK2), AURKA, RPS6KA1(RSK3), MAPK9(JNK2), BTK, PTK2 или AKT2
WO2017212329A1	Широкое связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой (лиганд может представлять собой пептид,	E3-убиквитинпротеинлигаза (например, (цереблон)	Любой	Любой

	антитело, малую молекулу и т.д.)			
US2016021 4972A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой	E3-убиквитинпротеинлигаза, например, E3-убиквитинпротеинлигаза Гиппеля-Линдау	Андрогеновый рецептор	Специфически е низкомолекулярные лиганды андрогеновых рецепторов, раскрытые в литературном источнике
US2016027 2639A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой Гиппеля-Линдау	E3-убиквитинпротеинлигаза Гиппеля-Линдау	Любой	Любой
WO201803 3556A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой церебллоном	E3-убиквитинпротеинлигаза цереблон	AAK1, ABL1, AURKA, AURKB, BTK, GAK, IRAK3, LATSI, MAPK9, PRKAA1, PTK2, PTK2B, RPS6KA1, RPS6KA3 или TEC-киназы	Связывание лигандов с AAK1, ABL1, AURKA, AURKB, BTK, GAK, IRAK3, LATSI, MAPK9, PRKAA1, PTK2, PTK2B, RPS6KA1, RPS6KA3 или TEC-киназами, раскрытыми в литературном источнике
WO201805 1107A1	Специфические лиганды, содержащие	E3-убиквитинпротеинлигаза	Любой	Любой

	производные фторгидроксипролина, которые связываются с E3-убиквитинпротеинлигазами, раскрытыми в литературном источнике.			
US20180147202A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой	E3-убиквитинпротеинлигаза, например, E3-убиквитинлигаза Хиппеля-Линдау (VHL), IAP, цереблон или MDM2.	TANK-связывающая киназа 1	TBK1-связывающий лиганд
US20170008904A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой MDM2	E3-убиквитинпротеинлигаза MDM2	Любой	Любой
US20170037004A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой IAP	E3-убиквитинпротеинлигаза IAP	Любой	Любой
US20170065719A1	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой, выбранной из группы, состоящей из VHL, IAP,	E3-убиквитинпротеинлигаза, выбранная из группы, состоящей из VHL, IAP,	Бромодомен и экстратерминальный домен (BET)	Низкомолекулярный бромодомен и экстратерминальный домен (BET)-содержащий фрагмент,

	цереблону и MDM2.	цереблону и MDM2.		нацеленный на белок
US9938264 B2	Связывание лиганда с E3-убиквитинпротеинлигазой	E3-убиквитинлигаза (VHL) Гиппеля-Линдау или E3-лигаза цереблон (CRBN)	Тирозинкиназа, например, c-ABL или BCR-ABL	Ингибитор тирозинкиназы
WO2017117473A1	Связывание малой молекулы с E3-убиквитинпротеинлигазой (дегрон)	E3-убиквитинпротеинлигаза	Her3	Низкомолекулярные лиганды Her3 со специфическими структурами, описанными в литературном источнике
WO2017117474A1 US20190016703A1	Связывание малой молекулы с E3-убиквитинпротеинлигазой (дегрон)	E3-убиквитинпротеинлигаза	Her3	Низкомолекулярные лиганды Her3 со специфическими структурами, описанными в литературном источнике
WO2017182418A1 US20190119271A1	Специфические ингибиторы IAP, раскрытые в литературном источнике	E3-убиквитинпротеинлигаза IAP	RIPK2-киназа	Ингибитор RIPK2-киназы
WO2017185023A1	Связывание молекулы (дегрона) с E3-	E3-убиквитинпротеинлигаза	CDK9-киназа	Специфические лиганды, связывающие

US2019011 1143A1	убиквитинпротеинлигазой			CDK9, раскрытые в литературном источнике
WO201718 5031A1 US2019009 2768A1	Связывание молекулы (дегрона) с E3- убиквитинпротеинлигазой	E3- убиквитинпротеинлигаза	CDK4 или CDK6-киназа	Специфически е лиганды, связывающие CDK4 или CDK6-киназы, раскрытые в литературном источнике
WO201718 5034A1 US2019011 2307A1	Связывание молекулы (дегрона) с E3- убиквитинпротеинлигазой	E3- убиквитинпротеинлигаза	CDK8-киназа	Специфически е лиганды, связывающие CDK8, раскрытые в литературном источнике
WO201718 5036A1 US2019010 6417A1	Связывание молекулы (дегрона) с E3- убиквитинпротеинлигазой	E3- убиквитинпротеинлигаза	EGFR	Специфически е лиганды, связывающие EGFR, раскрытые в литературном источнике
WO201719 7046A1 US2019007 6542A1	C3-углерод- замещенные- глутаримиды дегроны, связывающиеся с E3- убиквитинпротеинлигазой,	E3- убиквитинпротеинлигаза	Любой	Любой

	раскрытые в литературном источнике.			
WO2017197051A1 US20190076539A1	С3-глутаримиды дегроны аминного линкера, связывающиеся с Е3-убиквитинпротеинлигазой, раскрытые в литературном источнике.	Е3-убиквитинпротеинлигаза	Любой	Любой
WO2017197055A1 US20190076541A1	Гетероциклические дегроны, связывающиеся с Е3-убиквитинпротеинлигазой, раскрытые в литературном источнике	Е3-убиквитинпротеинлигаза	Любой	Любой
WO2017197056A1	Связывание дегрона с Е3-убиквитинпротеинлигазой	Е3-убиквитинпротеинлигаза	Бромодомен-содержащий белок	Связывание лиганда с бромодоменом
WO2017201449A1 US20190175612A1	Связывание лиганда с Е3-убиквитинпротеинлигазой	Е3-убиквитинпротеинлигаза	Любой	Любой
WO2017223415A1	Связывание лиганда с Е3-убиквитинпротеинлигазой	Е3-убиквитинпротеинлигаза	TRIM24	Связывание лиганда с TRIM24

WO201722 3452A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинпротеи нлигазой	E3- убиквитинпроте инлигаза	BRD9	Связывание лиганда с BRD9
WO201805 3354A1 US2018007 2711A1	Индол- производные дегроны раскрыты в литературном источнике	E3- убиквитинпроте инлигаза	Эстрогеновый рецептор	Связывание лиганда с эстрогеновым рецептором раскрыто в литературном источнике
WO201806 4589A1 US1023988 8B2	Низкомолекулярн ые дегроны, способные связываться с мутантной E3- убиквитинпротеи нлигазой цереблонеом	Мутантная E3- убиквитинпроте инлигаза (мутант цереблонеа)	Любой	Любой
WO201807 1606A1 US2018009 9940A1	Связывание дегронов с E3- убиквитинпротеи нлигазой цереблонеом	E3- убиквитинпроте инлигаза цереблоне	Андрогеновый рецептор	Связывание специфических лигандов с андрогеновым рецептором, раскрытых в литературном источнике
WO201810 2067A2 US2018012 5821A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинпротеи нлигазой, (например, E3- убиквитинлигазо й Гиппеля- Линдау (VHL)	E3- убиквитинпроте инлигаза (например, E3- убиквитинлигаз а Гиппеля- Линдау (VHL) или E3-лигаза	Тау-белок	Специфическо е связывание лиганда с тау- белком, раскрытое в литературном источнике.

	или E3-лигазой цереблонеом (CRBN))	цереблон (CRBN))		
WO201808 5247A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	MALT1 (белок 1 транслокации, ассоциированны й с лимфоидной тканью слизистой оболочкой)	Специфическо е связывание лиганда с MALT1, раскрытое в литературном источнике
WO201808 9736A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	Протеинкиназа, раскрытая в литературном источнике	Специфически е лиганды, связывающие я с протеинкиназа ми, раскрытыми в литературном источнике
WO201809 8275A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	Тирозинкиназа Брутона (ВТК);	Специфически е лиганды, связывающие ВТК, раскрытые в литературном источнике
WO201809 8280A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	Протеинкиназы, раскрытые в литературном источнике	Специфически е лиганды, связывающие я с протеинкиназа ми, раскрытыми в литературном источнике

WO201809 8288A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	Тирозинкиназа Брутона (ВТК);	Специфически е лиганды, связывающие ВТК, раскрытые в литературном источнике
WO201810 2725A1 US2018015 5322A1	Связывание лиганда с E3- убиквитинлигазо й	E3- убиквитинлигаз а	Эстрогеновый рецептор	Лиганды тетрагидронаф талины или тетрагидроизох инолина, связывающие я с эстрогеновым рецептором
WO201810 6870A1	Помалидомид, талидомид, леналидомид, VHL-1, адамантан или их аналоги	E3- убиквитинлигаз а	CDK4/6-киназа	Абемациклиб, палбоциклиб, рибоциклиб, трилациклиб, G1T38, SHR6390 или их аналоги

[0322] Все другие патентные заявки и патенты, раскрываемые в приведенной выше таблице, включены посредством ссылки в полном объеме.

[0323] Конкретные линкеры, которые можно использовать в PROTAC, раскрыты, например, в публикациях патентных заявок США №№ US20180050021A1, US20180118733A1, US20180009779A1, US20180085465A1, US20180134684A1 и US20180134688A1, патентах США №№№ US9694084B2, US9821068B2, US9770512B2 и US9750816B2 и международной патентной публикации WO2018085247A1, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В WO2017212329A1 раскрыто образование PROTAC, содержащего линкер, генерируемый посредством реакции клик-химии.

II.D.3 Стимулятор агонистов генов интерферона (STING)

[0324] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит нуклеотид, при этом нуклеотид является агонистом стимулятора генов интерферона (STING). STING представляет собой цитозольный сенсор циклических динуклеотидов, который обычно вырабатывается бактериями. После активации он приводит к выработке интерферонов типа I и запускает иммунный ответ

[0325] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит один или несколько агонистов STING, связанных с ВВ (*например*, экзосомой), например, химически связанных посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах агонист STING включает циклический динуклеотидный агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING.

[0326] Циклические пуриновые динуклеотиды, такие как, помимо прочего, cGMP, циклический di-GMP (c-di-GMP), cAMP, циклический di-AMP (c-di-AMP), циклический-GMP-AMP (cGAMP), циклический di-IMP (c-di-IMP), циклический AMP-IMP (cAIMP) и любой его аналог, как известно, стимулируют или усиливают иммунный или воспалительный ответ у пациента. CDN могут иметь связи 2'2', 2'3', 2'5' или 3'3' или 3'5', связывающие циклические динуклеотиды, или любую их комбинацию.

[0327] Циклические пуриновые динуклеотиды можно модифицировать стандартными методиками органической химии для получения аналогов пуриновых динуклеотидов. Подходящие пуриновые динуклеотиды включают, но не ограничиваясь ими, аденин, гуанин, инозин, гипоксантин, ксантин, изогуанин или любой другой подходящий пуриновый динуклеотид, известный из уровня техники. Циклические динуклеотиды могут быть модифицированными аналогами. Можно использовать любую подходящую модификацию, известную из уровня техники, включая, но не ограничиваясь ими, модификации фосфоротиоата, бифосфоротиоата, фторината и дифторината.

[0328] Также можно использовать нециклические динуклеотидные агонисты, такие как 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA), или любой другой нециклический динуклеотидный агонист, известный из уровня.

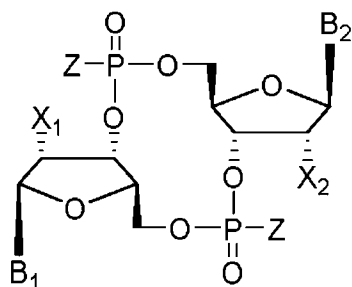
[0329] Предполагается, что можно использовать любой агонист STING. Среди агонистов STING присутствуют DMXAA, агонист STING-1, ML RR-S2 CDA, ML RR-S2c-di-GMP, ML-RR-S2 cGAMP, 2'3'-c-di-AM(PS)₂, 2'3'-cGAMP, 2'3'-cGAMPdFHS, 3'3'-cGAMP, 3'3'-cGAMPdFSH, cAIMP, cAIM(PS)₂, 3'3'-cAIMP, 3'3'-cAIMPdFSH, 2'2'-cGAMP, 2'3'-cGAM(PS)₂, 3'3'-cGAMP, c-di-AMP, 2'3'-c-di-AMP, 2'3'-c-di-AM(PS)₂, c-di-GMP, 2'3'-c-di-GMP, c-di-IMP, c-di-UMP или любая их комбинация. В конкретном аспекте агонист STING представляет собой 3'3'-cAIMPdFSH, альтернативно называемый 3-3 cAIMPdFSH.

Также можно использовать дополнительные агонисты STING, известные из уровня техники.

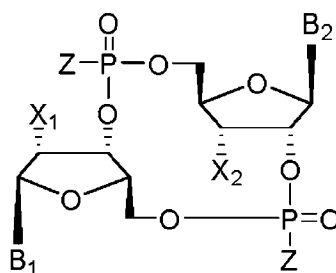
[0330] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, выбранное из группы, состоящей из:

[0331] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:

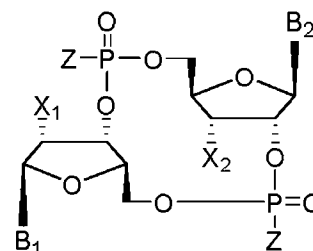
Формула 1



Формула 2



Формула 3



где:

X₁ представляет собой H, OH или F;

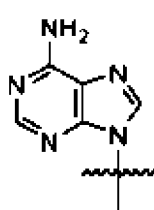
X₂ представляет собой H, OH или F;

Z представляет собой OH, OR₁, SH или SR₁, где:

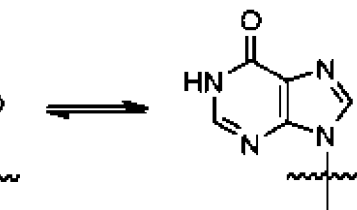
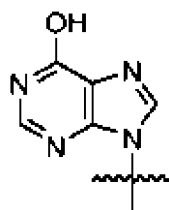
R₁ представляет собой Na или NH₄, или

R₁ представляет собой ферментно-лабильную группу, которая обеспечивает OH или SH in vivo, такую как пивалоилоксиметил;

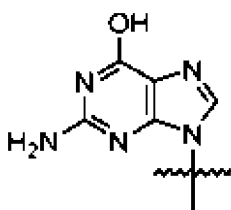
[0332] B₁ и B₂ являются основаниями, выбранными из:



аденин,



ГИПОКСАНТИН ИЛИ



гуанин

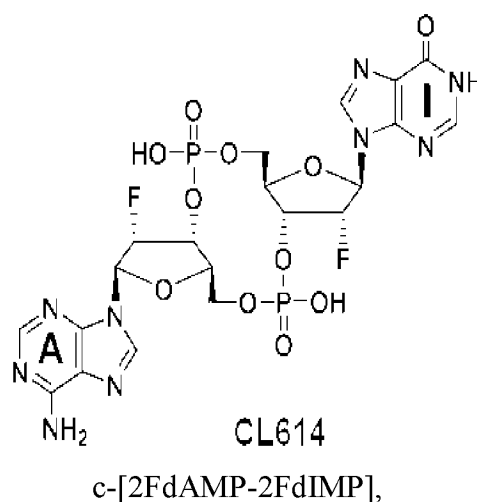
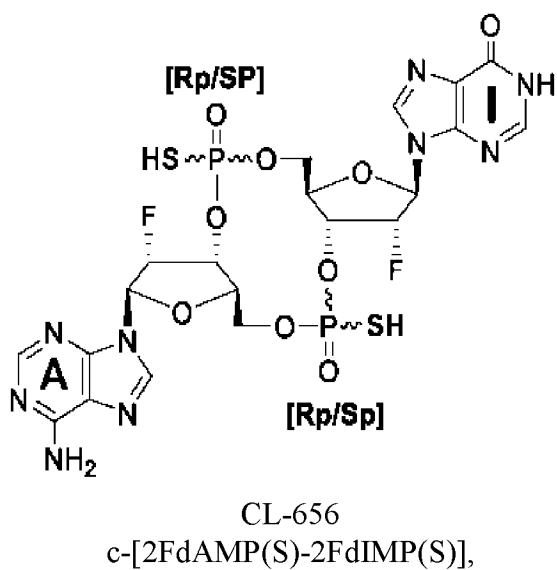
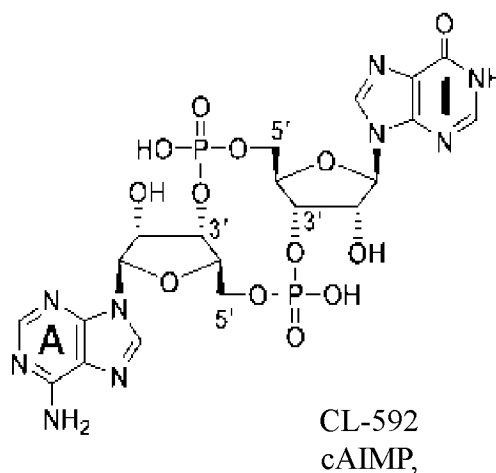
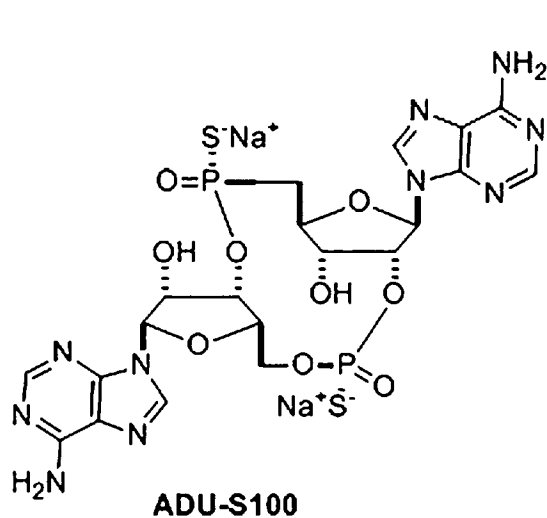
при условии, что:

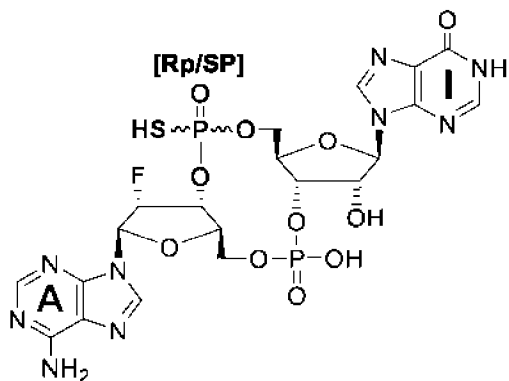
- в формуле 1: X₁ и X₂ не представляют собой OH,

- в формуле 2: если X_1 и X_2 представляют собой OH, то B_1 не представляет собой аденин и B_2 не представляет собой гуанин, и

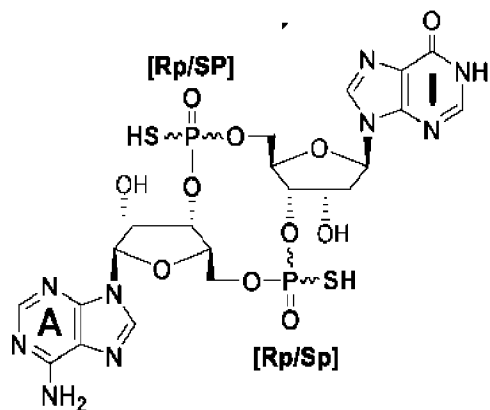
- в формуле 3: если X_1 и X_2 представляют собой OH, то B_1 не представляет собой аденин, B_2 не представляет собой гуанин и Z не представляет собой OH. См. WO 2016/096174, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0333] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает:

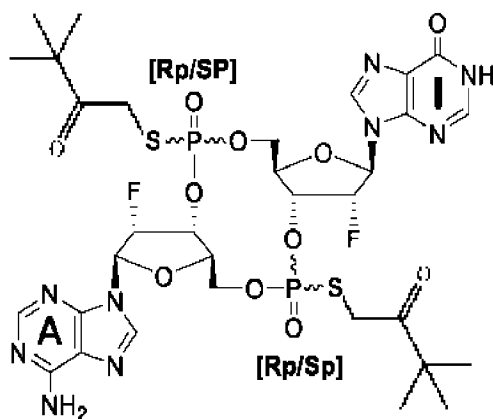




CL-797
c-[2FdAMP(S)-IMP],



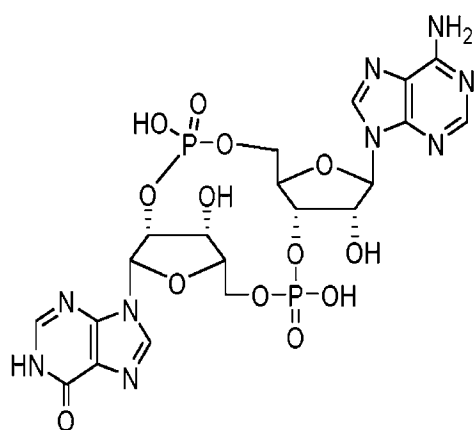
CL-655
c-[AMP(S)-IMP(S)],



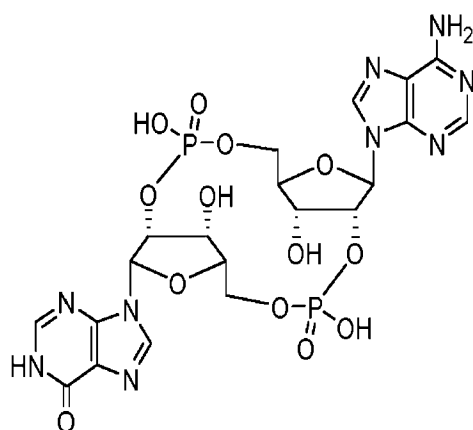
CL-659
c-[2FdAMP(S)-2FdIMP(S)](POM)₂ и

их фармацевтически приемлемую соль. См. WO 2016/096174A1.

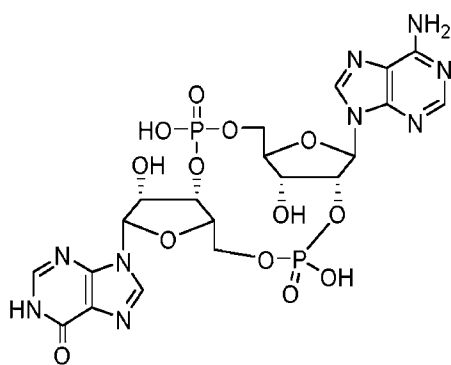
[0334] В других аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



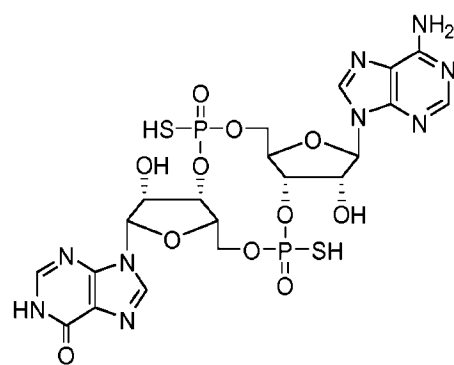
CL606
(3',2')c-AIMP



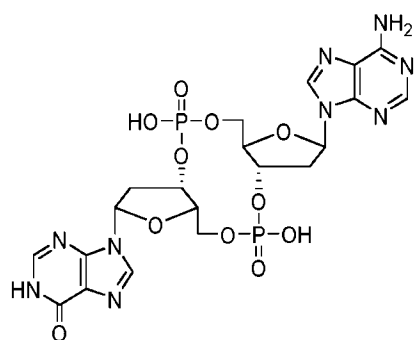
CL611
(2',2')c-AIMP



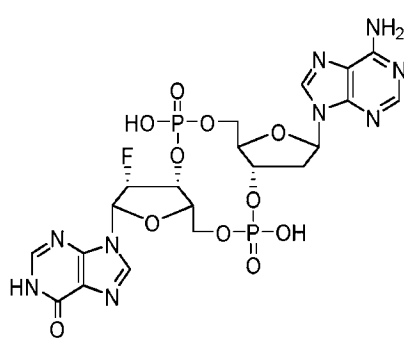
CL602
(2',3')c-AIMP



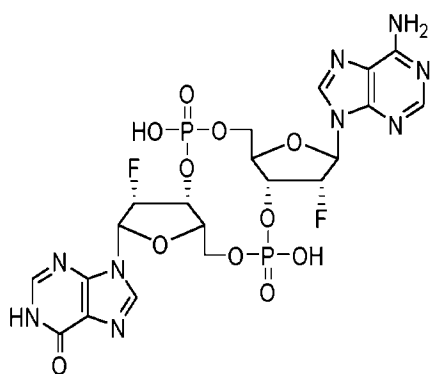
CL655
c-AIMP(S)



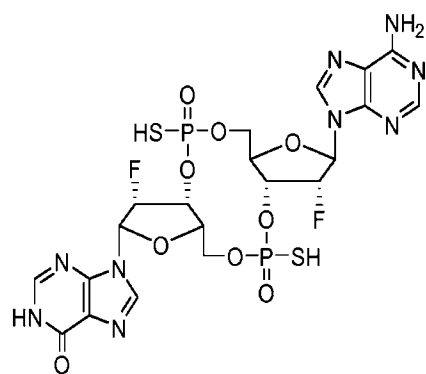
CL604
c-(dAMP-dIMP)



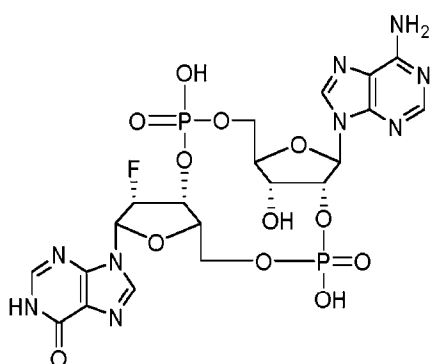
CL609
c-(dAMP-2'FdIMP)



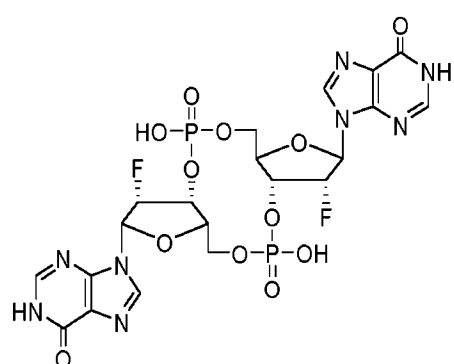
CL614
c-(2'FdAMP-2'FdIMP)



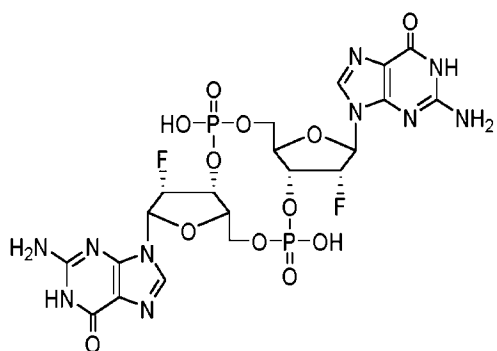
CL656
c-[2'FdAMP(S)-2'FdIMP(S)]



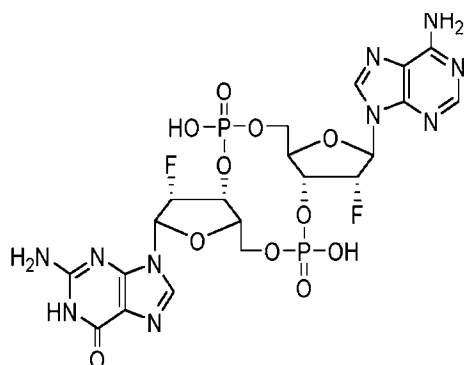
CL647
(2',3')c-(AMP-2'FdIMP)



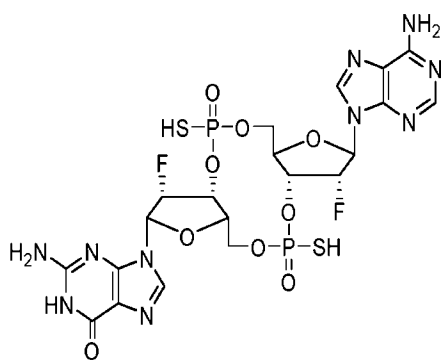
CL626
c-di(2'FdIMP)



CL629
c-di(2'FdGMP)

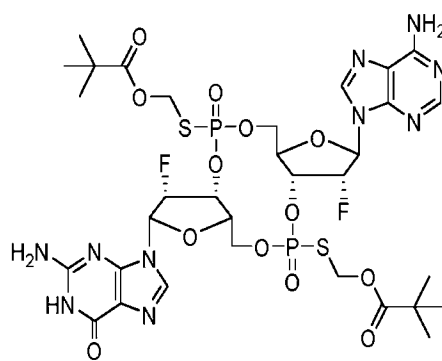


CL603
c-(2'FdGMP-2'FdAMP)



CL632

c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)]



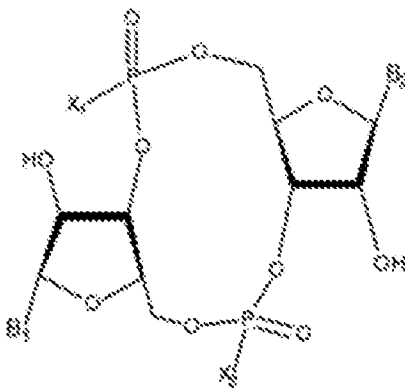
CL633

c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)](POM)₂

или

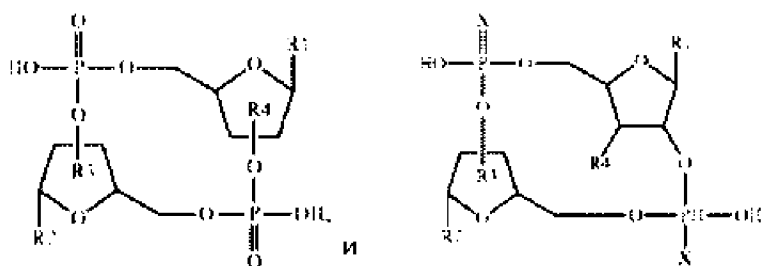
их любую фармацевтически приемлемую соли.

[0335] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



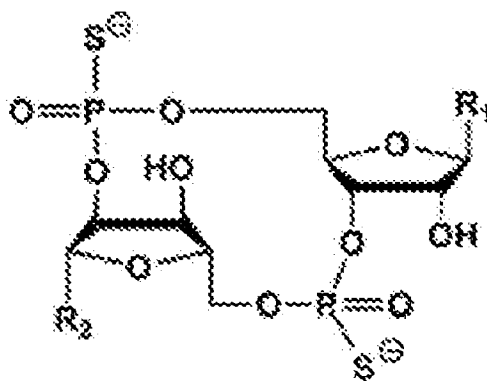
при этом каждый символ определен в WO 2014/093936, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0336] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



при этом каждый заместитель определен в WO 2014/189805, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

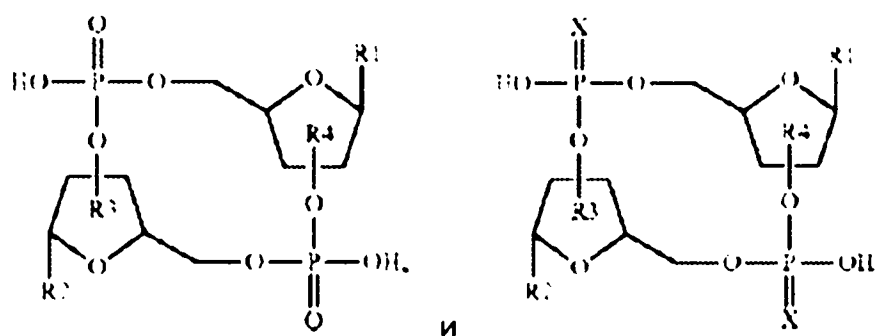
[0337] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



при этом каждый заместитель определен в WO 2015/077354, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. См. также Cell reports 11, 1018-1030 (2015).

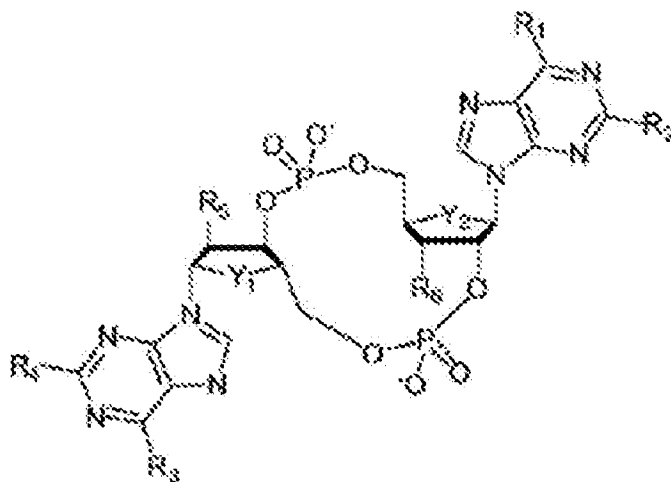
[0338] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, содержит c-di-AMP, c-di-GMP, c-di-IMP, c-AMP-GMP, c-AMP-IMP и c-GMP-IMP, описанные в WO 2013/185052 и Sci. Transl. Med. 283,283ra52 (2015), которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0339] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее формулу, выбранную из



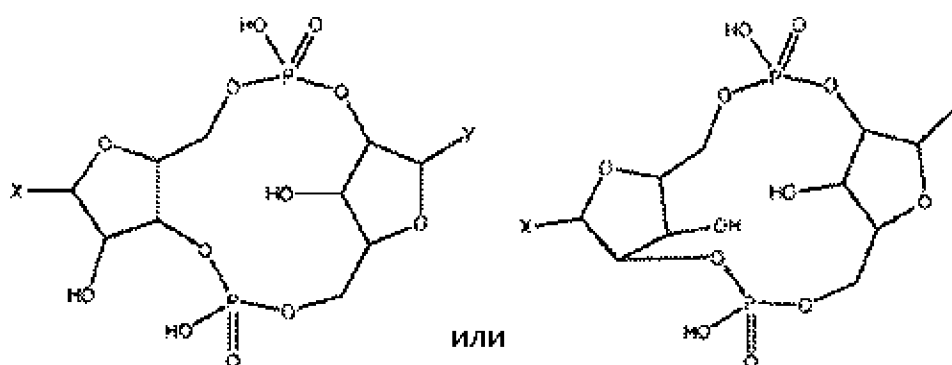
при этом каждый заместитель (т.е. R₁, R₂, R₃, R₄ и X) определен в WO 2014/189806, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0340] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



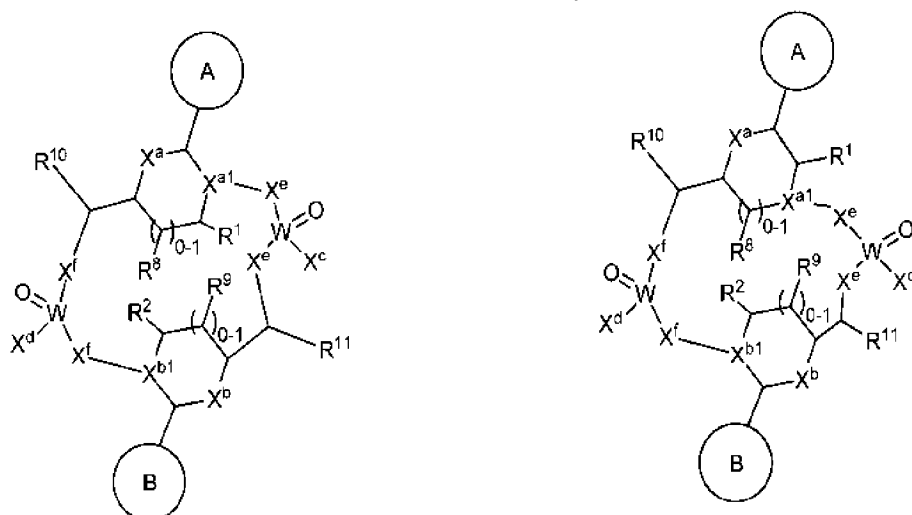
при этом каждый заместитель (т.е. R1, R2, R3, R4, R5, R6, Y1 и Y2) определен в WO 2015/185565, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

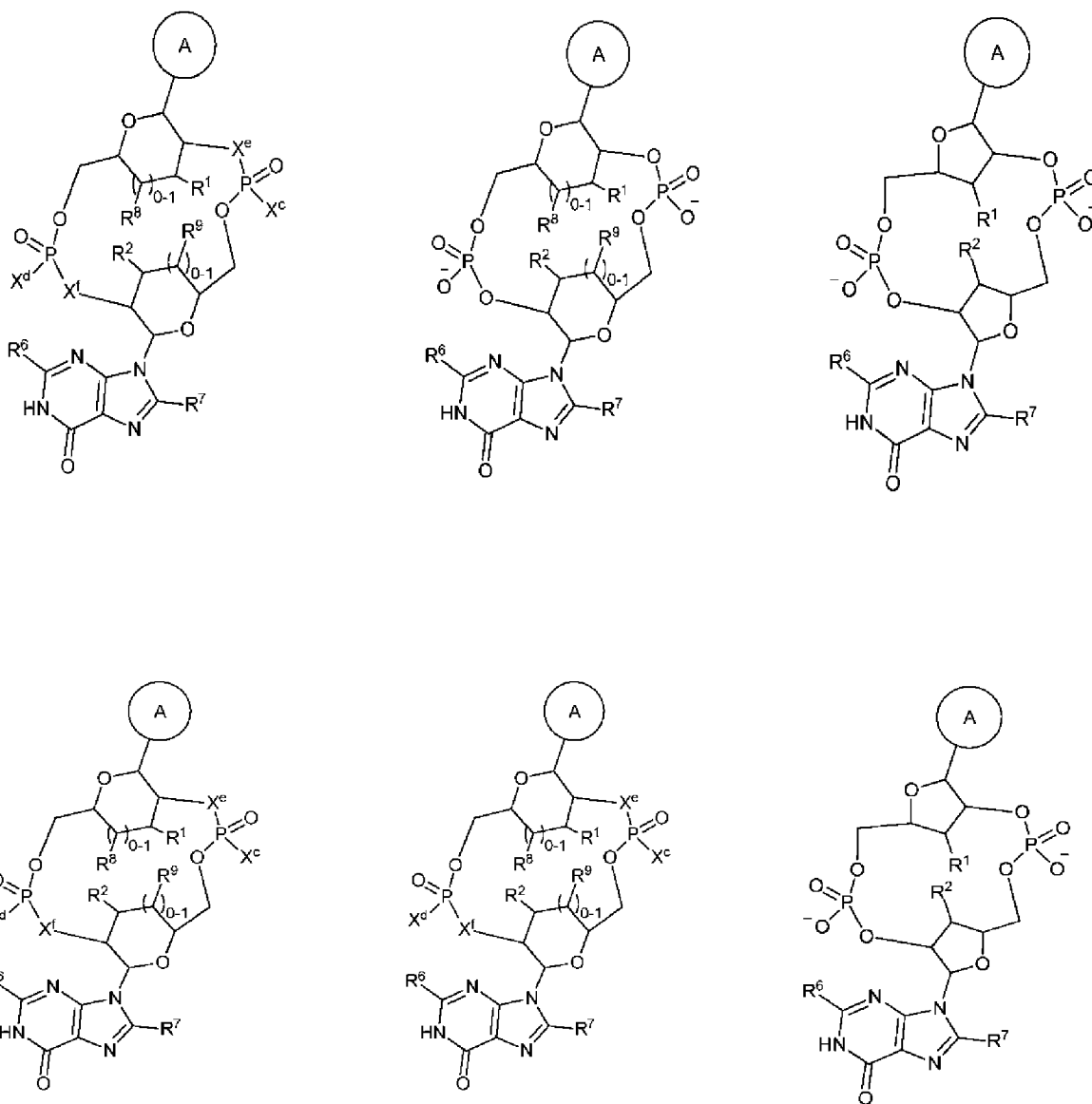
[0341] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, выбранное из следующих формул:



при этом каждый заместитель (т.е. X и Y) определен в WO 2014/179760, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

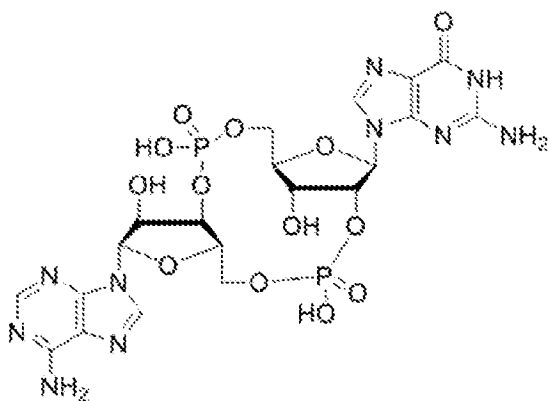
[0342] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее одну из следующих формул:





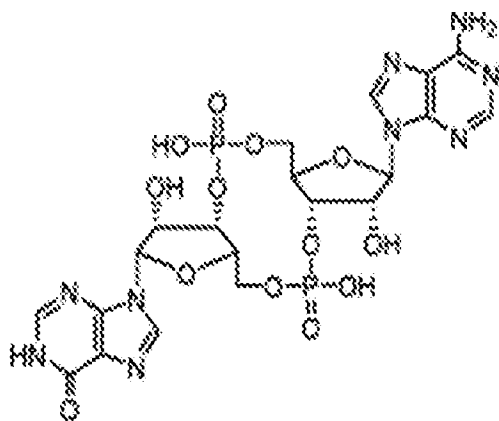
при этом каждый заместитель (т.е. R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , X^a , X^{a1} , X^b , X^{b1} , X^c , X^d , X^e и X^f) определен в WO 2014/179335, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0343] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



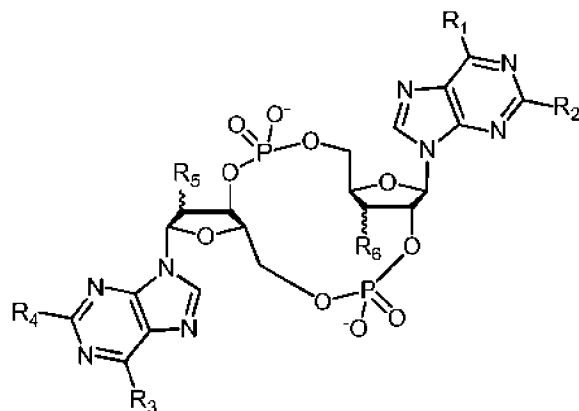
описанную в WO 2015/017652, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0344] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



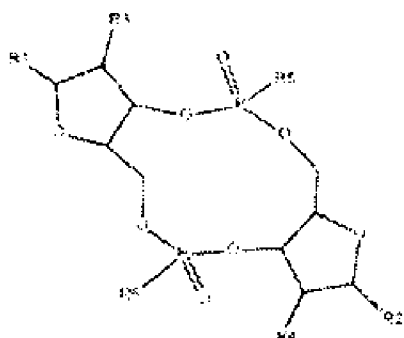
описанную в WO 2016/096577, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0345] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



при этом каждый заместитель (т.е. R1, R2, R3, R4, R5 и R6) определен в WO 2011/003025, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

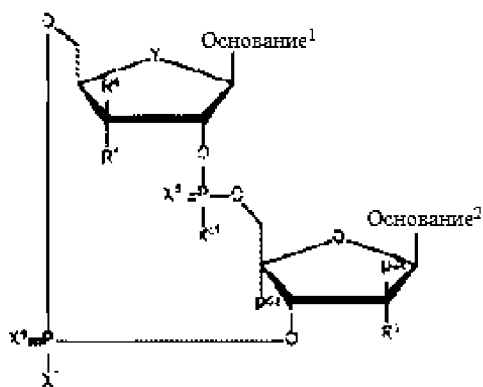
[0346] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



Формула 1

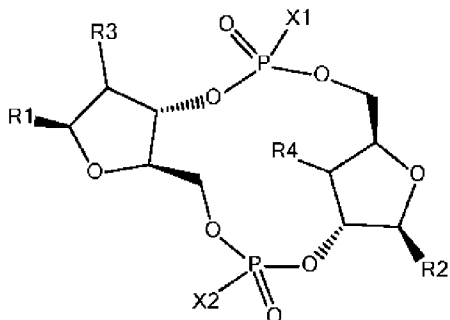
при этом каждый заместитель (т.е. R1, R2, R3, R4, R5 и R6) определен в WO 2016/145102, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0347] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



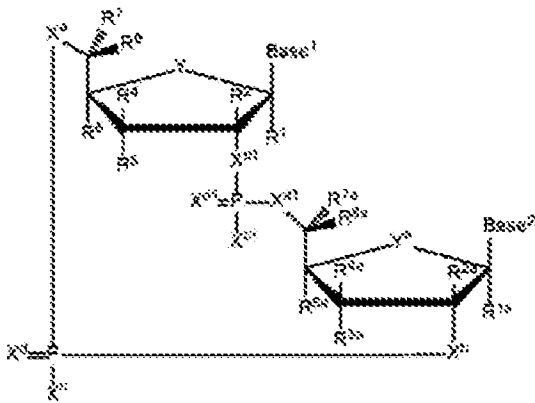
при этом каждый заместитель определен в WO 2017/027646, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0348] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



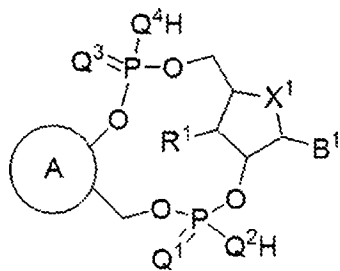
при этом каждый заместитель определен в WO 2017/075477, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0349] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



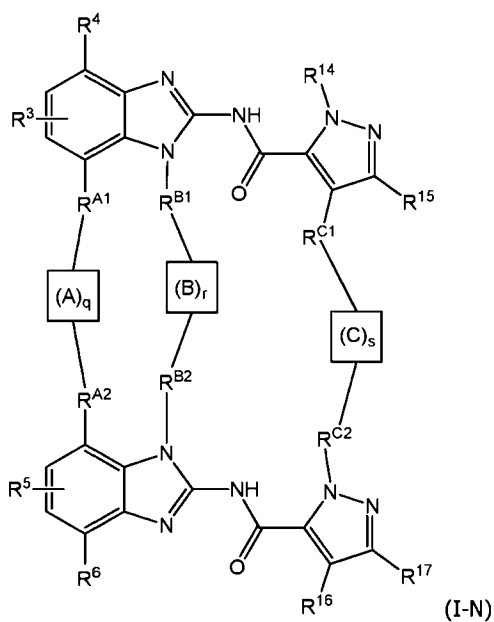
при этом каждый заместитель определен в WO 2017/027645, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0350] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:



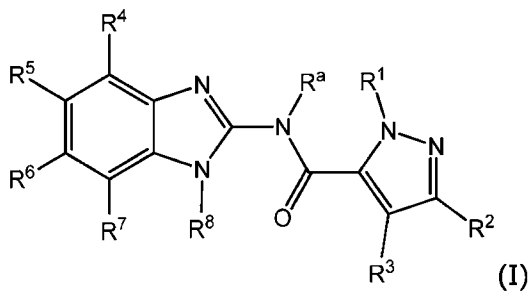
при этом каждый заместитель определен в WO 2018/100558, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0351] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее следующую формулу:

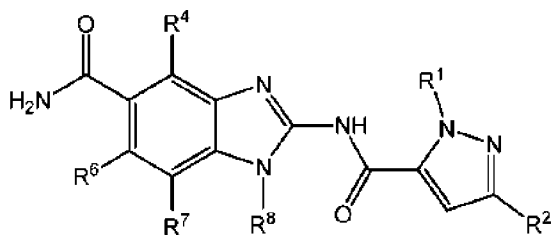


при этом каждый заместитель определен в WO 2017/175147, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0352] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, включает соединение, имеющее формулу:



, или

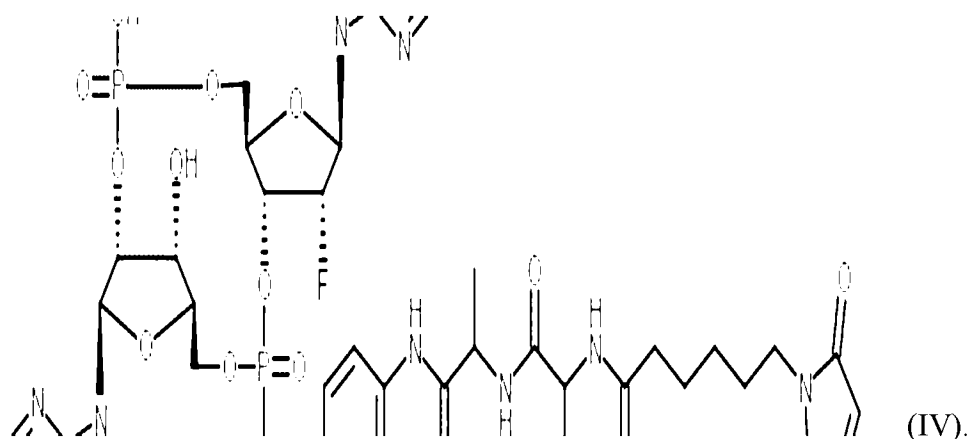


при этом каждый заместитель определен в WO 2017/175156, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

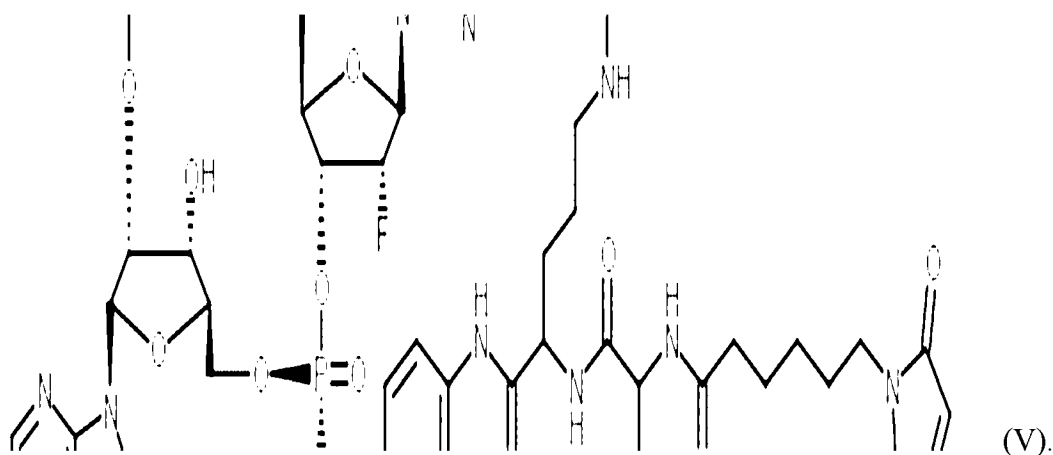
[0353] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит циклический динуклеотидный агонист STING и/или нециклический динуклеотидный агонист STING. В некоторых аспектах, когда несколько циклических динуклеотидных агонистов STING присутствуют на ВВ (*например*, экзосоме), раскрываемой в данном документе, такие

агонисты STING могут быть одинаковыми или разными. В некоторых аспектах, когда присутствуют несколько нециклических динуклеотидных агонистов STING, такие агонисты STING могут быть одинаковыми или разными. В некоторых аспектах композиция ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению может содержать две или более популяции ВВ, *например*, экзосомы, где каждая популяция ВВ, *например*, экзосом, содержит различный агонист STING или их комбинацию.

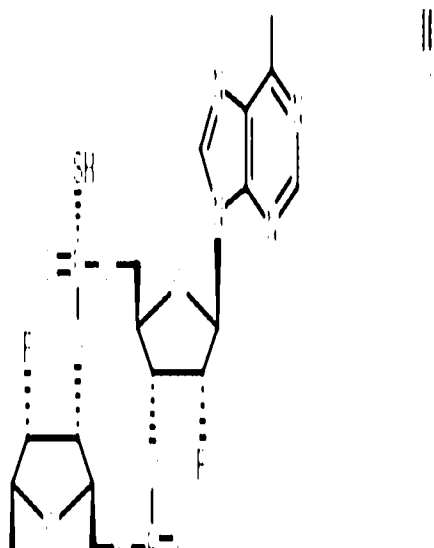
[0354] В некоторых конкретных аспектах ВВ, *например*, экзосома, по настоящему изобретению содержит (MM)-(линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (IV):



[0355] В некоторых конкретных аспектах ВВ, *например*, экзосома, по настоящему изобретению содержит (MM)-(линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (V):

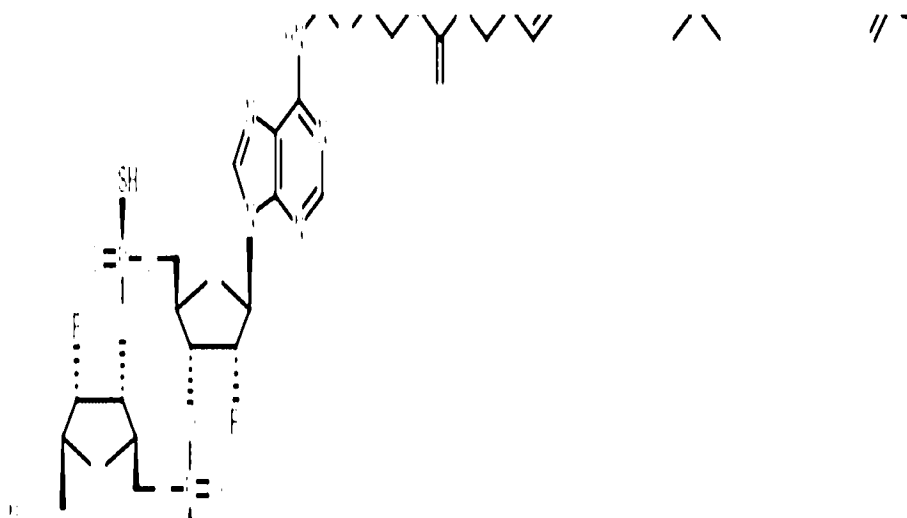


[0356] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит соединение, имеющее формулу (VI) (CP249):



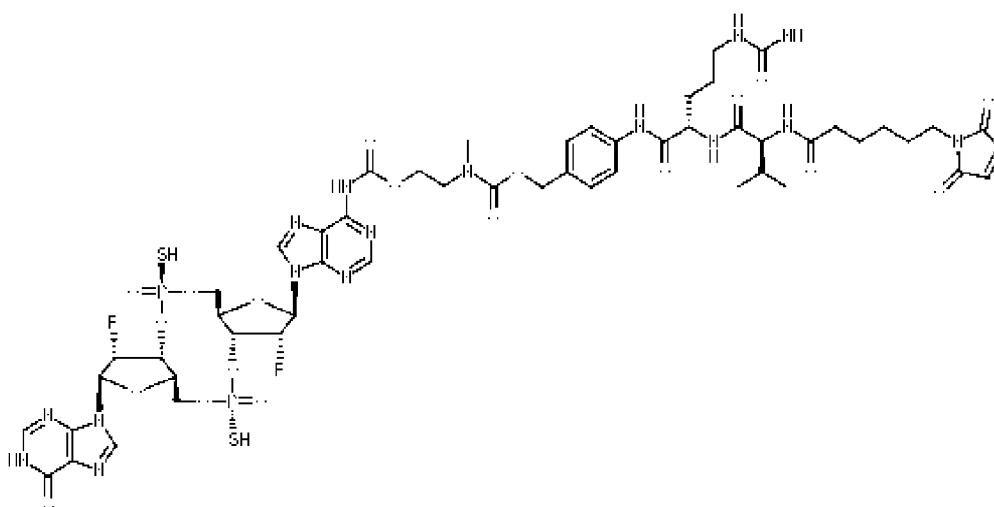
(VI).

[0357] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит соединение, имеющее формулу (VII) (CP250):



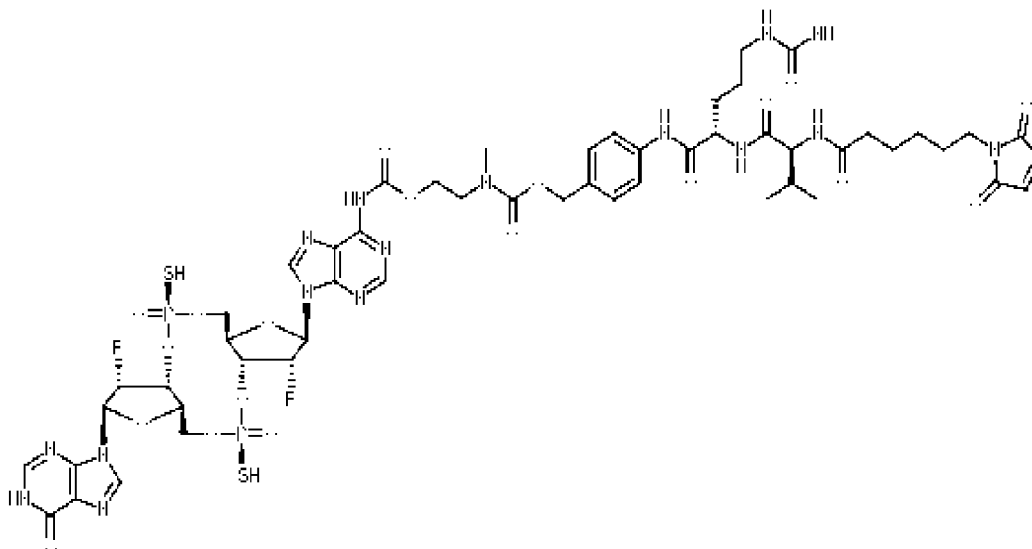
(VII).

[0358] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит соединение, имеющее формулу (VIII) (CP260):



(VIII)

[0359] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит соединение, имеющее формулу (IX) (CP261):



(IX).

[0360] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает, но не ограничиваясь ими, CP247, CP250, CP260, CP261 или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает CP247 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает CP250 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает CP260 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает CP261 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0361] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает, но не ограничиваясь ими, CP227, CP229 или их фармацевтически приемлемую соль. В других аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает CP227 или его фармацевтически приемлемую соль. В других аспектах агонист STING, применимый для конъюгатов ВВ по настоящему изобретению, включает, но не ограничиваясь им, CP229 или его фармацевтически приемлемую соль.

II.D.4 Агонисты TLR

[0362] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит агонист TLR. Неограничивающие примеры агонистов TLR включают: агонист TLR2 (*например*,

липотейхоевую кислоту, атипичный LPS, MALP-2 и MALP-404, OspA, порин, LcrV, липоманнан, GPI, лизофосфатидилсерин, липофосфогликан (LPG), гликофосфатидилинозитол (GPI), зимозан, hsp60, гликопротеин gH/gL, гемагглютинин), агонист TLR3 (*например*, двухцепочечную РНК, *например*, поли (I:C)), агонист TLR4 (*например*, липополисахариды (LPS), липотейхоевую кислоту, β -дефенсин 2, фибронектин EDA, HMGB1, снапин, тенасцин C), агонист TLR5 (*например*, флагеллин), агонист TLR6, агонист TLR7/8 (*например*, одноцепочечную РНК, CpG-A, Поли G10, Поли G3, резиквимод), агонист TLR9 (*например*, неметилованную ДНК CpG) и их комбинации. Неограничивающие примеры агонистов TLR можно найти в WO2008115319A2, US20130202707A1, US20120219615A1, US20100029585A1, WO2009030996A1, WO2009088401A2 и WO2011044246A1, каждый из которых включен посредством ссылки в полном объеме.

II.D.5 Антитела

[0363] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит ADC. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит малую молекулу, содержащую синтетический противоопухолевый агент (*например*, монометилауристатин Е (ММАЕ) (ведотин)), ингибитор высвобождения цитокинов (*например*, МСС950), ингибитор mTOR (*например*, рапамицин и его аналоги (рапалоги)), ингибитор аутотаксина (*например*, РАТ409), антагонист рецептора лизофосфатидной кислоты (*например*, АМ152, также известный как ВМС-986020) или любую их комбинацию.

II.D.6 Биологически активные молекулы, нацеленные на макрофаги

[0364] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, нацеленную на макрофаги. В других аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая индуцирует поляризацию макрофагов. Поляризация макрофагов представляет собой процесс, при котором макрофаги принимают различные функциональные программы в ответ на сигналы из своего 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.

[0365] По упрощенной классификации фенотип макрофагов был разделен на 2 группы: М1 (классически активированные макрофаги) и М2 (альтернативно активированные макрофаги). Эта широкая классификация была основана на исследованиях

in vitro, в которых культивируемые макрофаги обрабатывали молекулами, которые стимулировали переключение их фенотипа в определенное состояние. В дополнение к химической стимуляции было продемонстрировано, что жесткость нижележащего субстрата, на котором растет макрофаг, может определять состояние поляризации, функциональные роли и режим миграции. Макрофаги M1 были описаны как макрофаги провоспалительного типа, важные для прямой защиты хозяина от патогенов, таких как фагоцитоз и секреция провоспалительных цитокинов и микробицидных молекул. Было описано, что макрофаги M2 имеют совершенно противоположную функцию: регулирование фазы разрешения воспаления и восстановление поврежденных тканей. Позже более обширные исследования *in vitro* и *ex vivo* продемонстрировали, что фенотипы макрофагов гораздо более разнообразны, перекрывая друг друга с точки зрения экспрессии и функции генов, демонстрируя, что эти многочисленные гибридные состояния образуют континуум состояний активации, которые зависят от микроокружения. Более того, *in vivo* наблюдается большое разнообразие профилей экспрессии генов между различными популяциями тканевых макрофагов. Таким образом, считается, что спектр активации макрофагов шире и включает сложный регуляторный путь в ответ на множество различных сигналов из окружающей среды. Разнообразие фенотипов макрофагов еще предстоит полностью охарактеризовать *in vivo*.

[0366] Нарушение баланса типов макрофагов связано с рядом заболеваний, связанных с иммунитетом. Например, повышенное соотношение M1/M2 может коррелировать с развитием воспалительного заболевания кишечника, а также ожирением у мышей. С другой стороны, эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что макрофаги M2 являются основными медиаторами тканевого фиброза. Несколько исследований связали фиброзный профиль макрофагов M2 с патогенезом системного склероза. Неограничивающими примерами макрофагов, нацеленных на биологически активные молекулы, являются: PI3K γ (гамма-каталитическая субъединица фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат-3-киназы), RIP1 (киназа 1 рецепторного белка (RIP), RIPK1), HIF-1 α (индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа), AHR1 (регулятор адгезии и гиф 1), miR146a, miR155, IRF4 (фактор регуляции интерферона 4), PPAR γ (гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), IL-4RA (субъединица рецептора интерлейкина-4 альфа), TLR8 (Toll-подобный рецептор 8) и TGF- β 1 (пропротеин трансформирующего фактора роста бета-1).

[0367] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт PI3K γ (антагонист PI3K γ). В некоторых аспектах антагонист PI3K γ представляет собой антисмысловой олигонуклеотид.

В других аспектах антагонист PI3K γ представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую PI3K γ . Последовательность гена PI3K γ может быть найдена в хромосомном положении 7q22.3 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000007.14 (106865282..106908980), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка PI3K γ человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P48736, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0368] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт RIP1 (антагонист RIP1). В некоторых аспектах антагонист RIP1 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В других аспектах антагонист RIP1 представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую RIP1. Последовательность гена RIP1 может быть найдена в хромосомном положении 6p25.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000006.12 (3063967..3115187), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка RIP1 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q13546, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0369] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт HIF-1 α (антагонист HIF-1 α). В некоторых аспектах антагонист HIF-1 α представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В других аспектах антагонист HIF-1 α представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую HIF-1 α . Последовательность гена HIF-1 α может быть найдена в хромосомном положении 14q23.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000014.9 (61695513..61748259), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка HIF-1 α человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q16665, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах ASO нацелен на mRNA HIF-2 α . Последовательность гена HIF-2 α может быть найдена в хромосомном положении 2p21 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000002.12 (46297407..46386697), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка HIF-2 α человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q99814, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0370] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт AHR1 (антагонист AHR1). В других аспектах антагонист AHR1 представляет собой малую молекулу.

[0371] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт miR146a (антагомир miR146a). В некоторых аспектах антагомир miR146a представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO связывается с miR146a-5p (ugagaacugaaauiscauggguu) (SEQ ID NO: 226). В некоторых аспектах ASO связывается с miR146a-3p (ccucugaaauiscauucucag) (SEQ ID NO: 227).

[0372] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая имитирует miR155 (миметик miR155). В некоторых аспектах миметик miR155 представляет собой РНК или ДНК. В некоторых аспектах миметик miR155 содержит нуклеотидную последовательность miR155-5p (uuaaugcuauisgugauaggggu) (SEQ ID NO: 228). В некоторых аспектах миметик miR155 содержит нуклеотидную последовательность miR155-3p (сиссиасауауагсауааса) (SEQ ID NO: 229).

[0373] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, нацеленную на белок или транскрипт IRF-4 (антагонист IRF4). В некоторых аспектах антагонист IRF4 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую IRF-4. Последовательность гена *IRF-4* может быть найдена в хромосомном положении 6p25.3 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000006.12 (391739..411443), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка IRF-4 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q15306, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

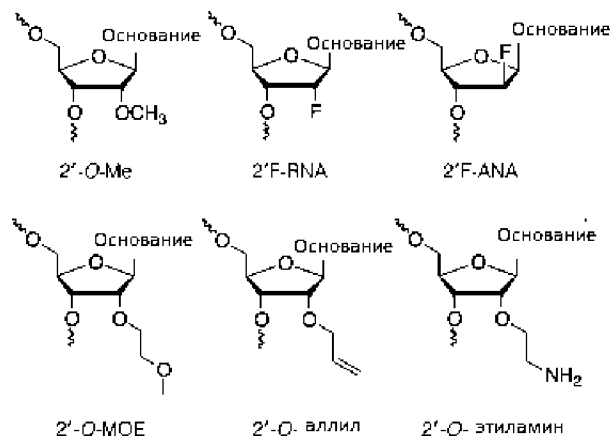
[0374] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, нацеленную на белок или транскрипт PPAR γ (антагонист PPAR γ). В некоторых аспектах антагонист PPAR γ представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В других аспектах антагонист PPAR γ представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую PPAR γ . Последовательность гена PPAR γ может быть найдена в хромосомном положении 3p25.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000003.12 (12287485..12434356), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка PPAR γ человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P37231, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0375] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, нацеленную на белок или транскрипт IL-4RA (антагонист IL-4RA). В некоторых аспектах антагонист IL-4RA представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую IL-4RA. Последовательность гена IL-4RA может быть найдена в хромосомном положении 16p12.1 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000016.10 (27313668..27364778), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка IL-4RA человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P24394, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0376] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая является агонистом Toll-подобного рецептора 8 (TLR8). TLR8 также обозначается как CD288. TLR8 представляет собой основной компонент врожденного и адаптивного иммунитета. TLR (Toll-подобные рецепторы) контролируют иммунный ответ хозяина против патогенов посредством распознавания молекулярных паттернов, специфичных для микроорганизмов. Он действует посредством MYD88 и TRAF6, что приводит к активации NF-каппа-B, секреции цитокинов и воспалительной реакции. Последовательность белка TLR8 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q9NR97, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0377] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активную молекулу, которая нацелена на белок или транскрипт TGF- β 1 (антагонист TGF- β 1). В некоторых аспектах антагонист TGF- β 1 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую TGF- β 1. Последовательность гена TGF- β 1 может быть найдена в хромосомном положении 19q13.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000019.10 (41330323..41353922, комплемент), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка TGF- β 1 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P01137, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. ASO может содержать один или более нуклеозидов, которые содержат фрагмент модифицированного сахара, *т.е.* модификация фрагмента сахара по сравнению с фрагментом сахара рибозы в ДНК и РНК. Были получены многочисленные нуклеозиды с модификацией сахарного фрагмента рибозы, прежде всего с целью улучшения определенных свойств олигонуклеотидов, таких как аффинность и/или устойчивость к нуклеазам. Такие модификации включают те, в которых модифицируется структура кольца рибозы, *например*, путем замены на гексозное кольцо (HNA) или

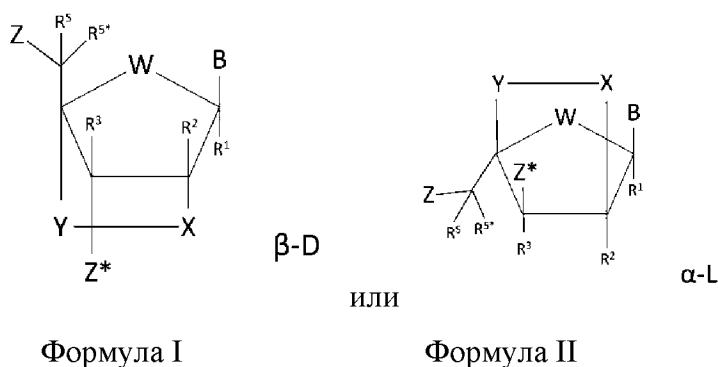
бициклическое кольцо, которое обычно имеет бирадикальный мостик между атомами углерода C2' и C4' на рибозном кольце (LNA), или несвязанное кольцо рибозы, в котором обычно отсутствует связь между атомы углерода C2' и C3' (*например*, UNA). Другие нуклеозиды, модифицированные сахаром, включают, например, нуклеиновые кислоты бициклогексозы (WO2011/017521) или трициклические нуклеиновые кислоты (WO2013/154798). Модифицированные нуклеозиды также включают нуклеозиды, в которых сахарный фрагмент заменен несхарным фрагментом, например, в случае пептидных нуклеиновых кислот (PNA) или морфолинуклеиновых кислот. Модификации сахара также включают модификации, сделанные путем изменения групп заместителей в кольце рибозы на группы, отличные от водорода, или группы 2'-ОН, естественным образом обнаруживаемой в нуклеозидах РНК. Заместители могут быть, например, введены в положения 2', 3', 4' или 5'. Нуклеозиды с модифицированными фрагментами сахара также включают 2'-модифицированные нуклеозиды, такие как 2'-замещенные нуклеозиды. Действительно, много внимания было уделено разработке 2'-замещенных нуклеозидов, и было обнаружено, что многочисленные 2'-замещенные нуклеозиды обладают полезными свойствами при включении в олигонуклеотиды, такими как повышенная устойчивость к нуклеозидам и повышенная аффинность. Нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром представляет собой нуклеозид, который имеет заместитель, отличный от H или -ОН, в положении 2' (2'-замещенный нуклеозид) или содержит 2'-связанный бирадикал, и включает 2'-замещенные нуклеозиды и LNA (2'-4'-бидикальные мостиковые) нуклеозиды. Например, 2'-модифицированный сахар может обеспечивать повышенную аффинность связывания (*например*, увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром) и/или повышенную устойчивость олигонуклеотида к нуклеазам. Примерами 2'-замещенных модифицированных нуклеозидов являются 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино-ДНК, 2'-фтор-РНК, 2'-флуоро-ДНК, арабинуклеиновые кислоты (ANA) и 2'-фтор-ANA-нуклеозид. Дополнительные примеры см., *например*, Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443; Uhlmann, *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213; и Deleavey and Damha, *Chemistry and Biology* 2012, 19, 937. Ниже приведены изображения некоторых 2'-модифицированных замещенных нуклеозидов.



[0378] Нуклеозиды LNA представляют собой модифицированные нуклеозиды, которые содержат линкерную группу (называемую бирадикалом или мостиком) между C2' и C4' сахарного кольца рибозы нуклеозида (например, 2'-4'-мостик), которая ограничивает или блокирует конформацию рибозного кольца. Эти нуклеозиды в литературе также называют мостиковой нуклеиновой кислотой или бициклической нуклеиновой кислотой (BNA). Блокирование конформации рибозы ассоциировано с повышенной аффинностью гибридизации (стабилизацией дуплекса), когда LNA включается в олигонуклеотид для комплементарной молекулы РНК или ДНК. Это можно определить обычным образом путем измерения температуры плавления дуплекса олигонуклеотид/комплемент.

[0379] Неограничивающие примеры нуклеозидов LNA раскрыты в WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352, WO 2004/046160, WO 00/047599, WO 2007/134181, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2007/090071, WO 2009/006478, WO 2011/156202, WO 2008/154401, WO 2009/067647, WO 2008/150729, Morita *et al.*, *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12, 73-76, Seth *et al.*, *J. Org. Chem.* 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, и Mitsuoka *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2009, 37(4), 1225-1238.

[0380] В некоторых аспектах модифицированный нуклеозид или нуклеозиды LNA согласно ASO по настоящему изобретению имеют общую структуру формулы I или II:



где

W выбран из -O-, -S-, -N(R^a)-, -C(R^aR^b)-, в частности, -O-;

B представляет собой нуклеиновое основание или модифицированный фрагмент нуклеинового основания;

Z представляет собой межнуклеозидную связь с прилегающим нуклеозидом или 5'-концевой группой;

Z* представляет собой межнуклеозидную связь с прилегающим нуклеозидом или 3'-концевой группой;

R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} независимо выбраны из водорода, галогена, алкила, алкенила, алкинила, гидроксигруппы, алкокси, алкоксиалкила, алкенилокси, карбоксила, алкоксикарбонила, алкилкарбонила, формила, азида, гетероцикла и арила; и X, Y, R^a и R^b определены в данном документе.

II.D.7 Олигонуклеотиды

[0381] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит антисмысловый олигонуклеотид, фосфородиамидатный морфолиноолигомер (PMO) или конъюгированный с пептидом фосфородиамидатный морфолиноолигомер (PPMO), антисмысловый олигонуклеотид (ASO), siRNA, miRNA, shRNA или любую их комбинацию.

[0382] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист PI3Kγ. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую PI3Kγ. Последовательность гена PI3Kγ может быть найдена в хромосомном положении 7q22.3 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000007.14 (106865282..106908980), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка PI3Kγ человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P48736, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0383] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист RIP1. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую RIP1. Последовательность гена RIP1 может быть найдена в хромосомном положении 6p25.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000006.12 (3063967..3115187), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка RIP1 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q13546, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0384] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист HIF-1α. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую HIF-1α. Последовательность гена HIF-1α может быть найдена в хромосомном положении 14q23.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000014.9 (61695513..61748259),

который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка HIF-1 α человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q16665, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах ASO нацелен на mRNA HIF-2 α . Последовательность гена HIF-2 α может быть найдена в хромосомном положении 2p21 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000002.12 (46297407..46386697), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка HIF-2 α человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q99814, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0385] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист IRF4. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую IRF-4. Последовательность гена *IRF-4* может быть найдена в хромосомном положении 6p25.3 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000006.12 (391739..411443), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка IRF-4 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt Q15306, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0386] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист PPAR γ . В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую PPAR γ . Последовательность гена PPAR γ может быть найдена в хромосомном положении 3p25.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000003.12 (12287485..12434356), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка PPAR γ человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P37231, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0387] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист IL-4RA. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую IL-4RA. Последовательность гена IL-4RA может быть найдена в хромосомном положении 16p12.1 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000016.10 (27313668..27364778), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность белка IL-4RA человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P24394, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0388] В некоторых аспектах ASO представляет собой антагонист TGF- β 1. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, mRNA, кодирующую TGF- β 1. Последовательность гена TGF- β 1 может быть найдена в хромосомном положении 19q13.2 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000019.10 (41330323..41353922, комплемент), который включен посредством ссылки в полном объеме. Последовательность

белка TGF- β 1 человека можно найти под общедоступным номером доступа UniProt P01137, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0389] В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, который представляет собой транскрипт *STAT6*, транскрипт *CEBP β* , транскрипт *STAT3*, транскрипт *KRAS*, транскрипт *NRAS*, транскрипт *NLPR3* или любую их комбинацию.

[0390] STAT6 (*STAT6*) также известен как передатчик сигнала и активатор транскрипции 6. Синонимы STAT6/*STAT6* известны и включают IL-4 STAT; STAT, индуцированный интерлейкином-4; фактор транскрипции IL-4 STAT; STAT6B; STAT6C; и D12S1644. Последовательность гена *STAT6* человека можно найти под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000012.12: c57111413-57095404. Ген *STAT6* человека находится в хромосоме 12q13.3 в положении 57111413-57095404, комплемент.

[0391] CEBP β (*CEBP β*) также известен как CCAAT/энхансер-связывающий белок бета. Синонимы CEBP β /*CEBP β* известны и включают C/EBP бета; белок-активатор печени; LAP; обогащенный в печени ингибиторный белок; LIP; ядерный фактор NF-IL6; фактор транскрипции 5; TCF-5; *CEBPB*; *CEBPb*; *CEBP β* ; *CEBP/B*; и *TCF5*. Последовательность гена *CEBP β* человека можно найти под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000020.11 (50190583..50192690). Ген *CEBP β* человека находится в хромосоме 20q13.13 в положении 50190583-50192690.

[0392] *NRas* представляет собой онкоген, кодирующий мембранный белок, который перемещается между аппаратом Гольджи и цитоплазматической мембраной. Геномная ДНК, кодирующая *NRas*, может быть обнаружена в хромосомном положении 1p13.2 (*m.e.* нуклеотиды с 5001 по 17438 под № доступа в GenBank NG_007572). Мутации N-ras описаны при меланоме, карциноме щитовидной железы, тератокарциноме, фибросаркоме, нейробластоме, рабдомиосаркоме, лимфоме Беркитта, остром промиелоцитарном лейкозе, Т-клеточном лейкозе и хроническом миелогенном лейкозе. Онкогенный N-Ras может индуцировать у мышей острый миелоидный лейкоз (AML) или хронический миеломоноцитарный лейкоз-подобное заболевание (CMML). Вирусный онкоген (NRas) нейробластомы RAS известен из уровня техники под различными названиями. Такие названия включают: GTPase NRas, белок N-ras часть 4, гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS (v-ras), омолог вирусного онкогена нейробластомы RAS, трансформирующий белок N-Ras и гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS v-ras.

[0393] Передатчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3) представляет собой передатчик сигнала и активатор транскрипции, который передает сигналы от рецепторов клеточной поверхности к ядру. STAT3 часто гиперактивируется при многих видах рака человека. Геномная ДНК, кодирующая *STAT3*, может быть обнаружена в хромосомном

положении 17q21.2 (*т.е.* нуклеотиды с 5001 по 80171 под № доступа в GenBank NG_007370.1).

[0394] NLRP3 (*NLRP3*) также известен как пириновый домен семейства NLR, содержащий 3. Синонимы NLRP3/NLRP3 известны и включают *NLRP3*; *C1orf7*; *CIAS1*; *NALP3*; *PYPAF1*; нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, богатый лейцином повтор и пириновый домен, содержащий 3; холодовой белок аутовоспалительного синдрома 1; криопин; белок 3, содержащий домены NACHT, LRR и PYD; рецептор ангиотензина/вазопрессина AII/AVP-подобный; белок гусеницы 1.1; CLR1.1; холодовой белок аутовоспалительного синдрома 1; и PYRIN-содержащий APAF1-подобный белок 1. Последовательность гена NLRP3 человека можно найти под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000001.11:247416156-247449108. Ген *NLRP3* человека находится в хромосомном положении 1q44 в положении 247416156-247449108.

[0395] KRAS известен из уровня техники под различными названиями. Такие названия включают: протоонкоген KRAS, GTPase; Гомолог вирусного онкогена саркомы 2 крыс Кирстен V-Ki-Ras2; GTPase KRas; C-Ki-Ras; K-Ras 2; KRAS2; RASK2; гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен V-Ki-Ras2; вирусный протоонкоген саркомы крыс Кирстен; клеточный трансформирующий протоонкоген; клеточный протоонкоген C-Ki-Ras2; трансформирующий белок P21; онкоген PR310 C-K-Ras; белок C-Kirsten-Ras; белок K-Ras P21; и онкоген KRAS2. Последовательность гена *KRAS* человека можно найти в хромосомном положении 12p12.1 и под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000012 (25204789 – 25250936). Геномная последовательность транскрипта *KRAS* дикого типа человека соответствует обратному комплементу остатков 25204789 – 25250936 NC_000012.

II.D.8 Транспортные пептиды

[0396] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит пептид клеточного транспорта, проникающий пептид или слитый пептид. В контексте данного документа термин «транспортный пептид» относится к любой пептидной последовательности, которая облегчает перемещение любого прикрепленного груза внутри клетки или клеток, включая облегчение движения груза через клеточную мембрану клетки, секрецию груза из клетки или ВВ и высвобождение груза из клетки или ВВ, а также другие способы клеточного перемещения. В конкретных, но не ограничивающих примерах, транспортный пептид может представлять собой последовательность, полученную из проникающего пептида, неклассической секреторной последовательности, эндосомального домена высвобождения, рецептор-связывающего домена и слитого пептида.

[0397] В контексте данного документа термин «проникающий в клетку пептид» относится к любой пептидной последовательности, которая облегчает перемещение любого прикрепленного груза через липидный бислой, такой как мембрана клетки или мембрана ВВ. В контексте данного документа термин «неклассическая секреторная последовательность» относится к любой последовательности белка или пептида, которая обеспечивает секрецию любого прикрепленного груза из клетки посредством пути, независимого от ЭР-аппарата Гольджи. В контексте данного документа термин «эндосомальный домен высвобождения» предназначен для обозначения любой пептидной последовательности, которая способствует высвобождению любого прикрепленного груза из эндосомы клетки или ВВ. В контексте данного документа термин «рецептор-связывающий домен» предназначен для обозначения любой РНК или белкового домена, способного взаимодействовать с поверхностно-связанным клеточным рецептором. В контексте данного документа термин «слитный пептид» предназначен для обозначения любой пептидной последовательности, которая облегчает выход груза из ВВ или клетки.

[0398] В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, по настоящему изобретению содержит транспортный пептид и вторую полезную нагрузку, например, другую биологически активную молекулу, такую как полинуклеотид (например, антисмысловой олигонуклеотид или интерференционная РНК).

II.D.9 Аденоассоциированный вирус (AAV)

[0399] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит аденоассоциированный вирус (AAV). В некоторых аспектах AAV связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с просветной поверхностью ВВ. В некоторых аспектах AAV связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с внешней поверхностью ВВ. В некоторых аспектах AAV связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с каркасом, например, с белковым каркасом, таким как белок каркаса X или его фрагмент, или с липидным каркасом (например, холестерином). В некоторых аспектах AAV химически связан с каркасным фрагментом посредством реакции между малеимидной группой, присутствующей на капсидном белке AAV, и сульфгидрильной группой, присутствующей на каркасе (например, либо присутствующей в природе, либо введенной посредством линкера или бифункционального реагента). В некоторых аспектах AAV химически связан с фрагментом каркаса посредством реакции между сульфгидрильной группой, присутствующей на капсидном белке AAV (например, либо присутствующей в природе, либо введенной посредством линкера или

бифункционального реагента), и малеимидной группой, присутствующей на каркасном фрагменте.

[0400] В некоторых аспектах AAV содержит генетическую кассету. В некоторых аспектах генетическая кассета кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из секретируемого белка, рецептора, структурного белка, сигнального белка, сенсорного белка, регуляторного белка, транспортного белка, запасного белка, защитного белка, двигательного белка, фактора свертывания крови, фактора роста, антиоксиданта, цитокина, хемокина, фермента, гена-супрессора опухоли, белка репарации ДНК, структурного белка, рецептора липопротеинов низкой плотности, альфа-глюкозидазы, регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе или любую их комбинацию. В некоторых аспектах генетическая кассета кодирует белок фактора VIII или белок фактора IX. В некоторых аспектах белок фактора VIII представляет собой фактор VIII дикого типа, фактор VIII с делетированным В-доменом, слитый белок фактора VIII или любую их комбинацию.

[0401] В некоторых аспектах AAV выбран из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3A, AAV типа 3B, AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, змеиного AAV, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, овечьего AAV, козьего AAV, креветочного AAV, синтетического AAV и любой их комбинации.

II.D.10 Иммуномодуляторы

[0402] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит иммуномодулятор. В определенных аспектах иммуномодулятор связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме или просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах иммуномодулятор связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с каркасным фрагментом, например, белком каркаса Y или его фрагментом, на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосоме. В дополнительных аспектах иммуномодулятор находится в просвете ВВ, *например*, в экзосоме.

[0403] В некоторых аспектах иммуномодулятор включает ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки или ингибитор партнера по связыванию отрицательного регулятора контрольной точки. В определенных аспектах ингибитор отрицательного регулятора контрольной точки включает цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), белок 1 программируемой гибели клеток (PD-1), ген

3, активируемый лимфоцитами (LAG-3), Т-клеточный белок, содержащий иммуноглобулин- и муцин-домены 3 (TIM-3), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменный иммуноглобулиновый супрессор активации Т-клеток (VISTA), рецептор аденозина A2a (A2aR), иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), CD20, CD39, CD73 или любую их комбинацию.

[0404] В некоторых аспектах иммуномодулятор включает активатор для положительной костимулирующей молекулы или активатор для партнера по связыванию положительной костимулирующей молекулы. В определенных аспектах положительная костимулирующая молекула представляет собой представителя суперсемейства рецепторов TNF (*например*, CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, рецептор Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, рецептор TWEAK, TACI, рецептор BAFF, ATAR, CD271, CD269, AITR, TROY, CD358, TRAMP и XEDAR). В некоторых аспектах активатором позитивной костимулирующей молекулы является представитель суперсемейства TNF (*например*, TNF α , TNF-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, лиганд 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, лиганд GITR и EDA-2). В дополнительных аспектах положительная костимулирующая молекула представляет собой костимуляторную молекулу суперсемейства (*например*, ICOS или CD28). В некоторых аспектах активатор положительной костимулирующей молекулы представляет собой ICOSL, CD80 или CD86.

[0405] В некоторых аспектах иммуномодулятор включает цитокин или партнер по связыванию цитокина. В определенных аспектах цитокин включает IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 или их комбинации.

[0406] В некоторых аспектах иммуномодулятор включает белок, который поддерживает внутриклеточные взаимодействия, необходимые для ответов зародышевого центра. В определенных аспектах белок, который поддерживает внутриклеточные взаимодействия, необходимые для ответов зародышевого центра, включает представителя семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAM) или SLAM-ассоциированный белок (SAP). В некоторых аспектах представитель семейства SLAM включает представителя 1 семейства SLAM, CD48, CD229 (Ly9), Ly108, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME, CD2F-10 или их комбинации.

II.D.10 Ингибиторы лизофосфатидной кислоты (LPA)

[0407] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит ингибитор лизофосфатидной кислоты (LPA), например, ингибитор LPA-1. В определенных аспектах ингибитор LPA-1 связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосоме или просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах ингибитор LPA-1 связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с каркасным фрагментом, например, белком каркаса Y или его фрагментом, на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосоме. В дополнительных аспектах ингибитор LPA-1 находится в просвете ВВ, *например*, в экзосоме.

[0408] LPA представляет собой мощный эндогенный липидный медиатор, который защищает и спасает клетки от запрограммированной клеточной смерти. LPA, благодаря своему высокоаффинному рецептору LPA-1, является важным медиатором фиброгенеза. Таким образом, ингибиторы LPA могут действовать как антифибротические агенты.

[0409] В некоторых аспектах ингибитор LPA-1 включает AM095, который является сильнодействующим и перорально биодоступным антагонистом LPA-1 со значениями IC_{50} 0,73 и 0,98 мкМ для мышинового или рекомбинантного человеческого LPA-1 соответственно. *In vitro* было продемонстрировано, что AM095 ингибирует LPA-1-индуцированный хемотаксис как клеток LPA-1/CHO мыши, так и клеток меланомы A2058 человека со значениями IC_{50} 0,78 мкМ и 0,23 мкМ. *In vivo* AM095 может дозозависимо блокировать LPA-индуцированное высвобождение гистамина со значением ED_{50} 8,3 мг/кг у мышей. В качестве дополнения было обнаружено, что AM095 значительно снижает содержание коллагена и белка BALF со значением ED_{50} 10 мг/кг в легких. AM095 также снижает инфильтрацию макрофагов и лимфоцитов, вызванную блеомицином, у мышей. См. Swaney et al. (2018) Mol. Can. Res. 16:1601-1613, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0410] В некоторых аспектах ингибитор LPA-1 включает AM152 (также известный как BMS-986020). AM152 представляет собой высокоаффинный антагонист LPA-1, который ингибирует переносчики желчных кислот и фосфолипидов с IC_{50} 4,8 мкМ, 6,2 мкМ и 7,5 мкМ для BSEP, MRP4 и MDR3 соответственно. AM152 можно применять для лечения идиопатического фиброза легких (IPF). См. Kihara et al. (2015) Exp. Cell Res. 333:171-7; Rosen et al. (2017) European Respiratory Journal 50:PA1038; и Palmer et al. (2018) Chest 154:1061-1069, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Фаза 2 исследования AM152 (описанного в Palmer 2018) была прекращена

досрочно из-за токсичности в отношении желчного пузыря и ранних признаков токсичности в отношении печени переносчика (2 специфических переносчиков).

[0411] Дополнительные раскрытия, относящиеся к ВВ (*например*, экзосомам), содержащим ингибитор LPA-1, представлены в других разделах настоящего изобретения (*см.*, *например*, Пример 5).

II.D.11 Ингибиторы NLRP3

[0412] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит ингибитор инфламмасом, *например*, ингибитор NLRP3. В определенных аспектах ингибитор NLRP3 связан, *например*, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, *например*, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосоме или просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах ингибитор NLRP3 связан, *например*, химически связан посредством малеимидного фрагмента, с каркасным фрагментом, *например*, белком каркаса Y или его фрагментом, на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосоме. В дополнительных аспектах ингибитор NLRP3 находится в просвете ВВ, *например*, в экзосоме.

[0413] NLRP3, также известный как NALP3, NACHT или криопирин, представляет собой белок, который у человека кодируется геном NLRP3. NLRP3 экспрессируется преимущественно в макрофагах и является компонентом инфламмасы. NLRP3 воспринимает факторы, происходящие от патогенов, окружающей среды и хозяина, и инициирует образование инфламмасом, комплексов, участвующих во многих воспалительных заболеваниях. Инфламмасома NLRP3 представляет собой сенсор врожденного иммунитета, который при сборке активирует каспазу-1 и опосредует процессинг и высвобождение IL-1 β . Было показано, что улучшение на мышинных моделях многих заболеваний происходит путем делеции инфламмасы NLRP3, включая подагру, сахарный диабет 2 типа, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и атеросклероз. Инфламмасома NLRP3 играет роль в патогенезе подагры и нейровоспаления, возникающих, *например*, при заболеваниях неправильного свертывания белков, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и прионные заболевания. Liu-Bryan (2010) Immunology and Cell Biology 88:20-23; Heneka et al. (2013) Nature 493:674-678; Shi et al. (2015) Life Sciences 135:9-14; Levy et al. (2015) Nature Medicine 21:213-215.

[0414] В некоторых аспектах ингибитор NLRP3 представляет собой соединение, содержащее диарилсульфонилмочевину. В некоторых аспектах соединение, содержащее диарилсульфонилмочевину, представляет собой MCC950 или его производное.

[0415] MCC950 (N-[[[(1,2,3,5,6,7-гексагидро-s-индацен-4-ил)амино]карбонил]-4-(1-гидрокси-1-метилэтил)-2-фурансульфонамид), также известный как CP-456773, является мощным и селективным ингибитором NLRP3 (NOD-подобного рецептора (NLR) белка 3, содержащего пириновый домен) инфламмасомы. MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β , индуцированное активаторами NLRP3, такими как АТФ, MSU и нигерицин, путем предупреждения олигомеризации адапторного белка инфламмасомы ASC (ассоциированного с апоптозом Speck-подобного белка, содержащего CARD). Coll et al. (2015) Nature Med. 21:248-255. MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β в макрофагах, примированных LPS и активированных АТФ или нигерицином с IC₅₀ примерно 7,5 нМ. Хотя MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β , индуцированное NLRP3, MCC950 не ингибирует инфламмасомы NLRC4, AIM2 или NLRP1. Кроме того, MCC950 не ингибирует передачу сигналов TLR2 или примирование NLRP3.

[0416] MCC950 активен *in vivo*, блокируя выработку IL-1 β и увеличивая выживаемость в моделях рассеянного склероза у мышей. MCC950 также ингибирует индуцированное NLRP3 продуцирование IL-1 β в моделях инфаркта миокарда. van Hout et al (2015) Eur. Heart J. ehw247. MCC950 также активен в образцах *ex vivo* от индивидуумом с синдромом Макл-Уэллса. MCC950 является потенциальным терапевтическим агентом для лечения NLRP3-ассоциированных синдромов, включая аутовоспалительные и аутоиммунные заболевания.

II.E Агенты, модифицирующие биораспределение

[0417] В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, содержит агент, модифицирующий биораспределение. В контексте данного документа термин «агент, модифицирующий биораспределение», который относится к агенту (т.е. полезной нагрузке), который может изменять распределение внеклеточных везикул (например, экзосом, нановезикул) *in vivo* или *in vitro* (например, в смешанной культуре клеток разных вариантов). В некоторых аспектах термин «нацеливающая группа» может использоваться взаимозаменяемо с термином «агент, модифицирующий биораспределение». В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент изменяет тропизм ВВ (например, экзосомы) («фрагмент тропизма»). В контексте данного документа термин «фрагмент тропизма» относится к нацеливающему фрагменту, который при экспрессии на ВВ (например, экзосоме) изменяет и/или усиливает естественное движение ВВ. Например, в некоторых аспектах фрагмент тропизма может способствовать поглощению ВВ конкретной клеткой, тканью или органом. Неограничивающие примеры фрагментов тропизма, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают те, которые могут связываться с маркером,

специфически экспрессируемым на дендритной клетке (например, Clec9A или DEC205) или Т-клетках (например, CD3). Если не указано иное, термин «нацеливающий фрагмент» в контексте данного документа охватывает фрагменты тропизма.

[0418] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит нацеливающий фрагмент, т.е. биологически активную молекулу, направляющую ВВ, например, экзосому, по настоящему изобретению к конкретному типу клетки или ткани, содержащей мишень (например, целевой белок, такой как рецептор), при этом другая полезная нагрузка (например, другая биологически активная молекула) может оказывать терапевтический, профилактический или диагностический эффект. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме.

[0419] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой экзогенный нацеливающий фрагмент, например, антитело или его антигенсвязывающую часть, белок или пептид, который специфически связывается с белком (например, рецептором), присутствующим на поверхности целевой клетки или ткани.

[0420] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент специфически связывается с маркером дендритной клетки. В некоторых аспектах маркер присутствует только на дендритной клетке. В некоторых аспектах дендритная клетка включает плазматическую дендритную клетку (pDC), миелоидную/обычную дендритную клетку 1 (cDC1), миелоидную/обычную дендритную клетку 2 (cDC2) или любую их комбинацию. В определенных аспектах дендритная клетка представляет собой cDC1. В дополнительных аспектах маркер включают белок А представителя 9 семейства лектиновых доменов С-типа (Clec9a), молекулы межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрина (DC-SIGN), CD207, CD40, Clec6, иммунорецептор дендритных клеток (DCIR), DEC-205, лектин-подобный окисленный рецептор-1 липопротеинов низкой плотности (LOX-1), MARCO, Clec12a, DC-асialogликопротеиновый рецептор (DC-ASGPR), иммунорецептор DC 2 (DCIR2), дектин-1, макрофагальный маннозный рецептор (MMR), BDCA-1 (CD303, Clec4c), Dectin-2, Bst-2 (CD317) или любую их комбинацию. В определенных аспектах маркером является белок Clec9a.

[0421] В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, по настоящему изобретению может содержать тканевый или клеточно-специфический лиганд, который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы, к конкретной ткани или клетке, т.е. фрагмент тропизма. Таким образом, в некоторых аспектах доставка к ВВ, например, экзосоме, в конкретную ткань или тип клеток может быть улучшена путем связывания с ВВ, например, экзосомой,

фрагментом для тропизма, направленного на тип клетки (например, иммуноаффинный лиганд, нацеленный на антиген, присутствующий на поверхности определенного типа нервных клеток). В некоторых аспектах фрагмент тропизма связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме.

[0422] Тропизм может быть дополнительно улучшен путем присоединения антифагоцитарного сигнального фрагмента (например, CD47 и/или CD24), фрагмента с продленным периодом полужизни (например, альбумина или ПЭГ) или любой их комбинации к внешней поверхности ВВ, например, экзосоме по настоящему изобретению. В некоторых аспектах фрагмент антифагоцитарный сигнальный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме.

[0423] Фармакокинетика, биораспределение и, в частности, тропизм и удерживание в необходимой ткани или анатомическом месте также могут быть достигнуты путем выбора соответствующего пути введения (например, интратекальное введение или интраокулярное введение для улучшения тропизма к центральной нервной системе).

[0424] В некоторых аспектах, когда желателен тропизм к центральной нервной системе, ВВ, например, экзосома по настоящему изобретению может содержать тканевый или клеточно-специфический целевой лиганд, который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы, к конкретной ткани или клетке центральной нервной системы. В некоторых аспектах клетка представляет собой глиальную клетку. В некоторых аспектах глиальная клетка представляет собой олигодендроцит, астроцит, эпендимальную клетку, клетку микроглии, шванновскую клетку, сателлитную глиальную клетку, обволакивающую обонятельную клетку или их комбинацию. В некоторых аспектах клетка представляет собой нервную стволую клетку. В некоторых аспектах клеточно-специфический целевой лиганд, который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы к шванновским клеткам, связывается с маркером поверхности шванновских клеток, таким как миелиновый основной белок (MBP), миелиновый протеин нулевой (P0), P75NTR, NCAM, PMP22 и любые их комбинации. В некоторых аспектах фрагмент клеточно-специфического тропизма включает антитело или его антигенсвязывающую часть, аптамер или агонист или антагонист рецептора, экспрессируемого на поверхности шванновской клетки.

[0425] В принципе, ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один фрагмент тропизма, который может направлять ВВ, например, экзосому, в конкретную целевую клетку или ткань (например, шванновские

клетки в периферических нервах), можно вводить с использованием любого подходящего способа введения, известного из уровня техники (например, внутривенной инъекции или инфузии), поскольку присутствие тропизма (отдельно или в сочетании с присутствием антифагоцитарного сигнального фрагмента и использованием определенного пути введения) будет индуцировать тропизм ВВ, например экзосомы, по направлению к необходимой целевой клетке или ткани.

[0426] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент и/или фрагмент тропизма, раскрытые в данном документе, может быть связан с ВВ, например, экзосомой по настоящему изобретению посредством каркасного фрагмента (например, фрагмента белка каркаса X или его фрагмента, или липидного фрагмента), при этом нацеливающий и/или тропический фрагмент химически связан с каркасным фрагментом посредством малеимидного фрагмента и, необязательно, одного или нескольких линкеров (например, расщепляемого линкера).

II.F ВВ, например, экзосомы

[0427] ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, могут иметь диаметр от приблизительно 20 до приблизительно 300 нм. В определенных аспектах ВВ, *например*, экзосома по настоящему изобретению имеет диаметр от приблизительно 20 до приблизительно 290 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 280 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 270 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 260 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 250 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 240 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 230 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 220 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 210 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 200 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 190 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 180 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 170 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 160 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 150 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 140 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 130 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 120 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 110 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 100 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 90 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 80 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 70 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 60 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 40 нм, от приблизительно 20 до приблизительно 30 нм, от приблизительно 30 до приблизительно 300 нм, от приблизительно 30 до приблизительно 290 нм, от

[illegible]

[illegible]

[illegible]

можно измерить в соответствии со способами, известными из уровня техники. ВВ по настоящему изобретению включают экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ВВ по настоящему изобретению содержат популяцию экзосом и/или микровезикул.

[0428] ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению содержат билипидную мембрану («мембрану экзосомы» или «мембрану ВВ»), включающую внутреннюю поверхность (просветную поверхность) и внешнюю поверхность (*например*, внеклеточную поверхность). Внутренняя поверхность обращена к внутреннему кору ВВ (*например*, экзосомы), т.е. к просвету ВВ. В определенных аспектах внешняя поверхность может быть приведена в контакт с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента.

[0429] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы содержит билипидную мембрану, *например*, липидный бислой. В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых аспектах мембрана ВВ (*например*, экзосомы) содержит липиды, которые включают фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины. В некоторых аспектах мембрана ВВ (*например*, экзосомы) содержит внутреннюю и внешнюю мембраны. Состав внутренней и внешней мембран может быть определен с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники., *см.*, *например*, Kuypers *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1985 819:170.

[0430] В некоторых аспектах состав внешней мембраны составляет примерно 70-90% холинфосфолипидов, примерно 0-15% кислых фосфолипидов и примерно 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутренней мембраны составляет примерно 15-40% холинфосфолипидов, примерно 10-50% кислых фосфолипидов и примерно 30-60% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах ВВ или мембрана экзосомы содержит один или несколько полисахаридов, таких как гликан. Гликаны на поверхности ВВ или экзосом могут служить в качестве присоединения к малеимидному фрагменту или линкеру, который соединяет гликан и малеимидный фрагмент. Гликан может присутствовать на одном или нескольких белках на поверхности ВВ (*например*, экзосомы), *например*, каркасе X, таком как полипептид PTGFRN, или на липидной мембране ВВ (*например*, экзосомы). Гликаны можно модифицировать так, чтобы они содержали тиофукозу, которая может служить функциональной группой для присоединения малеимидного фрагмента к гликанам. В некоторых аспектах каркас X может быть модифицирован для экспрессии большого количества гликана, чтобы обеспечить дополнительные прикрепления к ВВ (*например*, экзосоме).

II.G. Каркасные фрагменты

[0431] В некоторых аспектах биологически активная молекула связана с внешней поверхностью или поверхностью просвета ВВ (*например*, экзосомы). В некоторых аспектах биологически активная молекула связана, например, химически связана посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом (*например*, каркасом X) на внешней поверхности или на просветной поверхности ВВ (*например*, экзосомы). В некоторых аспектах биологически активная молекула связана, например, химически связана посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом (*например*, холестеринным фрагментом) на внешней поверхности или на просветной поверхности ВВ (*например*, экзосомы) посредством малеимидного фрагмента.

[0432] Например, полноразмерный зрелый PTGRN содержит 16 цистеинов, т.е. он содержит 16 сульфгидрильных групп, 14 из которых расположены на внеклеточной части белка, а 2 из них расположены на его внутриклеточной части. PTGRN имеет 6 дисульфидных мостиков, все из которых являются внеклеточными. Соответственно, PTGRN имеет 2 внеклеточные сульфгидрильные группы и 2 внутриклеточные сульфгидрильные группы. Таким образом, в некоторых аспектах биологически активный фрагмент может быть химически связан посредством малеимидного фрагмента с белком каркаса X (*например*, PTGRN или его фрагментом) посредством реакции между реакционноспособной группой с малеимидом, присутствующей на биологически активном фрагменте, и одной из сульфгидрильных групп, присутствующей на белке каркаса X (*например*, PTGRN или его фрагменте). В отличие от этого, белок каркаса X (*например*, PTGRN или его фрагмент), содержащий малеимидную реакционноспособную группу, вводится посредством реакции между бифункциональным реагентом, таким как SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), и боковая цепь лизина белка каркаса X может реагировать с сульфгидрильной группой, присутствующей в биологически активной молекуле.

[0433] В некоторых аспектах один или несколько фрагментов могут быть введены в ВВ (*например*, экзосому) посредством трансфекции. В некоторых аспектах один или несколько фрагментов могут быть введены в ВВ (*например*, экзосому) с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Parapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В определенных аспектах химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрен, могут использоваться для введения одного или нескольких фрагментов в ВВ (*например*, экзосому).

[0434] В некоторых аспектах один или несколько каркасных фрагментов могут представлять собой CD47, CD55, CD49, CD40, CD133, CD59, глипикан-1, CD9, CD63,

CD81, интегрины, селектины, лектины, кадгерины, другие аналогичные полипептиды, известные специалистам в данной области техники, или любую их комбинацию.

[0435] В других аспектах один или несколько каркасных фрагментов экспрессируются в мембране ВВ, например, экзосом, путем рекомбинантной экспрессии каркасных фрагментов в клетках-продуцентах. ВВ, например экзосомы, полученные из клеток-продуцентов, можно дополнительно модифицировать для конъюгирования с малеимидным фрагментом или линкером. В других аспектах каркасный фрагмент, например каркас X, дегликозилирован. В некоторых аспектах каркасный компонент, например каркас X, сильно гликозилирован, *например*, больше, чем природный каркас X при том же условии.

II.G.1 Трансмембранные каркасные фрагменты (например, каркас X)

[0436] Различные модификации или фрагменты каркасного фрагмента могут использоваться для аспектов настоящего изобретения. Например, каркасные фрагменты, модифицированные с целью повышения аффинности к связывающему агенту, могут быть использованы для создания поверхностно-сконструированных ВВ, например, экзосом, которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные для более эффективного нацеливания на ВВ, например, экзосомы, и/или мембраны. Также можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и эффективного нацеливания на мембраны ВВ (*например*, экзосом). В некоторых аспектах каркасные фрагменты могут быть связаны с малеимидным фрагментом, как описано в данном документе. В других аспектах каркасные фрагменты не связаны с малеимидным фрагментом.

[0437] Каркасные фрагменты могут быть сконструированы синтетически или рекомбинантно, *например*, для экспрессии в виде слитого белка, *например*, слитого белка каркаса X с другим фрагментом, который может реагировать с малеимидом на другой молекуле (например, белковом линкере, последовательности белка, содержащей реакционноспособную группу, например сульфгидрильную группу или их комбинацию). Например, слитый белок может содержать каркасный фрагмент, описанный в данном документе (*например*, каркас X, *например*, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент или вариант), связанный с другим фрагментом. В случае слитого белка второй фрагмент может быть природным пептидом, рекомбинантным пептидом, синтетическим пептидом или любой их комбинацией. В других аспектах каркасные фрагменты могут представлять собой CD9, CD63, CD81, PDGFR, белки

GPI, лактадгерин, LAMP2 или LAMP2B или любую их комбинацию. Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают: аминопептидазу N (CD13); неприлизин, также называемый мембранная металлоэндопептидаза (MME); представителя 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1); нейропилин-1 (NRP1); или любую их комбинацию.

[0438] В некоторых аспектах слитая молекула может содержать каркасный белок, описанный в данном документе (*например*, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент или вариант), связанный, например, химически связанный посредством малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой либо напрямую, либо через промежуточное соединение (*например*, химически индуцируемый димер, антигенсвязывающий домен или рецептор). В некоторых аспектах слитая молекула может быть химически связана, например, с нацеливающим фрагментом или с фрагментом тропизма посредством малеимидного фрагмента.

[0439] В некоторых аспектах поверхностно(*например*, каркас X)-сконструированные ВВ, например экзосомы, описанные в данном документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ, например, экзосомами, известными из уровня техники. Например, поверхностно(*например*, каркас X)-сконструированные ВВ содержат модифицированные белки, более высокообогащенные на их внешней поверхности или просветной поверхности ВВ (*например*, экзосомы), чем встречающиеся в природе ВВ, например экзосомы, или ВВ, например экзосомы, получаемые с использованием обычных белков ВВ (*например*, экзосом). Более того, поверхностно-сконструированные ВВ (*например*, каркас X), например, экзосомы по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению с ВВ, встречающимися в природе, например, экзосомами, или ВВ, например, экзосомами, полученными с использованием обычных белков ВВ (*например*, экзосом).

[0440] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, белок каркаса X, включает отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (полипептид PTGFRN). Полипептид PTGFRN может также обозначаться как партнер 1 CD9 (CD9P-1), белок F, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-F), регуляторный белок рецептора простагландина F2-альфа, белок, ассоциированный с рецептором простагландина F2-альфа, или CD315. Полноразмерная аминокислотная последовательность полипептида PTGFRN человека (номер доступа Uniprot Q9P2B2) изображена в **Табл. 2** в виде SEQ ID NO: 1. Полипептид PTGFRN содержит сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 25 из SEQ ID NO:

1), внеклеточный домен (аминокислоты с 26 по 832 SEQ ID NO: 1), трансмембранный домен (аминокислоты с 833 по 853 SEQ ID NO: 1) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 854 по 879 SEQ ID NO: 1). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 1 без сигнального пептида, т.е. аминокислот с 26 по 879 SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, пригодный для настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, пригодный для настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN и (i) по меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 110, по меньшей мере приблизительно 120, по меньшей мере приблизительно 130, по меньшей мере приблизительно 140, по меньшей мере приблизительно 150 аминокислот на N-конце трансмембранного домена, (ii) по меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20 или по меньшей мере приблизительно 25 аминокислот на C-конце трансмембранного домена или как (i), так и (ii).

[0441] В некоторых аспектах фрагменты полипептида PTGFRN лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0442] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 26 по 879 SEQ ID NO: 1. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно

100% идентичную SEQ ID NO: 2, фрагменту полипептида PTGFRN (соответствует положениям 687 по 878 SEQ ID NO: 1).

[0443] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 2.

[0444] В других аспектах каркасный компонент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 26 по 879 SEQ ID NO: 1, аминокислотам с 833 по 853 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность аминокислот с 26 по 879 SEQ ID NO: 1, аминокислот с 833 по 853 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию.

[0445] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность аминокислот с 26 по 879 SEQ ID NO: 1, аминокислот с 833 по 853 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15

аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце аминокислот кислоты с 26 по 879 SEQ ID NO: 1, аминокислот с 833 по 853 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1.

[0446] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 или 191.

ТАБЛИЦА 2. Иллюстративные последовательности каркасных белков

Белок	Последовательность
Полипептид PTGFRN (SEQ ID NO: 1)	MGRLASRPLLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNV SDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPALYQERLQRG EILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDT VQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHL ALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTV GSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVA TVVIQPSVLRAAVPKNVSAEGKELDLTCNITTDRAADDVRPEVTW SFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLV

	RDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTW LEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSW YYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDIFIS KEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYCVCVSAWTKQRNNSWVKSKDVF SKPVN IFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVL IMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGTVLE KVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATS LSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPD DMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSL ERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTGSWQKEAEIH SKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWC CKKEVQETRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Фрагмент 1 (SEQ ID NO: 186)	PSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHHLALLWEVHRGPARR SVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGSDAYRLSVSRALS ADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVP KNVSVAEGKELDLTCNITTDRAADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSR VLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYC HVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVYLNASK VPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVT SELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDIFISKEHTDTFNFRIQRT TEEDRGNYCVCVSAWTKQRNNSWVKSKDVF SKPVNIFWALEDSV LVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVG DLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGTVLEKVQEDEFR YRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDF QTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVS WFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERVSLE FLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTGSWQKEAEIHSKPVFI TVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQ ETRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Фрагмент 2 (SEQ ID NO: 187)	VATVVIQPSVLRAAVPKNVSAEGKELDLTCNITTDRAADDVRPEV TWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHL LVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVG VTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTV SWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGD

	FIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYCYVSAWTKQRNNSWVSKSDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Фрагмент 3 (SEQ ID NO: 188)	SPAGVGVTWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDFFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYCYVSAWTKQRNNSWVSKSDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Фрагмент 4 (SEQ ID NO: 189)	KPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Фрагмент 5 (SEQ ID NO: 190)	VRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDKRGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEMD

Полипептид PTGFRN Фрагмент 6 (SEQ ID NO: 191)	SKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHGCC KKEVQETRRERRRLMSMEMD
Полипептид PTGFRN Сигнальный пептид (SEQ ID NO: 192)	MGRLASRPLLLALLSLALCRG
Полипептид PTGFRN Фрагмент (SEQ ID NO: 2)	GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFA VHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQ VHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKM DVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHGCCCKKEVQETRR RRRLMSMEM 687-878 SEQ ID NO: 1
Полипептид BSG (SEQ ID NO: 3)	MAAALFVLLGFALLGTHGASGAAGFVQAPLSQQRWVGGSVELHC EAVGSPVPEIQWWFEGQGPNDTCSQLWDGARLDRVHIHATYHQH AASTISIDTLVEEDTGTIECRASNDPDRNHLTRAPRVKWWRAQAV VLVLEPGTVFTTVEDLGSKILLTCSLNDSETEVTGHRWLKGGVVL KEDALPGQKTEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRV KAVKSSEHINEGETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSEDKALM NGSESRRFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGSQAI ITLRVRSHLAALWPFLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDA GSAPLKSSGQHQNCKGKNVRQRNSS
Полипептид IGSF8 (SEQ ID NO: 4)	MGALRPTLLPPSLPLLLMLGMGCWAREVLVPEGPLYRVAGTA VSISCNVTGYEGPAQQNFEWFLYRPEAPDTALGIVSTKDTQFSYAV FKSRVVAGEVQVQRLQGDVVLKIARLQAQDAGIYECHTPSTDTR YLGSSYGKVELRVLPDVLQVSAAPPGRGRQAPTSPPRMTVHEGQ ELALGCLARTSTQKHTHLAVSFGRSVPEAPVGRSTLQEVVGIRSDL AVEAGAPYAERLAAGELRLGKEGTDYRMVVGGAQAGDAGTYH CTAAEWIQDPDGSWAQIAEKRAVLAVDVQTLSSQLAVTVGPGE RRIGPGEPELLCNVSGALPPAGRHAAYSVGWEMAPAGAPGPRL

	VAQLDTEGVGSLGPGYEGRHAMEKVASRTYRLRLEAARPGDAG TYRCLAKAYVRGSGTRLREAASARSRLPVHVREEGVVLEAVAW LAGGTVYRGETASLLCNISVRGGPPGLRLAASWWVERPEDGELSS VPAQLVGGVGQDGV AELGVRPGGGPVSVELVGPRSHRLRLHSLG PEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQAGSARSGPVTVYPYMHALD TLFVPLL VGTGVALVTGATVLGTITCCFMKRLRKR
Полипептид ITGB1 (SEQ ID NO: 5)	MNLQPIFWIGLISSVCCVFAQTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCG WCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKKGCPDDIENPRGSKDIKK NKNVTNRSKGTAEKLPEDITQIQPQQLVLRLRSGEPQTFTLKFKR AEDYPIDLYYLMDSL SYSMKDDLENVKSLGTDLMNEMRRITSDFRI GFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTNK GEVFNELVGKQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRL LVFSTDAGFHFAGDGKLGIVLPNDGQCHLENNMYTMSHYYDYP SIAHLVQKLSENNIQTIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTLANS SNVIQLIIDAYNSLSSEVILENGKLSEGVTISYKSYCKNGVNGTGEN GRKCSNISIGDEVQFEISITSNKCCKKDSDFSIRPLGFTEEEVILQ YICECECQSEGIPEPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTD EVNSEDMDAYCRKENSSEICSNNGECVCGQCVCRRDNTNEIYSG ASNGQICNGRGICECGVCKCTDPKFQGGQTCMCQTCLGVCAEHK ECVQCRAFNKGKKDTCTQECSYFNITKVESRDKLPQPVPDPVS HCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEVMVHVVENPECPTGPDIIPIVA GVVAGIVLIGLALLLIWKLLMIHHRREFAKFEKEKMNAKWDGTGE NPIYKSAVTTVVNPKYEGK
Полипептид ITGA4 (SEQ ID NO: 6)	MAWEARREPGPRRAAVRETVMLLLCLGVPTGRPYNVDTESALLY QGPHNTLFGYSVVLHSHGANRWLLVGAPTANWLANASVINPGAI YRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLRSR QPGENGSIIVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKR IAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGSSYWTGS LFVYNITTNKYKAFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFERSQHTTEV VGGAPQHEQIGKAYIFSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGASVCAV DLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVFVYINSGSGAVMNAMETN LVGSDKYAARFGESIVNLGDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIYIY NGRADGISSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSIGQIDADNNGYVDVA VGAFRSDSAVLLRTRPVVIVDASLSHPESVNRTKFDCVENGWPSV

	CIDLTLCFSYKGKEVPGYIVLFYNMSLDVNRKAESPPRFYFSSNGT SDVITGSIQVSSREANCRT HQAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPH VISKRSTEEFPPLQPILQQKKEKDIMKKTINFARFCAHENC SADLQV SAKIGFLKPHENKTYLAVGSMKTLMLNVSLFNAGDDAYETTLHV KLPVGLYFIKILELEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGYIYVDHLSRI DISFLLDVSSLSRAEEDLSITVHATCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLK YEVKLT VHGFVNPTSFVYGSNDENEPETCMVEKMNLTFHVINTGN SMAPNVSV EIMVPNSFSPQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQ RVC ALEQQKSAMQTLKGIVRFLSKTDKRLLYCIKADPHCLNFLCNFGK MESGKEASVHIQLEGRPSILEMDETSALKFEIRATGFPEPNPRVIEL NKDENVAHVLLLEGLHHQRPKRYFTIVIISSSLLLGLIVLLLISYVMW KAGFFKRQYKSILQEENRRDSWSYINSKSNDD
Полипептид SLC3A2, в котором Первый Met является процессиров анным. (SEQ ID NO: 7)	MELQPPEASIAVVSIPRQLPGSHSEAGVQGLSAGDDSELGSHCVAQ TGLELLASGDPLPSASQNAEMIETGSDCVTQAGLQLLASSDPPALA SKNAEVTGTMSQDTEVDMKEVELNELEPEKQPMNAASGAAMSL AGAEKNGLVKIKVAEDEAEAAAAAKFTGLSKEELLKVAGSPGWV RTRWALLLLFWLGWLGMLAGAVVIIVRAPRCRELPAQKWWHTG ALYRIGDLQAFQGHGAGNLAGLKGRLDYLSSLKVKGLVLGPIHK NQKDDVAQTDLLQIDPNFGSKEDFDSLQSAKKKSIRVILDLT PNY RGENSWFSTQVDTVATKVKDALEFWLQAGVDGFQVRDIENLKDA SSFLAEWQNITKGFSEDRLLIAGTNSSDLQQILSLLESNKDLLLTSS YLSDSGSTGEHTKSLVTQYLNATGNRWCSWSLSQARLLTSFLPAQ LLRLYQLMLFTLPGTPVFSYGDEIGLDAAALPGQPMEAPVMLWDE SSFPDIPGAVSANMTVKGQSEDPGSLLSLFRRLSDQRSKERSLLHG DFHAFSAGPGLFSYIRHWDQNERFLVVLNFGDVGLSAGLQASDLP ASASLPAKADLLLSTQPGREEGSPLELERLKLEPHEGLLLRFPYAA
Белок BSG Фрагмент 1 (SEQ ID NO: 193)	PGTVFTTVEDLGSKILLTCSLND SATEVTGHRWLKGGVVLKEDAL PGQKTEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRVKAVK SSEHINEGETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSEDKALMNGSES RFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGS DQAIITLRV RSHLAALWPFLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDAGSAP LKSSGQHQN DKGKNVRQRNSS
Белок BSG Фрагмент 2	HGPPRVKAVKSSEHINEGETAMLVCKSESVPVTDWAWYKITDSE DKALMNGSES RFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSK

(SEQ ID NO: 194)	GSDQAIITLRVRSHLAALWPFLGIVA EVLVLTIIIFIYEKRRKPEDV LDDDDAGSAPLKSSGQHQNCKGKNVRQRNSS
Белок BSG Фрагмент 3 (SEQ ID NO: 195)	SHLAALWPFLGIVA EVLVLTIIIFIYEKRRKPEDVLDDDDAGSAPL KSSGQHQNCKGKNVRQRNSS
Белок BSG Сигнальный пептид (SEQ ID NO: 196)	MAAALFVLLGFALLGTHG
Белок IGSF8 Фрагмент №1 (SEQ ID NO: 197)	APPGPRGRQAPTSPRMTVHEGQELALGCLARTSTQKHTHLAVSF GRSVPEAPVGRSTLQEVVGIRSDLAVEAGAPYAERLAAGELRLGK EGTDRYRMVVGGAQAGDAGTYHCTAAEWIQDPDGSWAQIAEKR AVLAHVDVQTLSSQLAVTVGPGERRIGPGEPELLECNVSGALPPA GRHAAYSVGWEMAPAGAPGPGRLVAQLDTEGVGSLGPGYEGRHI AMEKVASRTYRLRLEAARPGDAGTYRCLAKAYVRGSGTRLREAA SARSRPLPVHVREEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRG GPPGLRLAASWWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGV AELGVRP GGGPVSVELVGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYS WYQAGSARSGPVTVPYPMHALDTL FVPLL VGTGVALVTGATVLG TITCCFMKRLRKR
Белок IGSF8 Фрагмент №2 (SEQ ID NO: 198)	AHVDVQTLSSQLAVTVGPGERRIGPGEPELLECNVSGALPPAGRH AAYSVGWEMAPAGAPGPGRLVAQLDTEGVGSLGPGYEGRHIAM EKVASRTYRLRLEAARPGDAGTYRCLAKAYVRGSGTRLREAASA RSRPLPVHVREEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRGGP PGLRLAASWWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGV AELGVRPGG GPVSVELVGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWY QAGSARSGPVTVPYPMHALDTL FVPLL VGTGVALVTGATVLGTIT CCFMKRLRKR
Белок IGSF8 Фрагмент №3 (SEQ ID NO: 199)	REEGVVLEAVAWLAGGTVYRGETASLLCNISVRGGPPGLRLAAS WWVERPEDGELSSVPAQLVGGVGQDGV AELGVRPGGGPVSVEL VGPRSHRLRLHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQAGSARS GPVTVPYPMHALDTL FVPLL VGTGVALVTGATVLGTITCCFMKRL RKR

Белок IGSF8 Фрагмент №4 (SEQ ID NO: 200)	VALVTGATVLGTITCCFMKRLRKR
Белок IGSF8 - сигнальный пептид (SEQ ID NO: 201)	MGALRPTLLPPSLPLLLLLMLGMGCWA
Белок IGSF2 (SEQ ID NO: 202)	MAGISYVASFFLLLTkLSIGQREVTvQKGPLFRAEGYPVSiGCNVT GHQGPSEQHFQWSVYLPTNPTQEVQIISTKDAAFSYAVYTQRVRS GDVYVERVQGNsvLLHISKlQMkdAGEYECHTPNTDEKYYGSYS AKTNLIVIPDTLSATMSSQTLGKEEGEPLALTCEASKATAQHThLS VTWYLTQDGGGSQATEIISLSKDFILVPGPLYTERFAASDVQLNKL GPTTFRLSIERLQSSDQGQLFCEATEWIQDPDETWMFITKKQTDQT TLRIQPAVKDFQVNITADSLFAEGKPLELVCLVVSSGRDPQLQGIW FFNGTEIAHIDAGGVLGLKNDYKERASQGELQVSKLGPKAFSLKIF SLGPEDEGAYRCVVAEVMKTRTGSWQVLQRKQSPDSHVHLRKPA ARSVVMSTKNKQQVVWEGETLAFLCKAGGAESPLSVSWWHIPRD QTQPEFVAGMGQDGIVQLGASYGVPSYHGNTREKMDWATFQLE ITFTAITDSGTyECRVSEKSRNQARDLSWTQKISVTVKsLESSLQVS LMSRQPQVMLTNTFDLSCVVRAGYSDLKVPLTVTWQFQPASSHIF HQLIRITHNGTIEWGNFLSRFQKKTKVSQSLFRSQLLVHDATEEET GVYQCEVEVYDRNSLYNNRPPRASAISHPLRIAVTLPEskLKVNsr SQVQELSINSNTDIECSILSRsNGNLQLAIIWYFSPVSTNASWLKILE MDQTNVIKtGDEFHTPQRKQKFHTEKVSQDLFQLHILNVEDSDRG KYHCAVEEWLLSTNGTWHKLGEKKSGLTElKLKPTGSKVRVSKV YWTENVTEHREVAIRCSLESVGSSATLYSVMWYWNRENSGSKLL VHLQHDGLLEYGEEGLRRHLHCYRSSSTDFVLKLHQVEMEDAGM YWCrvAEWQLHGHPskWINQASDESQRMVLTVLPSEPTLPSRICs SAPLLYFLFICPFVLLLLLLISLLCLYWKARKLSTLRsNTRKEKALW VDLKEAGGVTTNRREDEEEDEGN

Белок IGSF3 (SEQ ID NO: 203)	MKCFPPVLSCLAVLGVVSAQRQVTVQEGPLYRTEGSHITIWCNVS GYQGPSEQNFQWSIYLPSSPEREVQIVSTMDSSFPYAIYTQVRVGG KIFIERVQGNSTLLHITDLQARDAGEYECHTPSTDKQYFGSYSAKM NLVVIPDSLQTTAMPQTLHRVEQDPLELTCEVASETIQHSHLSVAW LRQKVGEKPVEVISLSRDFMLHSSEYAQRQSLGEVRLDKLGRTTF RLTIFHLQPSDQGEFYCEAAEWIQDPDGSWYAMTRKRSEGAVVN VQPTDKEFTVRLETEKRLHTVGEPVEFRCILEAQNVDPDRYFAVSW AFNSSLIATMGPNAPVVLNSEFAHREARGQLKVAKESDSVFLKI YHLRQEDSGKYNCRVTEREKTVTGEFIDKESKRPKNIPIVLPLKSSI SVEVASNASVILEGEDLRFSCSVRTAGRPQGRFSVIWQLVDRQNR RSNIMWLDRDGTVPQGSYWERSSFGGVQMEQVQPNFSLSLGFNS RKEDEGQYECHVTEWVRAVDGEWQIVGERRASTPISITALEMGFA VTAISRTPGVTYSDFSFLQCIKPHYPAWVPVSVTWRFQPVGTVEF HDLVTFTRDGGVQWGDRSSSFRTRTAIEKAESSNNVRLSISRASDT EAGKYQCVAELWRKNYNNTWTRLAERTSNLLEIRVLQPVTKLQV SKSKRTLTLVENKPIQLNCSVKSQTSQNSHFAVLWYVHKPSDADG KLILKTTHNSAFEYGTYAEEEEGLRARLQFERHVSGLFSLTVQRAE VSDSGSYCHVEEWLLSPNYAWYKLAEVSGRTEVTVKQPDSRL RLSQAQGNLSVLETRQVQLECVVLNRTSITSQLMVEWFVWKPNH PERETVARLSRDATFHYGEQAAKNNLKGR LHLESPSPGVYRLFQ NVAVQDSGTYSCHVEEWLPSPSGMWWYKRAEDTAGQTALTVMRP DASLQVDTVVPNATVSEKAAFQLDCSIVSRSSQDSRFVAVAWYSLR TKAGGKRSSPGLEEQUEEEEEEEEEEDDDDDDDPTERTALLSVGPD AVFGPEGSPWEGRLRFQRLSPVLYRLTVLQASPQDTGNYSCHVEE WLSPQKEWYRLTEESAPIGIRVLDTSPTLQSIICSNDALFYFVFFY PFPIFGILIITILLVRFKSRNSSKNSDGKNGVPLLWIKEPHLNYSPTCL EPPVLSIHGAID
------------------------------------	--

Белок ATP1A1 (SEQ ID NO: 204)	MGKGVGRDKYEPAAVSEQGDKKGKKGKKDRDMDELKKEVSMD DHKLSLDELHRKYGTDL SRGLTSARAAEILARDGPNALTTPPTTPE WIKFCRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSIQAATEEEPQNDNLYLGV VLSAVVIITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRNGEKMSI NAEEVVVGDLVEVKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEPQT RSPDFTNENPLETRNIAFFSTNCVEGTARGIVVYTGDRVTMGRIAT LASGLEGGQTPIAAEIEHFIHIITGVAVFLGVSFILSLILEYTWLEAV IFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETL GSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMFWDNQIHEADTTENQSGVSFD KTSATWLALSRIAGLCNRAVFQANQENLPILKRAVAGDASESALL KCIELCCGSVKEMRERYAKIVEIPFNSTNKYQLSIHKNPNTSEPQHL LVMKGAPERILDRCSSILLHGKEQPLDEELKDAFQONAYLELGGLG ERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFDTDDVNFIDNLCFVGLISMIDPPR AAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIHSEGNETVE DIAARLNIPVSQVNPRDAKACVVHGSDLKDMTSEQLDDILKYHTE IVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVA MGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIAYT LTSNIPEITPFLIFIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMPAISLAYEQAES DIMKRQPRNPKTDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAE NGFLPIHLLGLRVDWDDRWINDDVEDSYGQQWTYEQRKIVEFTCH TAFVVSIVVVQWADLVICKTRNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALA AFLSYCPGMGVALRMYPLKPTWWFCAPYSLLIFVYDEVKLIIR RRPGGWVEKETYY
Белок ATP1A2 (SEQ ID NO: 205)	MGRGAGREYSPAATTAENGGGKKKQKEKELDELKKEVAMDDHK LSLDELGRKYQVDLSKGLTNQRAQDVLARDGPNALTTPPTTPEW VKFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAMEDEPSNDNLYLGVV LAAVVIVTGCFSYYQEAKSSKIMDSFKNMVPQQALVIREGEKMQUI NAEEVVVGDLVEVKGGDRVPADLRIISSHGCKVDNSSLTGESEPQ TRSPEFTHENPLETRNI

Белок ATP1A3 (SEQ ID NO: 206)	CFFSTNCVEGTARGIVIATGDRTVMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIE HFIQLITGVAVFLGVSEFFVLSLILGYSWLEAVIFLIGHIVANVPEGLL ATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLT QNRMTVAHMFWDNQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTALSRIAG LCNRAVFKAGQENISVSKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMR DRNPKVAEIPFNSTNKYQLSIHEREDSPQSHVLVMKGAPERILDRC STILVQGKEIPLDKEMQDAFQNAYMELGGLGERVLGFCQLNLPSG KFPRGFKFDDELNFPTEKLCFVGLMSMIDPPRAAVPDAVGKCRS AGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNETVEDIAARLNIPMSQV NPREAKACVVHGSDLKDMTSEQLDEILKNHTEIVFARTSPQQKLII VEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSDVSKQAA DMILLDDNFASIVTGVEEGRILFDNLKKSIAYTLTSNIPEITPFLLFII ANIPLPLGTVTILCIDLGTMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNSQTD KLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPSRLLGIRLD WDDRTMNDLED SYGQEWTYEQRKVVEFTCHTAFFASIVVQWA DLIICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLLEETALAAFLSYCPGMGVAL RMYPLKVTWWFCAPYSLLIFIYDEV RKLILRRYPGGWVEKETYY
--	---

Белок ATP1A4 (SEQ ID NO: 207)	MGSGGSDSYRIATSQDKKDDKDSPKKNKGKERDLDLKEVA MTEHKMSVEEVCRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTTPPT TPEWVKFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNLY LGIVLAAVVIITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEK MQVNAAEEVVVGDLVEIKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGES EPQTRSPDCTHDNPLETRNITFFSTNCVEGTARGVVVATGDRTVM GRIATLASGLEVGKTPIAIEIEHFIQLITGVAVFLGVSFILSLILGYT WLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLE AVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMFWDNQIHEADTTEDQS GTSFDKSSHTWVALSHIAGLCNRAVFKGGQDNIPVLKRDVAGDAS ESALLKCIELSSGSVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQLSIHETEDPN DNRYLLVMKGAPERILDRCSTILLQGKEQPLDEEMKEAFQNAYLE LGGLGERVLGFCHYYLP EEQFPKGFAFDCDDVNFTTDNLCFVGLM SMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISE GNETVEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVIHGTDLKDFTSEQIDEILQ NHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKAD IGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKS IAYTLTSNIPEITPFLLFIMANIPLPLGTITILCIDLGTDMPAISLAYE AAESDIMKRQPRNPRTDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFSYF VILAENGFLPGNLVGIRLNWDDRTVNDLEDSYGQQWTYEQRKV EFTCHTAFFVSIVVVQWADLIICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFEE TALAFLSYCPGMDVALRMYPLKPSWWFCAPYSFLIFVYDEIRK LILRRNPGGWVEKETYY
--	--

Белок ATP1B3 (SEQ ID NO: 208)	MGLWGKKGTVAPHDQSPRRRPKKGLIKKKMVKREKQKRNMEEL KKEVVMDDHKL TLEELSTKYSVDLTKGHSHQRAKEILTRGGPNT VTPPPTTPEWVKFCKQLFGGFSLLLWTGAILCFVAYSIIQYFNNEPT KDNLYLSIVLSVVVIVTGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVI RGGEKMQINVQEVVLGDLVEIKGGDRVPADLRLISAQGCKVDNSS LTGESEPQSRSPDFTHENPLETRNICFFSTNCVEGTARGIVIAATGDST VMGRIASLTSGLA VGTPIAAEIEHFIHLITVVAVFLGVTF FALSLL LGYGWLEAII FLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLV KNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMFDMTVYEADT TEEQTGKTFTKSSDTWFMLARIAGLCNRADFKANQEILPIAKRATT GDASESALLKFIEQSYSSVAEMREKNPKVAEIPFNSTNKYQMSIHL REDSSQTHVLMMKGAPERILEFCSTFLLNGQEYSMNDEMKEAFQ NAYLELGGLGERVLGFCFLNLPSSFSKGFPFNTDEINFPMDNLCFV GLISMIDPPRAAVPDAVSKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGI ISEGTETAEEVAARLKIPISKVDASAAKAIVVHGAELKDIQSKQLD QILQNHPEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRLGAVVAVTGDGVNDSPAL KKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRILFDN LKKSIMYTLTSNIPEITPFLMFIILGIPLPLGTITILCIDLGTDMPVAIS LAYESAESDIMKRLPRNPKTDNLVNHRLIGMAYGQIGMIQALAGF FTYFVILAENGFRPVDLLGIRLHWEDKYLN DLED SYGQQWTYEQR KVVEFTCQTAFFVTIVVVQWADLIISKTRRNSLFQQGMRNKVLIFG ILEETLLAAFLSYTPGMDVALRMYPLKITWWLCAIPYSILIFVYDEI RKLLIRQHPDGWVERETYY
Белок ATP2B1 (SEQ ID NO: 209)	MTKNEKKSLNQSLAEWKLFYINPTTGEFLGRTAKSWGLILLFYLV FYGFLAALFSFTMWVMLQTLNDEV PKYRDQIPSPGLMVFPKPVTA LEYTFSRSDPTSYAGYIEDLKKFLKPYTLEE QKNLTVCPDGALFEQ KGPVYVACQFPISLLQACSGMNDPDFGYSQGNPCILVKMNRIIGLK PEGVPRIDCVSKNEDIPNVAVYPHNGMIDLKYFPYYGKKLHVGYL QPLVAVQVSFAPNNTGKEVTVECKIDGSANLKSQDDRDKFLGRV MFKITARA

Белок ATP2B2 (SEQ ID NO: 210)	MGDMANNSVAYSGVKNSLKEANHDGDFGITLAELRALMELRSTD ALRKIQESYGDVYGICTKLKTSPNEGLSGNPADLERREAVFGKNFI PPKKPKTFLQLVWEALQDVTLIILEIAAIVSLGLSFYQPPEGDNALC GEVSVGEEEGEGETGWIEGAAILLSVVCVVLVTA FN DWSKEKQFR GLQSRIEQEQKFTVIRGGQVIQIPVADITVGDIAQVKYGDLLPADGI LIQGNDLKIDESSLTGESDHVKKSLDKDPLLLSGTHVMEGSGRMV VTAVGVNSQTGIIFTLLGAGGEEEEKKDEKKKEKKNNKKQDGA IEN RNKAKAQDGAAMEMQPLKSEEGGDGDEKDKKKANLPKKEKSVL QGKLTCLAVQIGKAGLLMSAITVIILVLYFVIDTFWVQKRPWLAEC TPIYIQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMKDN NLVRHLDACETMGNATAICSDKTGTLTMRMTVVQAYINEKH YK KVPEPEAIPPNILSYLVTGISVNCA YTSKILPPEKEGGLPRHVG NKT ECALLGLLDLKR DYQDVRNEIPEEALYKVYTFNSVRKSMSTVLK NSDGSYRIFSKGASEIILKKCFKILSANGEAKVFRPRDRDDIVKT VIE PMASEGLRTICLA FRDFPAGEPEPEWDNENDIVTGLTCIAVVGIEDP VRPEVPDAIKKCQRAGITVRMVTGDNINTARAIA TKCGILHPGEDF LCLEGKDFNRRIRNEKGEIEQERIDKIWPKLRLARSSPTDKHTLV KGIIDSTVSDQRQVVA VTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDV AKEASDIILTDDNFTSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVA VIVAFTGACITQDSPLKAVQMLWVNLIMDTLASLALATEPPTESLL LRKPYGRNKPLISRTMMKNILGHAFYQLVVVFTLLFAGEKFFDIDS GRNAPLHAPPSEHYTIVFNTFVLMQLFNEINARKIHGERNVFEGIFN NAIFCTIVLGTFFVQIIIVQFGGKPFSCSELSIEQWLWSIFLGMGTLL WGQLISTIPTSR LKFLKEAGHGTQKEEIP EEELAE DVEEIDHAEREL RRGQILWFRGLNRIQTQMDVVNAFQSGSSIQ GALRRQPSIASQHH DVTNISTPTHIRVVNAFRSSLYEGLEKPESRSSIHNFMTHPEFRIEDS EPHIPLIDDTDAEDDAPTKRNSSPPSPNKNNNAVDSGIHLTIEMNK SATSSSPGSPLHSLETSL
--	--

Белок ATP2B3 (SEQ ID NO: 211)	MGDMTNSDFYSKNQRNESSHGGEFGCTMEELRSLMELRGTEAVV KIKETYGDTEAICRRLKTSPVEGLPGTAPDLEKRKQIFGQNFIPPKK PKTFLQLVWEALQDVTLLILEIAAIIISLGLSFYHPPGEGNEGCATAQ GGAEDEGEAEAGWIEGAAILLSVICVVLVTAFNDWSKEKQFRGLQ SRIEQEQKFTVVRAGQVVQIPVAEIVVGDIAQVKYGDLLPADGLFI QGNDLKIDESSLTGESDQVRKSVDKDPMLLSGTHVMEGSGRMLV TAVGVNSQTGIIFTLLGAGGEEEEKKDKKGVKKGDGLQLPAADG AAASNAADSANASLVNGKMQDGNVDASQSKAKQQDGAAAMEM QPLKSAEGGDADDRKKASMHKKEKSVLQGKLTCLAVQIGKAGL VMSAITVILVLVYFTVDTFVVNKKPWLPECTPVYVQYFVKFFIIGVT VLVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMKDNVLVRHLDACETMGN ATAICSDKTGTLTTNRMTVVQAYVGDVHYKEIPDPSSINTKTMEL LINAIAINSAYTTKILPPEKEGALPRQVGNKTECGLLGFVLDLKQD YEPVRSQMPEEKLYKVYTFNSVRKSMSTVIKLPDESFRMYSKGAS EIVLKKCKILNGAGEPRVFRPRDRDEMVKKVIEPMACDGLRTIC VAYRDFPSSPEPDWDNENDILNELTCICVVGIEDPVRPEVPEAIRKC QRAGITVRMVTGDNINTARAIAIKCGIIHPGEDFLCLEGKEFNRRIR NEKGEIEQERIDKIWPCLRVLARSSPTDKHTLVKGIIDSTHTEQRQV VAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDIILTDDNFS SIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAVIVAFTGACITQDSP LKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEPPTETLLLRKPYGRNKPLISRT MMKNILGHAVYQLALIFTLLFVGEKMFQIDSGRNAPLHSPSEHYT IIFNTFVMMQLFNEINARKIHGERNVFDGIFRNPIFCTIVLGTFAIQIV IVQFGGKPFSCSPLQLDQWMWCIFIGLGELVWGQVIATIPTSRLKF LKEAGRLTQKEEIPPEELNEDVEEIDHAERELRRGQILWFRGLNRI QTQIEVVNTFKSGASFQGALRRQSSVTSQSQDIRVVKAFRSSLYEG LEKPESRTSIHNFMAHPEFRIEDSQPHIPLIDDTDLEEDAALKQNSSP PSSLNKNNSAIDSGINLTTDTSKSATSSSPGSPHSLETSL
--	---

Белок ATP2B4 (SEQ ID NO: 212)	MGDMANSSIEFHPPKQQQRDVPQAGGFGCTLAELRTLMELRGAE ALQKIEEAYGDVSGLCRRLKTSPTTEGLADNTNDLEKRRQIYGQNF PPKQPKTFLQLVWEALQDVTLLILEVAAIVSLGLSFYAPPGESEAC GNVSGGAEDEGEAEAGWIEGAAILLSVICVVLVTAFNDWSKEKQF RGLQSRIEQEQKFTVIRNGQLLQVPVAALVVGDIQVKYGDLLPA DGVLIQANDLKIDESSLTGESDHVRKSADKDPMLLSGTHVMEGSG RMVVTAVGVNSQTGIIFTLLGAGGEEEEKKDKKKGKQQDGAMESS QTKAKKQDGAVAMEMQPLKSAEGGEMEEREKKKANAPKKEKSV LQGKLTCLAVQIGKAGLVMSAITVILLVLYFVIETFFVEGRTWLAE CTPVYVQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMK DNNLVRHLDACETMGNATAICSDKTGTLTNRMTVVQSYLGDTH YKEIPAPSALTPKILDLLVHAISINSAYTTKILPPEKEGALPRQVGNK TECALLGFVLDLKRDFQPVREQIPEDKLYKVYTFNSVRKSMSTVIR MPDGGFRLFSKGASEILLKKCTNILNSNGELRGFRPRDRDDMVRKI IEPMACDGLRTICIAYRDFSAGQEPDWDNENEVVGDLTCIAVVGIE DPVRPEVPEAIRKCQRAGITVRMVTGDNINTARAIAAKCGIIQPG DFLCLEGKEFNRRIRNEKGEIEQERLDKVPKLRVLARSSPTDKHT LVKGIIDSTTGEQRQVVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGT DVAKEASDIILTDDNFTSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQLTVNV VAVIVAFTGACIT
--	--

[0447] В других вариантах осуществления каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок BSG, белок IGSF8, белок IGSF3, белок ITGB1, белок SLC3A2, белок ITGA4, белок ATP1A1, белок ATP1A2, белок ATP1A3, белок ATP1A4, белок ATP1A5, белок ATP2B1, белок ATP2B2, белок ATP2B3, белок ATP2B4 или белок IGSF2, который содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную соответствующему зрелому белку BSG, белку IGSF8, белку IGSF3, белку ITGB1, белку SLC3A2, белку ITGA4, белку ATP1A1, белку ATP1A2, белку ATP1A3, белку ATP1A4, белку ATP1A5, белку ATP2B1, белку ATP2B2, белку ATP2B3, белку ATP2B4 или белку IGSF2 (без сигнального пептида). В некоторых аспектах белок BSG, белок IGSF8, белок

IGSF3, белок ITGB1, белок SLC3A2, белок ITGA4, белок ATP1A1, белок ATP1A2, белок ATP1A3, белок ATP1A4, белок ATP1A5, ATP2B1 белок, белок ATP2B2, белок ATP2B3, белок ATP2B4 или белок IGSF2 лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0448] Неограничивающие примеры других белков каркаса X можно найти в патенте США № 10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который включен посредством ссылки в полном объеме, таких как белки-переносчик АТФ: ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2 и ATP2B4), CD9, CD63, CD81, PDGFR, белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B.

[0449] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит басигин (белок BSG). Белок BSG также известен как 5F7, фактор стимуляции коллагеназы, индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса (EMMPRIN), антиген активации лейкоцитов М6, антиген группы крови ОК, фактор стимуляции коллагеназы опухолевых клеток (TCSF) или CD147. Номер Uniprot для белка BSG человека составляет P35613. Сигнальный пептид белка BSG представляет собой аминокислоты с 1 по 21 SEQ ID NO: 3. Аминокислоты 138-323 SEQ ID NO: 3 представляют собой внеклеточный домен, аминокислоты с 324 по 344 SEQ ID NO: 3 представляют собой трансмембранный домен, а аминокислоты с 345 по 385 SEQ ID NO: 3 представляют собой цитоплазматический домен BSG.

[0450] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 22 по 385 белка BSG человека (SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах фрагменты полипептида басигина лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV, *например*, аминокислот с 221 по 315 белка BSG человека.

[0451] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по

меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 193, 194 или 195. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, 194 или 195, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, 194 или 195, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 193, 194 или 195.

[0452] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например каркас X, содержит представителя суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IgSF8 или белок IGSF8), который также известен как партнер 3 CD81, белок 2, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-2), кератиноцит-ассоциированный трансмембранный белок 4 (KCT-4), LIR-D1, белок, подобный регулятору простагландина (PGRL) или CD316. Полноразмерный белок IGSF8 человека имеет номер доступа Q969P0 в Uniprot и представлен в данном документе в виде SEQ ID NO: 4. Белок IGSF8 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты 1-27 белка IGSF8 человека; SEQ ID NO: 4), внеклеточный домен (аминокислоты 28-579 белка IGSF8 человека; SEQ ID NO: 4), трансмембранный домен (аминокислоты 580-600 белка IGSF8 человека; SEQ ID NO: 4) и цитоплазматический домен (аминокислоты 601-613 белка IGSF8 человека; SEQ ID NO: 4).

[0453] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 28 по 613 белка IGSF8 человека (SEQ ID NO: 4). В некоторых аспектах белок IGSF8 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов,

таких как IgV. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность белка IGSF8 человека (SEQ ID NO: 4), за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность белка IGSF8 человека SEQ ID NO: 4, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце белка IGSF8 человека SEQ ID NO: 4.

[0454] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 197, 198, 199 или 200.

[0455] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X по настоящему изобретению содержит представителя суперсемейства 3 иммуноглобулинов

(IgSF3 или белок IGSF3), который также известен как белок 3, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-3), и представлен в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 203. Белок IGSF3 имеет сигнальный пептид (аминокислоты 1-19 белка IGSF3 SEQ ID NO: 203), внеклеточный домен (аминокислоты 20-1124 белка IGSF3 SEQ ID NO: 203), трансмембранный домен (аминокислоты 1125-1145 белка IGSF3) и цитоплазматический домен (аминокислоты 1146-1194 белка IGSF3 SEQ ID NO: 203).

[0456] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 28 по 613 белка IGSF3 (SEQ ID NO: 203). В некоторых аспектах белок IGSF3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0457] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например каркас X по настоящему изобретению содержит интегрин бета-1 (белок ITGB1), который также известен как субъединица бета рецептора фибронектина, гликопротеин IIa (GPIIa), субъединица бета VLA-4, или CD29, и представлен в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. Белок ITGB1 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 20 белка ITGB1 человека SEQ ID NO: 5), внеклеточный домен (аминокислоты с 21 по 728 белка ITGB1 человека SEQ ID NO: 5), трансмембранный домен (аминокислоты с 729 по 751 белка ITGB1 человека SEQ ID NO: 5) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 752 по 798 белка ITGB1 человека SEQ ID NO: 5).

[0458] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную аминокислотам с 21 по 798 белка ITGB1 человека (SEQ ID NO: 5). В некоторых аспектах белок ITGB1 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0459] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ITGA4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ITGB1 человека SEQ ID NO: 6 без сигнального пептида (аминокислоты с 1 по 33 белка ITGB1 человека SEQ ID NO: 6). В некоторых аспектах белок ITGA4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0460] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок SLC3A2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку SLC3A2 SEQ ID NO: 7 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок SLC3A2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0461] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ATP1A1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP1A1 SEQ ID NO: 204 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A1 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0462] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ATP1A2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере

приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP1A2 SEQ ID NO: 205 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0463] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ATP1A3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP1A3 SEQ ID NO: 206 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0464] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ATP1A4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP1A4 SEQ ID NO: 207 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0465] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок ATP1B3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP1B3 SEQ ID NO: 208 без сигнального пептида. В некоторых

аспектах белок АТР1В3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0466] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок АТР2В1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку АТР2В1 SEQ ID NO: 209 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В1 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0467] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок АТР2В2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку АТР2В2 SEQ ID NO: 210 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0468] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок АТР2В3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку АТР2В3 SEQ ID NO: 211 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0469] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок АТР2В4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере

приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку ATP2B4 SEQ ID NO: 212 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP2B4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0470] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас X, содержит белок IGSF2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентична белку IGSF2 SEQ ID NO: 202 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок IGSF2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0471] Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, например, белков каркаса X, можно найти в патенте США № US10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который включен посредством ссылки в полном объеме.

[0472] В некоторых аспектах последовательность кодирует фрагмент каркасного фрагмента, в котором отсутствует по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот от N-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует фрагмент каркасного фрагмента, в котором отсутствует по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот от C-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует фрагмент каркасного фрагмента, в котором отсутствует по

меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700 или по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот как от N-конца, так и от C-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует каркасный фрагмент, в котором отсутствует один или более функциональных или структурных доменов нативного белка.

[0473] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, *например*, каркас X, *например*, белок PTGFRN связан с одним или несколькими гетерологичными белками. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с N-концом каркасного фрагмента. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с C-концом каркасного фрагмента. В некоторых аспектах один или несколько гетерологичных белков связаны как с N-концом, так и с C-концом каркасного фрагмента. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок млекопитающего. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок человека.

[0474] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, *например*, каркас X, можно использовать для связывания любого фрагмента с просветной поверхностью ВВ (*например*, экзосомы) в одно и то же время. *Например*, полипептид PTGFRN можно использовать для связывания одной или нескольких биологически активных молекул опосредованно посредством малеимидного фрагмента или непосредственно с малеимидным фрагментом или линкером на просветной поверхности в дополнение к внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы). Следовательно, в некоторых аспектах каркас X может использоваться для двойных целей.

[0475] В других аспектах ВВ, *например* экзосомы по настоящему изобретению содержат большее количество белков каркаса X по сравнению с встречающимися в природе ВВ, *например*, экзосомами. В некоторых аспектах, ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 30 раз, по меньшей мере приблизительно в 40 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз, по меньшей мере приблизительно в 60 раз, по меньшей мере приблизительно в 70 раз, по меньшей мере приблизительно в 80 раз, по меньшей мере приблизительно в 90 раз, по меньшей мере приблизительно в 100 раз, по меньшей мере приблизительно в 110 раз, по меньшей мере приблизительно в 120 раз, по меньшей мере приблизительно в 130 раз, по меньшей мере приблизительно в 140 раз, по меньшей мере

приблизительно в 150 раз, по меньшей мере приблизительно в 160 раз, по меньшей мере приблизительно в 170 раз, по меньшей мере приблизительно в 180 раз, по меньшей мере приблизительно в 190 раз, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, по меньшей мере приблизительно в 210 раз, по меньшей мере приблизительно в 220 раз, по меньшей мере приблизительно в 230 раз, по меньшей мере приблизительно в 240 раз, по меньшей мере приблизительно в 250 раз, по меньшей мере приблизительно в 260 раз, по меньшей мере приблизительно в 270 раз большее количество каркаса X (*например*, полипептида PTGFRN) по сравнению с встречающейся в природе ВВ (*например*, экзосомой).

[0476] Количество каркасных фрагментов, например, каркаса X, такого как полипептид PTGFRN, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700, по меньшей мере приблизительно 800, по меньшей мере приблизительно 900, по меньшей мере приблизительно 1000, по меньшей мере приблизительно 1100, по меньшей мере приблизительно 1200, по меньшей мере приблизительно 1300, по меньшей мере приблизительно 1400, по меньшей мере приблизительно 1500, по меньшей мере приблизительно 1600, по меньшей мере приблизительно 1700, по меньшей мере приблизительно 1800, по меньшей мере приблизительно 1900, по меньшей мере приблизительно 2000, по меньшей мере приблизительно 2100, по меньшей мере приблизительно 2200, по меньшей мере приблизительно 2300, по меньшей мере приблизительно 2400, по меньшей мере приблизительно 2500, по меньшей мере приблизительно 2600, по меньшей мере приблизительно 2700, по меньшей мере приблизительно 2800, по меньшей мере приблизительно 2900, по меньшей мере приблизительно 3000, по меньшей мере приблизительно 4000, по меньшей мере приблизительно 5000, по меньшей мере приблизительно 6000, по меньшей мере приблизительно 7000, по меньшей мере приблизительно 8000, по меньшей мере приблизительно 9000 или по меньшей мере приблизительно 10000.

[0477] В некоторых аспектах количество каркасных фрагментов, например каркаса X, такого как полипептид PTGFRN, на ВВ, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет от приблизительно 100 до приблизительно 100000, от приблизительно 200 до приблизительно 9000, от приблизительно 300 до приблизительно 9000, от приблизительно 400 до приблизительно 9000, от приблизительно 500 до приблизительно 9000, от приблизительно 600 до приблизительно 8000, от приблизительно

800 до приблизительно 8000, от приблизительно 900 до приблизительно 8000, от приблизительно 1000 до приблизительно 8000, от приблизительно 1100 до приблизительно 8000, от приблизительно 1200 до приблизительно 8000, от приблизительно 1300 до приблизительно 8000, от приблизительно 1400 до приблизительно 8000, от приблизительно 1500 до приблизительно 8000, от приблизительно 1600 до приблизительно 8000, от приблизительно 1700 до приблизительно 8000, от приблизительно 1800 до приблизительно 8000, от приблизительно 1900 до приблизительно 8000, от приблизительно 2000 до приблизительно 8000, от приблизительно 2100 до приблизительно 8000, от приблизительно 2200 до приблизительно 8000, от приблизительно 2300 до приблизительно 8000, от приблизительно 2400 до приблизительно 8000, от приблизительно 2500 до приблизительно 8000, от приблизительно 2600, от приблизительно 2700 до приблизительно 8000, от приблизительно 2800 до приблизительно 8000, от приблизительно 2900 до приблизительно 8000, от приблизительно 3000 до приблизительно 8000, от приблизительно 4000 до приблизительно 8000, от приблизительно 5000 до приблизительно 8000, от приблизительно 6000 до приблизительно 8000, от приблизительно 7000 до приблизительно 8000, от приблизительно 8000, от приблизительно 7000 до приблизительно 9000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 10000.

[0478] В некоторых аспектах количество каркасных фрагментов, например, каркаса X, такого как полипептид PTGFRN, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от приблизительно 5000 до приблизительно 8000, *например*, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000 или приблизительно 8000. В некоторых аспектах количество каркасных фрагментов, например, каркаса X, такого как полипептид PTGFRN, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от приблизительно 6000 до приблизительно 8000, *например*, приблизительно 6000, приблизительно 7000 или приблизительно 8000. В некоторых аспектах количество каркасных фрагментов, например, каркаса X, такого как полипептид PTGFRN, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от приблизительно 4000 до приблизительно 9000, *например*, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000, приблизительно 8000 или приблизительно 9000.

II.G.2 Просветные каркасные фрагменты (например, каркас Y)

[0479] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению содержат внутреннее пространство (*т.е.* просвет), которое отличается от такового у встречающихся в природе ВВ, *например*, экзосом. Например, ВВ, *например*, экзосома

может быть изменена таким образом, что композиция на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы, имеет содержание белка, липидов или гликанов, отличное от такового у встречающихся в природе ВВ, *например*, экзосом.

[0480] В некоторых аспектах сконструированные ВВ, например, экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей каркасный фрагмент (*например*, белки экзосомы, *например*, каркас Y) или модификацию или фрагмент фрагмента каркаса, который изменяет состав или содержимое просветной поверхности экзосомы. Различные модификации или фрагменты белка ВВ, *например*, экзосомы, которые могут экспрессироваться на просветной поверхности ВВ, например, экзосомы, могут быть использованы для аспектов настоящего изобретения.

[0481] В некоторых аспектах белки ВВ, например, экзосомы, которые могут изменять просветную поверхность ВВ, например, экзосомы, включают, но не ограничиваясь ими, белок MARCKS, белок MARCKSL1, белок BASP1 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит растворимый в кислоте белок головного мозга 1 (белок BASP1). Белок BASP1 также известен как кислотный белок с массой 22 кДа, обогащенный в нервной ткани, или белок нейрональной аксональной мембраны NAP-22. Полноразмерная последовательность белка BASP1 человека (изомер 1) представлена в **Табл. 3**. В изомере, полученном альтернативным сплайсингом, отсутствуют аминокислоты с 88 по 141 из белка BASP1 в **Табл. 3** (изомер 1).

ТАБЛИЦА 3. Иллюстративные последовательности каркасных белков

Белок	Последовательность
Белок BASP1 (SEQ ID NO: 10)	MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAATEEEGTPKESEPQAA AEPAE AKEGKEKPDQDAEGKAEKEGEKDAAAAKEEAPKAEPEKTEGAAEA KAEP PKAPEQEQAAPGPAAGGEAPKAAEAAAAPAESAAPAGEEPSKEEGE PKK TEAPAAPAAQETKSDGAPASDSKPGSSEAAPSSKETPAATEAPSSTPK AQ GPAASAEERPVEAPAAANSQTVTVKE

Белок MARCKSL 1 (SEQ ID NO: 9)	MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGDLSPKGEG ESPP VNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAEAKGEVPPKETPKKKKKFSFKKP FKL SGLSFKRNRKEGGGDSSASSPTEEEQEQQGEIGACSDGTAQEGKAAAT PE SQEPQAKGAEASAASEEEEAGPQATEPSTPSGPESGPTPASAEQNE
Белок MARCKS (SEQ ID NO: 8)	MGAQFSKTAA KGEAAAERPG EAAVASSPSK ANGQENGHVK VNGDASPA ESGAKEELQA NGSAPAADKE EPAAAGSGAA SPSAAEKGEP AAAAAPEAGA SPVEKEAPAE GEAAEPGSPT AAEGEAASAA SSTSSPKAED GATPSNET PKKKKKRFSF KKSFKLSGFS FKKNKKEAGE GGEAEAPAAE GGKDEAAGGA AAAAAEAGAA SGEQAAAPGE EAAAGEEGAA GGDPQEAKPQ EAAVAPEKPP ASDETKAAEE PSKVEEKKA EAGASAAACE APSAAGPGAP PEQEAPAE PAAAAASSAC AAPSQEAQPE CSPEAPPAEA AE

[0482] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит белок, выбранный из группы, состоящей из MARCKS, MARKSL1, BASP1, любого их функционального фрагмента, варианта или производного или любой их комбинации. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит белок Src или его фрагмент. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит последовательность, раскрытую, *например*, в патенте США № 9611481.

[0483] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, по настоящему изобретению содержит белок MARCKS или его фрагмент, вариант или производное. Белок MARCKS (номер доступа в Uniprot P29966) также известен как субстрат протеинкиназы C, белок с молекулярной массой 80 кДа, легкая цепь. Полноразмерный белок MARCKS человека имеет длину 332 аминокислоты и содержит

кальмодулин-связывающий домен в аминокислотных остатках 152-176. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению содержит зрелый белок MARCKS (т.е., без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению происходит из зрелого белка MARCKS, т.е. он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка MARCKS, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке.

[0484] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению содержит белок MARCKSL1 (номер доступа в Uniprot P49006), также известный как MARCKS-подобный белок 1, и субстрат макрофагальной миристоилированной богатой аланином С-киназы. Полноразмерный белок MARCKSL1 человека имеет длину 195 аминокислот. Белок MARCKSL1 имеет эффекторный домен, участвующий в связывании липидов и кальмодулина в аминокислотных остатках 87-110. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению содержит зрелый белок MARCKSL1 (т.е., без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению происходит из зрелого белка MARCKSL1, т.е. он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка MARCKSL1, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке.

[0485] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению содержит белок BASP1 (номер доступа в Uniprot P80723), также известный как кислый белок, обогащенный в нервной ткани, с молекулярной массой 22 кДа, или белок нейрональной аксональной мембраны NAP-22. Полноразмерная последовательность человеческого белка BASP1 (изомер 1) имеет длину 227 аминокислот. В изомере, полученном альтернативным сплайсингом, отсутствуют аминокислоты с 88 по 141 из изомера 1. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению содержит зрелый белок BASP1 (т.е. без N-концевого метионина). В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y по настоящему изобретению происходит из зрелого белка BASP1, т.е. он является фрагментом, вариантом или производным зрелого белка BASP1, и, следовательно, в нем отсутствует N-концевой метионин, присутствующий в незрелом белке. В последовательности зрелого белка BASP1 отсутствует первый Met из SEQ ID NO: 10 и, таким образом, он содержит аминокислоты с 2 по 227 SEQ ID NO: 10.

[0486] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность на по

меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно примерно на 100% идентичную аминокислотам с 2 по 227 SEQ ID NO: 10, т.е. зрелой форме BASP1 (т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 10). В других аспектах каркасный фрагмент, например, белок каркаса X, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную функциональному фрагменту зрелой формы SEQ ID NO : 10 (BASP1), т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 10. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 10.

[0487] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по

меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную зрелой форме SEQ ID NO: 9 (MARCKSL1), т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 9. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или примерно на 100% идентичен функциональному фрагменту зрелой формы SEQ ID NO: 9 (MARCKSL1), т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 9. В других аспектах каркасный фрагмент, например, фрагмент Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 9.

[0488] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную зрелой форме SEQ ID NO: 8 (MARCKS), т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 8. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно

75 %, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или примерно на 100% идентичен функциональному фрагменту зрелой формы SEQ ID NO: 8 (MARCKS), т.е. без N-концевой аминокислоты метионина, присутствующей в SEQ ID NO: 8. В других аспектах каркасный фрагмент, например, фрагмент Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 8.

[0489] В определенных аспектах белковая последовательность любой из SEQ ID NO: 1-109, раскрытых в PCT/US2018/061679, достаточна для того, чтобы быть каркасом Y для настоящего раскрытия (*например*, каркасный фрагмент, связанный с линкером).

[0490] В определенных аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит пептид с MGXKLSKKK (SEQ ID NO: 224) или GXKLSKKK (SEQ ID NO: 225), при этом X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту. В некоторых аспектах BB (*например*, экзосома) содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+) или (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В дополнительных аспектах BB (*например*, экзосома), описанная в данном

документе (*например*, сконструированная экзосома), содержит пептид с последовательностью (M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+) или (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). См. Aasland et al., FEBS Letters 513 (2002) 141-144 касательно номенклатуры аминокислот.

[0491] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 75%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 85%, на по меньшей мере приблизительно 90%, на по меньшей мере приблизительно 95%, на по меньшей мере приблизительно 96%, на по меньшей мере приблизительно 97%, на по меньшей мере приблизительно 98%, на по меньшей мере приблизительно 99% или на приблизительно 100% идентичную любой из последовательностей, раскрытых в US 10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г.

[0492] Каркас Y-сконструированные экзосомы, описанные в данном документе, могут быть получены из клетки, трансформированной любой последовательностью, представленной в PCT/US2018/061679 (SEQ ID NO: 4-109 из PCT/US2018/061679).

[0493] В других аспектах ВВ, например экзосомы по настоящему изобретению содержат большее количество белков каркаса Y сравнению с встречающимися в природе ВВ, *например*, экзосомами. В некоторых аспектах, ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 30 раз, по меньшей мере приблизительно в 40 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз, по меньшей мере приблизительно в 60 раз, по меньшей мере приблизительно в 70 раз, по меньшей мере приблизительно в 80 раз, по меньшей мере приблизительно в 90 раз, по меньшей мере приблизительно в 100 раз, по меньшей мере приблизительно в 110 раз, по меньшей мере приблизительно в 120 раз, по меньшей мере приблизительно в 130 раз, по меньшей мере приблизительно в 140 раз, по меньшей мере приблизительно в 150 раз, по меньшей мере приблизительно в 160 раз, по меньшей мере приблизительно в 170 раз, по меньшей мере приблизительно в 180 раз, по меньшей мере приблизительно в 190 раз, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, по меньшей мере

приблизительно в 210 раз, по меньшей мере приблизительно в 220 раз, по меньшей мере приблизительно в 230 раз, по меньшей мере приблизительно в 240 раз, по меньшей мере приблизительно в 250 раз, по меньшей мере приблизительно в 260 раз, по меньшей мере приблизительно в 270 раз большее количество каркаса Y (*например*, полипептида BASP-1) по сравнению с встречающейся в природе BB, *например*, экзосомой. Количество каркаса X, *например*, полипептида BASP-1, на BB, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 500, по меньшей мере приблизительно 600, по меньшей мере приблизительно 700, по меньшей мере приблизительно 800, по меньшей мере приблизительно 900, по меньшей мере приблизительно 1000, по меньшей мере приблизительно 1100, по меньшей мере приблизительно 1200, по меньшей мере приблизительно 1300, по меньшей мере приблизительно 1400, по меньшей мере приблизительно 1500, по меньшей мере приблизительно 1600, по меньшей мере приблизительно 1700, по меньшей мере приблизительно 1800, по меньшей мере приблизительно 1900, по меньшей мере приблизительно 2000, по меньшей мере приблизительно 2100, по меньшей мере приблизительно 2200, по меньшей мере приблизительно 2300, по меньшей мере приблизительно 2400, по меньшей мере приблизительно 2500, по меньшей мере приблизительно 2600, по меньшей мере приблизительно 2700, по меньшей мере приблизительно 2800, по меньшей мере приблизительно 2900, по меньшей мере приблизительно 3000, по меньшей мере приблизительно 4000, по меньшей мере приблизительно 5000, по меньшей мере приблизительно 6000, по меньшей мере приблизительно 7000, по меньшей мере приблизительно 8000, по меньшей мере приблизительно 9000 или по меньшей мере приблизительно 10000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет от приблизительно 100 до приблизительно 100000, от приблизительно 200 до приблизительно 9000, от приблизительно 300 до приблизительно 9000, от приблизительно 400 до приблизительно 9000, от приблизительно 500 до приблизительно 9000, от приблизительно 600 до приблизительно 8000, от приблизительно 800 до приблизительно 8000, от приблизительно 900 до приблизительно 8000, от приблизительно 1000 до приблизительно 8000, от приблизительно 1100 до приблизительно 8000, от приблизительно 1200 до приблизительно 8000, от приблизительно 1300 до приблизительно 8000, от приблизительно 1400 до приблизительно 8000, от приблизительно 1500 до приблизительно 8000, от приблизительно 1600 до приблизительно 8000, от приблизительно 1700 до

приблизительно 8000, от приблизительно 1800 до приблизительно 8000, от приблизительно 1900 до приблизительно 8000, от приблизительно 2000 до приблизительно 8000, от приблизительно 2100 до приблизительно 8000, от приблизительно 2200 до приблизительно 8000, от приблизительно 2300 до приблизительно 8000, от приблизительно 2400 до приблизительно 8000, от приблизительно 2500 до приблизительно 8000, от приблизительно 2600, от приблизительно 2700 до приблизительно 8000, от приблизительно 2800 до приблизительно 8000, от приблизительно 2900 до приблизительно 8000, от приблизительно 3000 до приблизительно 8000, от приблизительно 4000 до приблизительно 8000, от приблизительно 5000 до приблизительно 8000, от приблизительно 6000 до приблизительно 8000, от приблизительно 7000 до приблизительно 8000, от приблизительно 8000, от приблизительно 7000 до приблизительно 9000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 10000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет от приблизительно 5000 до приблизительно 8000, *например*, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000 или приблизительно 8000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет от приблизительно 6000 до приблизительно 8000, *например*, приблизительно 6000, приблизительно 7000 или приблизительно 8000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB, *например*, экзосоме по настоящему изобретению составляет от приблизительно 4000 до приблизительно 9000, *например*, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000, приблизительно 8000 или приблизительно 9000.

[0494] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен» (ED), при этом ND и/или ED ассоциированы с просветной поверхностью BB, например, экзосомы. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен; при этом внутриклеточный домен содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен» (ED); при этом ND и/или ED связаны с просветной поверхностью BB, например, экзосомой. В контексте настоящего документа термин «ассоциированный с» относится к взаимодействию между каркасным белком по настоящему раскрытию с просветной поверхностью BB, например экзосомы, которое не включает ковалентное связывание с компонентом мембраны. Например, каркасные фрагменты, применимые для настоящего изобретения, могут быть

ассоциированы с просветной поверхностью ВВ, например посредством липида (например, миристиновой кислоты) и/или многоосновного домена, который электростатически взаимодействует с отрицательно заряженной головкой фосфолипидов мембраны. В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с просветной поверхностью ВВ, а ED ассоциирован с просветной поверхностью ВВ посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или по меньшей мере семь смежных основных аминокислот, например, лизинов (Lys) подряд.

[0495] В других аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с просветной поверхностью ВВ, а ED ассоциирован с просветной поверхностью ВВ посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или по меньшей мере семь смежных лизинов (Lys) подряд.

[0496] В других аспектах ED дополнительно содержит одну или несколько областей низкой сложности, например, мотив PEST. Последовательность PEST представляет собой пептидную последовательность, которая богата пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T). В некоторых аспектах ED дополнительно содержит отрицательно заряженные остатки (например, Glu) и множество Ser и Thr, которые претерпевают временное фосфорилирование (таким образом, оба добавляют отрицательные заряды к областям вне ED).

[0497] В некоторых аспектах ND ассоциирован с просветной поверхностью ВВ, например, экзосомы, посредством липидирования, например, посредством миристоилирования. В некоторых аспектах ND имеет Gly на N-конце. В некоторых аспектах N-концевой Gly является миристоилированным.

[0498] В некоторых аспектах ED ассоциирован с просветной поверхностью ВВ, например, экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых аспектах ED ассоциирован с просветной поверхностью ВВ, например, экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатического взаимодействия.

[0499] В некоторых аспектах ED содержит (i) основную аминокислоту (например лизин) или (ii) две или более основных аминокислот (например лизин) рядом друг с другом в полипептидной последовательности. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой лизин (Lys; K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H). В некоторых

аспектах основная аминокислота представляет собой (Lys) n , при этом n представляет собой целое число от 1 до 10.

[0500] В некоторых аспектах ED содержит (i) лизиновый повтор в ED или (ii) лизиновый повтор в ND, например, K на C-конце в ND и K на N-конце в ED, при этом ND и ED связаны непосредственно, т.е. пептидной связью. В некоторых аспектах минимальное количество аминокислот, которые способны связывать гетерологичный фрагмент, например, биологически активную молекулу, в просвете BB, например, экзосомы, составляет, например, от приблизительно семи до приблизительно 15, от приблизительно семи до приблизительно 14, от приблизительно семи до приблизительно 13, от приблизительно семи до приблизительно 12, от приблизительно семи до приблизительно 11, от приблизительно семи до приблизительно 10, от приблизительно семи до приблизительно 9 или от приблизительно семи до приблизительно 8 аминокислотных фрагментов.

[0501] В других аспектах ED содержит по меньшей мере лизин, а ND содержит лизин на C-конце, если N-конец ED напрямую связан с лизином на C-конце ND, т.е., лизин находится на N-конце ED и слит с лизином на C-конце ND. В других аспектах ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов, когда N-конец ED связан с C-концом ND посредством линкера, например одной или нескольких аминокислот. В некоторых аспектах ED содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд.

[0502] В некоторых аспектах ED содержит K, KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), R, RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; при этом «:» представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; и где X6 представляет собой основную аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислоту X6 выбирают из группы, состоящей из Lys, Arg и His. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах X4 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met.

[0503] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; при этом «:» представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; при этом X6 представляет собой основную аминокислоту, и при этом ED связан с X6 с помощью пептидной связи и содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED.

[0504] В некоторых аспектах ND каркасного фрагмента, например, каркаса Y, содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; «:» представляет собой пептидную связь; X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X3 представляет собой любую аминокислоту; X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met; X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

[0505] В некоторых аспектах аминокислоту X3 выбирают из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0506] В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер содержит одну или несколько аминокислот. В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (например, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, например, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкера могут быть связаны в тандеме. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предупреждают/ослабляют стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно в некоторых аспектах линкер может содержать один или несколько сайтов, расщепляемых протеазой, которые могут располагаться внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности. Когда ND и ED соединены линкером, ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов. Линкеры, которые можно использовать для соединения ND и ED, раскрыты в другом месте настоящего описания.

[0507] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере приблизительно два, по меньшей мере приблизительно три, по меньшей мере приблизительно четыре, по

меньшей мере приблизительно пять, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 55, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 65, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 95 или по меньшей мере приблизительно 100 аминокислот.

[0508] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$ (SEQ ID NO: 46), при этом n представляет собой любое целое число от 1 до 100, а m представляет собой любое целое число от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$ (SEQ ID NO: 47), при этом x представляет собой целое число от 1 до 4, y представляет собой 0 или 1, а z представляет собой целое число от 1 до 50. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность Gn (SEQ ID NO: 48), при этом n может представлять собой целое число от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$ (SEQ ID NO: 49), при этом n представляет собой целое число от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$ (SEQ ID NO: 50), при этом n может представлять собой целое число от 1 до 100.

[0509] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер содержит пептиды (или полипептиды) (например, природные или не встречающиеся в природе пептиды), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не связан в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция).

[0510] В других аспектах пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. В других аспектах пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе аминокислоты, встречающиеся в линейной последовательности,

которая не встречается в природе. В других аспектах пептидный линкер может содержать природную полипептидную последовательность.

[0511] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит ND—ED, при этом : ND содержит G: X2:X3:X4:X5:X6; при этом: G представляет собой Gly; «:» представляет собой пептидную связь; X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X3 представляет собой любую аминокислоту; X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Glu и Met; X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His; «—» представляет необязательный линкер; и ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), которые связаны с X6 пептидной связью или одной или несколькими аминокислотами, или (ii) по меньшей мере один лизин, который непосредственно связан с X6 пептидной связью.

[0512] В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают из группы, состоящей из Gly и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X3 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X4 представляет собой Leu или Glu. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбирают из группы, состоящей из Ser и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X2 представляет собой Gly, Ala или Ser; аминокислота X3 представляет собой Lys или Glu, аминокислота X4 представляет собой Leu, Phe, Ser или Glu, аминокислота X5 представляет собой Ser или Ala; и аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах «—» линкер содержит пептидную связь или одну или несколько аминокислот.

[0513] В некоторых аспектах ED в каркасном фрагменте содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 11), KKKKK (SEQ ID NO: 12), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 13); RRRRR (SEQ ID NO: 14), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 15), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 16) или любую их комбинацию.

[0514] В некоторых аспектах каркасный белок, например, каркас Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 17), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20) или (v) любой из комбинации.

[0515] В некоторых аспектах ND в каркасном фрагменте, например, каркасе Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 51), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 52), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 53),

(iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 54) и (v) любую их комбинацию; и ED в каркасном белке содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из K, KK, KKK, KKKG (SEQ ID NO: 55), KKKGY (SEQ ID NO: 56), KKKGYN (SEQ ID NO: 57), KKKGYNV (SEQ ID NO: 58), KKKGYNVN (SEQ ID NO: 59), KKKGYS (SEQ ID NO: 60), KKKGYG (SEQ ID NO: 61), KKKGYGG (SEQ ID NO: 62), KKKGS (SEQ ID NO: 63), KKKGSG (SEQ ID NO: 64), KKKGSGS (SEQ ID NO: 66), KKKS (SEQ ID NO: 67), KKKS G (SEQ ID NO: 68), KKKS GG (SEQ ID NO: 69), KKKS GGS (SEQ ID NO: 70), KKKS GGS G (SEQ ID NO: 71), KKS GGS GG (SEQ ID NO: 72), KKS GGS GGS (SEQ ID NO: 73), KRFSFKKS (SEQ ID NO: 241) и любую их комбинацию.

[0516] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркаса Y, применимая для настоящего изобретения, состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 21), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 18), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 19), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 20) или (v) любой их комбинации.

[0517] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29) и (ix) любой их комбинации.

[0518] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного фрагмента, например, фрагмента Y, применимые для настоящего изобретения, состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 22), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 23), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 24), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 25), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 26), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 27), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 28), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 29) и (ix) любой их комбинации. В некоторых аспектах каркасный белок по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два смежных лизина (Lys) подряд.

[0519] В некоторых аспектах длина каркасного фрагмента, например, каркаса Y, составляет по меньшей мере приблизительно 8, по меньшей мере приблизительно 9, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 11, по меньшей мере приблизительно 12, по меньшей мере приблизительно 13, по меньшей мере приблизительно 14, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 16, по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 19, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно

[illegible]

приблизительно 280, по меньшей мере приблизительно 285, по меньшей мере приблизительно 290, по меньшей мере приблизительно 295, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 305, по меньшей мере приблизительно 310, по меньшей мере приблизительно 315, по меньшей мере приблизительно 320, по меньшей мере приблизительно 325, по меньшей мере приблизительно 330, по меньшей мере приблизительно 335, по меньшей мере приблизительно 340, по меньшей мере приблизительно 345 или по меньшей мере приблизительно 350 аминокислот.

[0520] В некоторых аспектах длина каркасного белка, например, каркаса Y, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 20, от приблизительно 20 до приблизительно 30, от приблизительно 30 до приблизительно 40, от приблизительно 40 до приблизительно 50, от приблизительно 50 до приблизительно 60, от приблизительно 60 до приблизительно 70, от приблизительно 70 до приблизительно 80, от приблизительно 80 до приблизительно 90, от приблизительно 90 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 110, от приблизительно 110 до приблизительно 120, от приблизительно 120 до приблизительно 130, от приблизительно 130 до приблизительно 140, от приблизительно 140 до приблизительно 150, от приблизительно 150 до приблизительно 160, от приблизительно 160 до приблизительно 170, от приблизительно 170 до приблизительно 180, от приблизительно 180 до приблизительно 190, от приблизительно 190 до приблизительно 200, от приблизительно 200 до приблизительно 210, от приблизительно 210 до приблизительно 220, от приблизительно 220 до приблизительно 230, от приблизительно 230 до приблизительно 240, от приблизительно 240 до приблизительно 250, от приблизительно 250 до приблизительно 260, от приблизительно 260 до приблизительно 270, от приблизительно 270 до приблизительно 280, от приблизительно 280 до приблизительно 290, от приблизительно 290 до приблизительно 300, от приблизительно 300 до приблизительно 310, от приблизительно 310 до приблизительно 320, от приблизительно 320 до приблизительно 330, от приблизительно 330 до приблизительно 340 или от приблизительно 340 до приблизительно 250 аминокислот.

[0521] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix)

GGKLSKKS GGS GGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGS GGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

[0522] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного фрагмента, например, каркаса Y, применимого для настоящего изобретения, состоит из (i) GGKLSK K K K K GYNVN (SEQ ID NO: 32), (ii) GAKLSK K K K K GYNVN (SEQ ID NO: 33), (iii) GGKQSK K K K K GYNVN (SEQ ID NO: 34), (iv) GGKLAK K K K K GYNVN (SEQ ID NO: 35), (v) GGKLSK K K K K GYS GG (SEQ ID NO: 36), (vi) GGKLSK K K K K GSGGS (SEQ ID NO: 37), (vii) GGKLSK K K K K SGGSG (SEQ ID NO: 38), (viii) GGKLSK K K K SGGSGG (SEQ ID NO: 39), (ix) GGKLSKKS GGS GGS (SEQ ID NO: 40), (x) GGKLSKSGGS GGSV (SEQ ID NO: 41) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 42).

[0523] Неограничивающие примеры каркасных фрагментов, например, каркаса Y, применимых для настоящего изобретения, приведены ниже. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит аминокислотную последовательность, представленную в **Табл. 4**. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в **Табл. 4**.

ТАБЛИЦА 4. Иллюстративные каркасные фрагменты

SEQ ID NO:	Каркасный белок: GX2X3X4X5X6-ED
75	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD KKAEGAA
76	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD KKAEGA
77	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD KKAEG
78	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD KKA E
79	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD KKA
80	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD K K
81	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD K
82	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEKD
83	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKEK
84	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAKE
85	GGKLSK K K K K GYNVNDEKAK
86	GGKLSK K K K K GYNVNDEKA
87	GGKLSK K K K K GYNVNDEK
88	GGKLSK K K K K GYNVNDE
89	GGKLSK K K K K GYNVND
32	GGKLSK K K K K GYNVN

90	GGKLSKKKKGYNV
91	GGKLSKKKKGYN
92	GGKLSKKKKGY
93	GGKLSKKKKG
94	GGKLSKKKK
22	GGKLSKKK
17	GGKLSKK
95	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
96	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
97	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
98	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
99	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
100	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
101	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK
102	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSF
103	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFS
104	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGF
105	GAKKSKKRFSFKKSFKLSG
106	GAKKSKKRFSFKKSFKLS
107	GAKKSKKRFSFKKSFKL
108	GAKKSKKRFSFKKSFK
109	GAKKSKKRFSFKKSF
42	GAKKSKKRFSFKKS
110	GAKKSKKRFSFKK
111	GAKKSKKRFSFK
112	GAKKSKKRFSF
113	GAKKSKKRFS
114	GAKKSKKRF
115	GAKKSKKR
116	GAKKSKK
117	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
118	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
119	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
120	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK

121	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
122	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
123	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFK
124	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSF
125	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFS
126	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGF
127	GAKKAKKRFSFKKSFKLSG
128	GAKKAKKRFSFKKSFKLS
129	GAKKAKKRFSFKKSFKL
130	GAKKAKKRFSFKKSFK
131	GAKKAKKRFSFKKSF
132	GAKKAKKRFSFKKS
133	GAKKAKKRFSFKK
134	GAKKAKKRFSFK
135	GAKKAKKRFSF
136	GAKKAKKRFS
137	GAKKAKKRF
138	GAKKAKKR
139	GAKKAKK
140	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
141	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK
142	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSF
143	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFS
144	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGF
145	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSG
146	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLS
147	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKL
148	GAQESKKKKKKRFSFKKSFK
149	GAQESKKKKKKRFSFKKSF
150	GAQESKKKKKKRFSFKKS
151	GAQESKKKKKKRFSFKK
152	GAQESKKKKKKRFSFK
153	GAQESKKKKKKRFSF
154	GAQESKKKKKKRFS

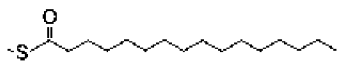
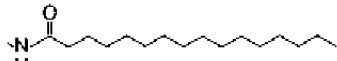
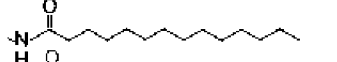
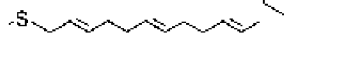
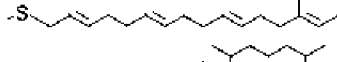
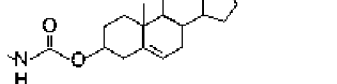
155	GAQESKKKKKKRF
156	GAQESKKKKKKR
157	GAQESKKKKKK
158	GAQESKKKKK
159	GAQESKKKK
160	GAQESKKK
161	GAQESKK
162	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK
163	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNR
164	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRN
165	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKR
166	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFK
167	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLSF
168	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGLS
169	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSGL
170	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLSG
171	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKLS
172	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFKL
173	GSQSSKKKKKKKFSFKKPFK
174	GSQSSKKKKKKKFSFKKPF
175	GSQSSKKKKKKKFSFKKP
176	GSQSSKKKKKKKFSFKK
177	GSQSSKKKKKKKFSFK
178	GSQSSKKKKKKKFSF
179	GSQSSKKKKKKKFS
180	GSQSSKKKKKKKF
181	GSQSSKKKKKKK
182	GSQSSKKKKK
183	GSQSSKKKK
184	GSQSSKKK
185	GSQSSKK

[0524] В некоторых аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, применимый для настоящего изобретения, не содержит N-концевого Met. В некоторых

аспектах каркасный фрагмент, например, каркас Y, содержит липидированную аминокислоту, *например*, миристоилированную аминокислоту, на N-конце каркасного белка, который функционирует как липид. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly. Присутствие N-концевого Gly является абсолютным требованием для N-миристоилирования. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина, *например* аллилглицин, бутилглицин или пропаргилглицин.

[0525] В других аспектах липидн может представлять собой любой липид, известный из уровня техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В необычных обстоятельствах, *например*, при использовании культуральной среды, в которой количество миристиновой кислоты ограничено, к N-концевому глицину могут быть присоединены некоторые другие жирные кислоты, включая короткоцепочечные и ненасыщенные. Например, в каналах ВК миристан, как сообщалось, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи. Мембранные фрагменты, которые могут действовать как каркасный фрагмент, известные из уровня техники, представлены в следующей таблице.

Таблица 5: Группы модификации

Модификация	Группы модификации
S-пальмитоилирование	
N-пальмитоилирование	
N-миристилирование	
O-ацилирование	
Фарнесилирование	
Геранилгеранилирование	
Холестерол	

II.G.3 Слитые конструкции каркасных белков

[0526] В некоторых аспектах каркасный фрагмент связан с одним или несколькими гетерологичными белками. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с N-концом каркасных фрагментов. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых аспектах один или несколько гетерологичных белков связаны как с N-концом, так и с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок млекопитающего. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок человека.

[0527] В некоторых аспектах каркасный фрагмент можно использовать для связывания любого фрагмента с просветной поверхностью и/или внешней поверхностью экзосомы. Например, полипептид PTGFRN можно использовать для связывания биологически активной молекулы внутри просвета (*например*, на просветной поверхности) в дополнение к внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Следовательно, в определенных аспектах, каркасный фрагмент может использоваться для двойных целей, *например*, для создания биологически активной молекулы на просветной поверхности и второй биологически активной молекулы или другой полезной нагрузки на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы или биологически активной молекулы на внешней поверхности экзосомы, и второй биологически активной молекулы или другой полезной нагрузки на просветной поверхности ВВ, *например*, экзосомы.

II.G.4 Липид

[0528] Подходящие каркасные фрагменты, способные связывать биологически активную молекулу с поверхностью ВВ, *например*, экзосомы, посредством химического связывания с малеимидным фрагментом, включают, *например*, стеролы (*например*, холестерин), фосфолипиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или жирорастворимые витамины, как подробно описано ниже.

[0529] В некоторых аспектах каркасный фрагмент может представлять собой липид. Липидный каркасный фрагмент может представлять собой любой липид, известный из уровня техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В некоторых аспектах липид представляет собой жирную кислоту, фосфатид, фосфолипид (*например*, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин) или их аналог (*например*, фосфатидилхолин, лецитин, фосфатидилэтаноламин, цефалин или их части, *например*, его частично гидролизованную часть).

[0530] Каркасный фрагмент может быть связан, например, химически, с биологически активной молекулой с использованием малеимидной части. Такое связывание может быть прямым или непрямым посредством линкера или комбинации линкеров в любом химически возможном месте, например, на 5'- и/или 3'-конце нуклеотидной последовательности, например, биологически активной молекулы (например, ASO). В одном аспекте каркасный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента только с 3'-концом биологически активной молекулы. В одном аспекте каркасный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, только с 5'-концом нуклеотидной последовательности, например, биологически активной молекулы (например, ASO). В одном аспекте каркасный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента, в месте, которое не является 3'-концом или 5'-концом нуклеотидной последовательности, например, биологически активной молекулы (например, ASO).

[0531] В некоторых аспектах биологически активная молекула может быть связана, например, химически связана посредством малеимидного фрагмента, прямо или косвенно посредством линкера, например, с любым из липидов, описанных выше (например, пальмитиновой кислотой, миристиновой кислотой, жирной кислотой, фарнезилрм, геранил-геранилом или холестеринном). В некоторых аспектах каркасный фрагмент может содержать два или более типов каркасных фрагментов, раскрываемых в данном документе. Например, в некоторых аспектах каркасный фрагмент может содержать два липида, например, фосфолипид и жирную кислоту, или два фосфолипиды, или две жирные кислоты, или липид и витамин, или холестерин и витамин и т.д., которые совместно имеют 6-80 атомов углерода (т.е. эквивалентное число атомов углерода (ECN) от приблизительно 6 до приблизительно 80).

[0532] В некоторых аспектах комбинация каркасных фрагментов, например, комбинация липидов (например, жирных кислот) имеет ECN от приблизительно 6 до приблизительно 80, от приблизительно 8 до приблизительно 80, от приблизительно 10 до приблизительно 80, от приблизительно 12 до приблизительно 80, от приблизительно 14 до приблизительно 80, от приблизительно 16 до приблизительно 80, от приблизительно 18 до приблизительно 80, от приблизительно 20 до приблизительно 80, от приблизительно 22 до приблизительно 80, от приблизительно 24 до приблизительно 80, от приблизительно 26 до приблизительно 80, от приблизительно 28 до приблизительно 80, от приблизительно 30 до приблизительно 80, от приблизительно 4 до приблизительно 76, от приблизительно 6 до приблизительно 76, от приблизительно 8 до приблизительно 76, от приблизительно 10 до

[illegible]

[illegible]

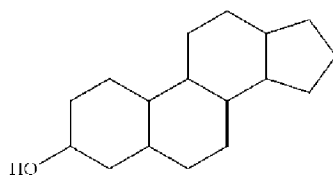
приблизительно 32, от приблизительно 28 до приблизительно 32 или от приблизительно 30 до приблизительно 32.

II.G.3.a Холестерин и другие стеролы

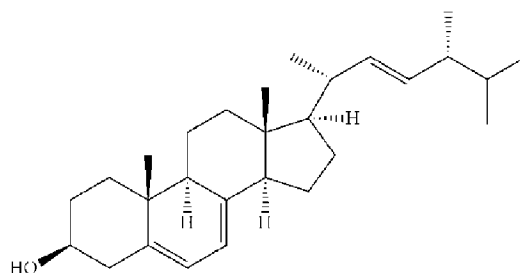
[0533] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит стерол, стероид, гопаноид, гидроксистероид, секостероид или их аналог с липофильными свойствами. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит стерол, такой как фитостерин, микостерин или зоостерин. Иллюстративные зоостерины включают холестерин и 24S-гидроксистерин; иллюстративные фитостерины включают эргостерин (микостерин), кампестерин, ситостерин и стигмастерин. В некоторых аспектах стерол выбран из эргостерина, 7-дегидрохолестерина, холестерина, 24S-гидроксистерина, ланостерина, циклоартенола, фукостерола, сарингостерина, кампестерина, β -ситостерина, ситостанола, копростанола, авенастерола или стигмастерола. Стерины могут встречаться в виде свободных стеринов, ацилированных (сложные эфиры стеролов), алкилированных (стерилалкиловые эфиры), сульфатированных (сульфат стерола) или связанных с гликозидным фрагментом (стерилгликозиды), который сам по себе может быть ацилирован (ацилированные стерингликозиды).

[0534] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит стероид. В некоторых аспектах стероид выбран из дигидротестостерона, уваола, гецигенина, диосгенина, прогестерона или кортизола.

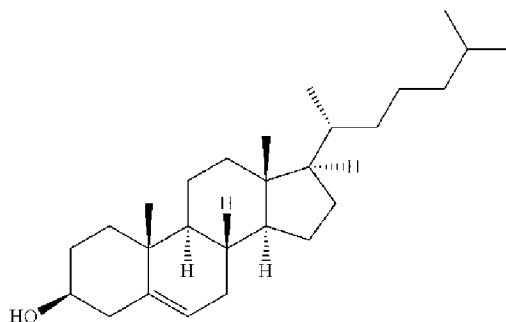
[0535] Например, стерины можно конъюгировать с биологически активной молекулой непосредственно или посредством линкерной комбинации в доступной группе —ОН стерола. Иллюстративные стерины имеют общий скелет, показанный ниже:



[0536] В качестве дополнительно примера: эргостерин имеет следующую структуру:



[0537] Холестерин имеет следующую структуру:



[0538] Соответственно, в некоторых аспектах свободная группа —ОН стерола или стероида используется для конъюгирования биологически активной молекулы, например, ASO, непосредственно или посредством комбинации линкеров, со стеролом (например, холестерином) или стероидом.

II.G.3.b Жирные кислоты

[0539] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту с короткой, средней или длинной цепью. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой ненасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой мононенасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой полиненасыщенную жирную кислоту, такую как ω -3 (омега-3) или ω -6 (омега-6) жирная кислота.

[0540] В некоторых аспектах липид, например, жирная кислота, имеет цепь C₂-C₆₀. В некоторых аспектах липид, например, жирная кислота, имеет цепь C₂-C₂₈. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₂-C₄₀. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₂-C₁₂ или C₄-C₁₂. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₄-C₄₀. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₄-C₄₀, C₂-C₃₈, C₂-C₃₆, C₂-C₃₄, C₂-C₃₂, C₂-C₃₀, C₄-C₃₀, C₂-C₂₈, C₄-C₂₈, C₂-C₂₆, C₄-C₂₆, C₂-C₂₄, C₄-C₂₄, C₆-C₂₄, C₈-C₂₄, C₁₀-C₂₄, C₂-C₂₂, C₄-C₂₂, C₆-C₂₂, C₈-C₂₂, C₁₀-C₂₂, C₂-C₂₀, C₄-C₂₀, C₆-C₂₀, C₈-C₂₀, C₁₀-C₂₀, C₂-C₁₈, C₄-C₁₈, C₆-C₁₈, C₈-C₁₈, C₁₀-C₁₈, C₁₂-C₁₈, C₁₄-C₁₈, C₁₆-C₁₈, C₂-C₁₆, C₄-C₁₆, C₆-C₁₆, C₈-C₁₆, C₁₀-C₁₆, C₁₂-C₁₆, C₁₄-C₁₆, C₂-C₁₅, C₄-C₁₅, C₆-C₁₅, C₈-C₁₅, C₉-C₁₅, C₁₀-C₁₅, C₁₁-C₁₅, C₁₂-C₁₅, C₁₃-C₁₅, C₂-C₁₄, C₄-C₁₄, C₆-C₁₄, C₈-C₁₄, C₉-C₁₄, C₁₀-C₁₄, C₁₁-C₁₄, C₁₂-C₁₄, C₂-C₁₃, C₄-C₁₃, C₆-C₁₃, C₇-C₁₃, C₈-C₁₃, C₉-C₁₃, C₁₀-C₁₃, C₁₁-C₁₃, C₂-C₁₂, C₄-C₁₂, C₆-C₁₂, C₇-C₁₂, C₈-C₁₂, C₉-C₁₂, C₁₀-C₁₂, C₂-C₁₁, C₄-C₁₁, C₆-C₁₁, C₇-C₁₁, C₈-C₁₁, C₉-C₁₁, C₂-C₁₀, C₄-C₁₀, C₂-C₉, C₄-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₄-C₇, C₂-C₆ или C₄-C₆. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃,

C₃₄, C₃₅, C₃₆, C₃₇, C₃₈, C₃₉, C₄₀, C₄₁, C₄₂, C₄₃, C₄₄, C₄₅, C₄₆, C₄₇, C₄₈, C₄₉, C₅₀, C₅₁, C₅₂, C₅₃, C₅₄, C₅₅, C₅₆, C₅₇, C₅₈, C₅₉ или C₆₀.

[0541] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит две жирные кислоты, каждая из которых независимо выбрана из жирной кислоты, имеющей цепь с любым из вышеуказанных диапазонов или числами атомов углерода. В некоторых аспектах одна из жирных кислот независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C₆-C₂₁, а другая независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C₁₂-C₃₆. В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо имеет цепь из приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17 или приблизительно 18 атомов углерода.

[0542] Подходящие жирные кислоты включают насыщенные жирные кислоты с прямой цепью, насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью, ненасыщенные жирные кислоты, гидроксигирные кислоты и поликарбоновые кислоты. В некоторых аспектах такие жирные кислоты содержат до приблизительно 32 атомов углерода.

[0543] Примеры применимых насыщенных жирных кислот с прямой цепью включают кислоты, которые имеют четное число атомов углерода, такие как масляная кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, каприновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, арахидовая кислота, бегеновая кислота, лигноцериновая кислота, гексакозановая кислота, октакозановая кислота, триаконтановая кислота и н-дотриаконтановая кислота, и кислоты, которые имеют нечетное число атомов углерода, такие как пропионовая кислота, н-валериановая кислота, энантовая кислота, пеларгоновая кислота, хендекановая кислота, тридекановая кислота, пентадекановая кислота, гептадекановая кислота, нонадекановая кислота, генейкозановая кислота, трикозановая кислота, пентакозановая кислота и гептакозановая кислота.

[0544] Примеры подходящих насыщенных разветвленных жирных кислот включают изомасляную кислоту, изокапроновую кислоту, изокаприловую кислоту, изокаприновую кислоту, изолауриновую кислоту, 11-метилдодекановую кислоту, изомиристиновую кислоту, 13-метил-тетрадекановую кислоту, изопальмитиновую кислоту, 15-метил-гексадекановую кислоту, изостеариновую кислоту, 17-метилоктадекановую кислоту, изоараховую кислоту, 19-метил-эйкозановую кислоту, α -этилгексановую кислоту, α -гексилдекановую кислоту, α -гептилундекановую кислоту, 2-децилтетрадекановую кислоту, 2-ундецилтетрадекановую кислоту, 2-децилпеновую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту и кислоту Fine Oxocol 1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.). Подходящие насыщенные жирные кислоты с разветвленной

цепью с нечетным числом атомов углерода включают антеизо-жирные кислоты, заканчивающиеся изобутильной группой, такие как 6-метилоктановая кислота, 8-метилдекановая кислота, 10-метилдодекановая кислота, 12-метил-тетрадекановая кислота, 14-метил-гексадекановая кислота, 16-метил-октадекановая кислота, 18-метил-эйкозановая кислота, 20-метил-докозановая кислота, 22-метил-тетракозановая кислота, 24-метил-гексакозановая кислота и 26-метилоктакозановая кислота.

[0545] Примеры подходящих ненасыщенных жирных кислот включают 4-деценовую кислоту, капролеиновую кислоту, 4-додеценовую кислоту, 5-додеценовую кислоту, лауролеевую кислоту, 4-тетрадеценовую кислоту, 5-тетрадеценовую кислоту, 9-тетрадеценовую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, 6-октадеценовую кислоту, олеиновую кислоту, 9-октадеценовую кислоту, 11-октадеценовую кислоту, 9-эйкозеновую кислоту, цис-11-эйкозеновую кислоту, цетолеиновую кислоту, 13-докозеновую кислоту, 15-тетракозеновую кислоту, 17-гексакозеновую кислоту, 6,9,12,15-гексадекатетраеноую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, α -элеостеариновую кислоту, β -элеостеариновую кислоту, пуническую кислоту, 6,9,12,15-октадекатетраеновую кислоту, паринаровую кислоту, 5,8,11,14-эйкозатетраеновую кислоту, 5,8,11,14,17-эйкозапентаеновую кислоту, 7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту, 4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту и т.п.

[0546] Примеры подходящих гидроксилауриновых кислот включают α -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксимиристиновую кислоту, α -гидроксипальмитиновую кислоту, α -гидроксистеариновую кислоту, ω -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксиарахиновую кислоту, 9-гидрокси-12-октадеценовую кислоту, рицинолевую кислоту, α -гидроксибегеновую кислоту, 9-гидрокси-транс-10,12-октадекадиеновую кислоту, камолоновую кислоту, ипуроловую кислоту, 9,10-дигидроксистеариновую кислоту, 12-гидроксистеариновую кислоту и т.п.

[0547] Примеры подходящих поликарбонowych кислот включают щавелевую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, адипиновую кислоту, пимелиновую кислоту, субериновую кислоту, азелаиновую кислоту, себациновую кислоту, D,L-яблочную кислоту и т.п.

[0548] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из пропионовой кислоты, масляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, энантовой кислоты, каприловой кислоты, пеларгоновой кислоты, каприновой кислоты, ундециловой кислоты, лауриновой кислоты, тридекановой кислоты, миристиновой кислоты, пентадекановой кислоты, пальмитиновой кислоты, маргариновой кислоты, стеариновой кислоты, нонадекановой кислоты, арахиновой кислоты, генэйкозановой

кислоты, бегеновой кислоты, трикозановой кислоты, лигноцериновой кислоты, пентакозановой кислоты, церотиновой кислоты, гептакозановой кислоты, монтановой кислоты, нонакозановой кислоты, мелиссиновой кислоты, гентриаконтановой кислоты, лацериновой кислоты, псилластеариновой кислоты, геддовой кислоты, церопластовой кислоты, гексатрианконтановой кислоты, гептатрианконтановой кислоты или октатрианконтановой кислоты.

[0549] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из α -линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, линолевой кислоты, гамма-линолевой кислоты, дигомогамма-линолевой кислоты, арахидоновой кислоты, докозатетрамитолиновой кислоты, пальмолитической кислоты, пауллиновой кислоты, олеиновой кислоты, элаидиновой кислоты, гондоевой кислоты, эурковой кислоты, нервоновой кислоты, мидовой кислоты, адреновой кислоты, босеопентаеновой кислоты, озубондовой кислоты, сардиновой кислоты, сельдевой кислоты, докозагексаеновой кислоты или тетракозанолпентаеновой или другой мононенасыщенной или полинасыщенной жирной кислоты.

[0550] В некоторых аспектах одна или обе жирные кислоты представляют собой незаменимую жирную кислоту. Принимая во внимание благоприятное воздействие на здоровье некоторых незаменимых жирных кислот, терапевтические преимущества раскрываемых терапевтически загруженных экзосом могут быть увеличены путем включения таких жирных кислот в терапевтический агент. В некоторых аспектах незаменимая жирная кислота представляет собой незаменимую жирную кислоту n-6 или n-3, выбранную из группы, состоящей из линоленовой кислоты, гамма-линоленовой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, адреновой кислоты, докозапентаеновой n-6-кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, 20:4n-3 кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозапентаеновой n-3 кислоты или докозагексаеновой кислоты.

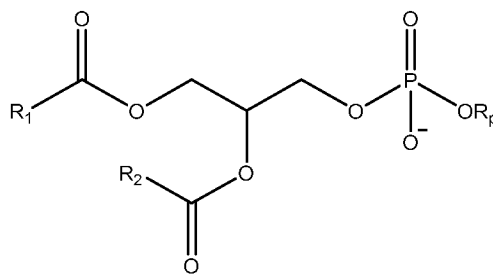
[0551] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновой кислоты, α -линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозатриеновой кислоты, эйкозатетраеновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты (DHA), тетракозапентаеновой кислоты, тетракозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. В других аспектах жирная кислота выбрана из эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. Другие примеры жирных кислот включают полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновую кислоту, α -линоленовую кислоту (ALA или полностью цис-9,12,15-октадекатриеновую кислоту), стеаридоновую

кислоту (STD или полностью цис-6,9,12,15-октадекатетраеновую кислоту), эйкозатриеновую кислоту (ETE или полностью-цис-11,14,17-эйкозатриеновую кислоту), эйкозатетраеновую кислоту (ETA или полностью-цис-8,11,14,17-эйкозатетраеновую кислоту) , эйкозапентаеновую кислоту (EPA), докозапентаеновую кислоту (DPA, клупанодоновую кислоту или полностью цис-7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту), докозагексаеновую кислоту (DHA или полностью цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту), тетракозапентаеновую кислоту (полностью-цис-9,12,15,18,21-докозагексаеновую кислоту) или тетракозагексаеновую кислоту (низиновую кислоту или полностью-цис-6,9,12,15,18,21-тетракозеновую кислоту). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту со средней длиной цепи, такую как липоевая кислота.

[0552] Цепи жирных кислот сильно различаются по длине цепей и могут быть разделены на категории в зависимости от длины цепи, например от короткой до очень длинной. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) представляют собой жирные кислоты с цепями из пяти или менее атомов углерода (например, масляная кислота). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой SCFA. Жирные кислоты со средней длиной цепи (MCFA) включают жирные кислоты с цепями из 6-12 атомов углерода, которые могут образовывать триглицериды со средней длиной цепи. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой MCFA. Длинноцепочечные жирные кислоты (LCFA) включают жирные кислоты с цепями из 13-21 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой LCFA. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой LCFA. Жирные кислоты с очень длинной цепью (VLCFA) включают жирные кислоты с цепями из 22 или более атомов углерода, например, от приблизительно 22 до приблизительно 60, от приблизительно 22 до приблизительно 50 или от приблизительно 22 до приблизительно 40 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой VLCFA.

II.G.3.c Фосфолипиды

[0553] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит фосфолипид. Фосфолипиды представляют собой класс липидов, которые являются основным компонентом всех клеточных мембран. Они могут образовывать липидные бислои в результате их амфифильных характеристик. Структура молекулы фосфолипида обычно состоит из двух гидрофобных «хвостов» жирных кислот и гидрофильной «головки», состоящей из фосфатной группы. Например, фосфолипид может представлять собой липид следующей формулы:



в которой R_p представляет собой фосфолипидный фрагмент, а R_1 и R_2 представляют собой фрагменты жирных кислот с ненасыщенностью или без нее, которые могут быть одинаковыми или разными.

[0554] Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизифосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0555] Конкретные фосфолипиды могут способствовать слиянию с липидным бислоем, например, с липидным бислоем экзосомальной мембраны. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или несколькими отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны. Слияние фосфолипида с мембраной может позволить одному или нескольким элементам липидсодержащей композиции связываться с мембраной или проходить через мембрану.

[0556] Фрагмент жирной кислоты может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристолевой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[0557] Фосфолипиды, используемые в качестве каркасных фрагментов в настоящем изобретении, могут быть природными или неприродными фосфолипидами. Также рассматриваются неприродные виды фосфолипидов, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован или перекрестно-сшит с одним или более алкинами (например, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемой медью циклоприсоединению при воздействии азидов.

[0558] Фосфолипиды включают, но не ограничиваясь ими, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты.

[0559] Примеры фосфолипидов, которые можно использовать в каркасных фрагментах, раскрываемые в данном документе, включают

- **Фосфатидилэтаноламины:** например, дилауроилфосфатидилэтаноламин, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, дистеароилфосфатидилэтаноламин, диолеоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилэтаноламин и диерукоилфосфатидилэтаноламин;
- **Фосфатидилглицерины:** например, дилауроилфосфатидилглицерин, димиристоилфосфатидилглицерин, дипальмитоилфосфатидилглицерин, дистеароилфосфатидилглицерин, диолеоилфосфатидилглицерин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилглицерин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилглицерин и диерукоилфосфатидилглицерин;
- **Фосфатидилсерины:** например, такие как дилауроилфосфатидилсерин, димиристоилфосфатидилсерин, дипальмитоилфосфатидилсерин, дистеароилфосфатидилсерин, диолеоилфосфатидилсерин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилсерин, 1-олеил-2-пальмитоил-фосфатидилсерин и диерутидилфосфат;
- **Фосфатидные кислоты:** например, дилауроилфосфатидная кислота, димиристоилфосфатидовая кислота, дипальмитоилфосфатидовая кислота, дистеароилфосфатидная кислота, диолеоилфосфатидная кислота, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидовая кислота, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидовая кислота и диерукоилфосфатидовая кислота; и
- **Фосфатидилинозиты:** например, дилауроилфосфатидилинозитол, димиристоилфосфатидилинозитол, дипальмитоилфосфатидилинозитол, дистеароилфосфатидилинозитол, диолеоилфосфатидилинозитол, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилинозитол, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилинозитол и диерукоилфосфатидилинозитол.

[0560] Фосфолипиды могут быть симметричного или асимметричного типа. В контексте данного документа термин «симметричный фосфолипид» включает глицерофосфолипиды, имеющие совпадающие фрагменты жирных кислот, и сфинголипиды, в которых фрагмент переменной жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержит сопоставимое количество атомов углерода. В контексте данного документа термин «асимметричный фосфолипид» включает

лизоллипиды, глицерофосфолипиды, имеющие различные фрагменты жирных кислот (например, фрагменты жирных кислот с различным числом атомов углерода и/или ненасыщенностью (например, двойными связями)), и сфинголипиды, в которых фрагмент переменной жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержат разное количество атомов углерода (например, фрагмент переменной жирной кислоты включает по меньшей мере на два атома углерода больше, чем углеводородная цепь, или по меньшей мере на два атома углерода меньше, чем углеводородная цепь).

[0561] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид. Симметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

- 1,2-дипропионил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (03:0 PC),
- 1,2-дибутирил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (04:0 PC),
- 1,2-дипентаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (05:0 PC),
- 1,2-дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 PC),
- 1,2-дигептаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 PC),
- 1,2-диооктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 PC),
- 1,2-динонаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 PC),
- 1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (10:0 PC),
- 1,2-дибутирил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (11:0 PC, DUPC),
- 1,2-дилауроил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (12:0 PC),
- 1,2-дитридеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (13:0 PC),
- 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0 PC, DMPC),
- 1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (15:0 PC),
- 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0 PC, DPPC),
- 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (4ME 16:0 PC),
- 1,2-дигептадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (17:0 PC),
- 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 PC, DSPC),
- 1,2-динонадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (19:0 PC),
- 1,2-диарахидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:0 PC),
- 1,2-дигенарахидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (21:0 PC),
- 1,2-дибегеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:0 PC),
- 1,2-дитрикозаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (23:0 PC),
- 1,2-дилигноцериол-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:0 PC),
- 1,2-димиристолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ^9 -цис) PC),
- 1,2-димиристелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ^9 -транс) PC),

1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ^9 -цис) PC),
1,2-дипальмителаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ^9 -транс) PC),
1,2-дипетроселеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^6 -цис) PC),
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^9 -цис) PC, DOPC),
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^9 -транс) PC),
1,2-дилинолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:2 (цис) PC, DLPC),
1,2-дилиноленоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:3 (цис) PC, DLnPC),
1,2-дикоконоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:1 (цис) PC),
1,2-диарахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:4 (цис) PC, DAPC),
1,2-диерукоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:1 (цис) PC),
1,2-дидокозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:6 (цис) PC, DHA PC),
1,2-динервоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:1 (цис) PC),
1,2-Дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (06:0 PE),
1,2-диооктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (08:0 PE),
1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (10:0 PE),
1,2-дилауроил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (12:0 PE),
1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (14:0 PE),
1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (15:0 PE),
1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0 PE),
1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (4ME 16:0 PE),
1,2-дигептадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (17:0 PE),
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0 PE, DSPE),
1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:1 PE),
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ^9 -цис) PE, DOPE),
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ^9 -транс) PE),
1,2-дилинолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:2 PE, DLPE),
1,2-дилиноленоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:3 PE, DLnPE),
1,2-диарахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (20:4 PE, DAPE),
1,2-дидокозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (22:6 PE, DHAPE),
1,2-ди-О-октадеценил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 диэфир PC),
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевой соли (DOPG) и любой их комбинации.

[0562] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из

DLPC, DMPC, DOPC, DPPC, DSPC, DUPC, 18:0 диэфира PC, DLnPC, DAPC, DHAPC, DOPE, 4ME 16:0 PE, DSPE, DLPE, DLnPE, DAPE, DHAPE, DOPG и любой их комбинации.

[0563] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит по меньшей мере один асимметричный фосфолипид. Асимметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

1-миристоил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0-16:0 PC, MPPC),
1-миристоил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0-18:0 PC, MSPC),
1-пальмитоил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-02:0 PC),
1-пальмитоил-2-миристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-14:0 PC, PMPC),
1-пальмитоил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-18:0 PC, PSPC),
1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-18:1 PC, POPC),
1-пальмитоил-2-линолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-18:2 PC, PLPC),
1-пальмитоил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0-20:4 PC),
1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0-22:6 PC),
1-стеароил-2-миристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-14:0 PC, SMPC),
1-стеароил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-16:0 PC, SPPC),
1-стеароил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-18:1 PC, SOPC),
1-стеароил-2-линолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-18:2 PC),
1-стеароил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-20:4 PC),
1-стеароил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0-22:6 PC),
1-олеоил-2-миристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1-14:0 PC, OMPC),
1-олеоил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1-16:0 PC, OPPC),
1-олеоил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1-18:0 PC, OSPC),
1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0-18:1 PE, POPE),
1-пальмитоил-2-линолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0-18:2 PE),
1-пальмитоил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0-20:4 PE),
1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0-22:6 PE),
1-стеароил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-18:1 PE),
1-стеароил-2-линолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-18:2 PE),
1-стеароил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-20:4 PE),
1-стеароил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-22:6 PE),
1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (OChemPC) и
любой их комбинации.

[0564] Для обеспечения более заметной устойчивости к нуклеазам, эффективность клеточного поглощения и более заметный эффект РНК-интерференции,

фосфатидилэтаноламины могут быть использованы в качестве каркасных фрагментов, например, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин и диолеоилфосфатидилэтаноламин.

[0565] Сайт связывания липида (например, фосфолипида) и линкера или биологически активной молекулы, например, ASO, можно подходящим образом выбрать в соответствии с типами липида и линкера или биологически активной молекулы. Любое положение, отличное от гидрофобных групп липида, может быть связано с линкером или биологически активной молекулой посредством химической связи. Например, при использовании фосфатидилэтаноламина связь может быть образована путем образования амидной связи и т.д. между аминогруппой фосфатидилэтаноламина и линкером или биологически активной молекулой.

[0566] При использовании фосфатидилглицерина связь может быть осуществлена путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка глицерина и линкером или биологически активной молекулой.

[0567] При использовании фосфатидилсерина связь может быть образована путем образования амидной связи или сложноэфирной связи и т.д. между аминогруппой или карбоксильной группой остатка серина и линкером или биологически активной молекулой.

[0568] При использовании фосфатидной кислоты связь может быть образована путем образования фосфоэфирной связи и т.д. между фосфатным остатком и линкером или биологически активной молекулой.

[0569] При использовании фосфатидилинозита связь может быть образована путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка инозита и линкером или биологически активной молекулой.

II.G.3.d Лизолипиды (например, лизофосфолипиды)

[0570] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит лизолипид, например, лизофосфолипид. Лизолипиды представляют собой производные липида, в котором одна или обе жирные ацильные цепи удалены, как правило, путем гидролиза. Лизофосфолипиды представляют собой производные фосфолипидов, в которых одна или обе жирные ацильные цепи удалены путем гидролиза.

[0571] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит любой из фосфолипидов, описанных выше, в которых одна или обе ацильные цепи были удалены путем гидролиза, и, следовательно, полученный лизофосфолипид содержит одну ацильную цепь жирной кислоты или не содержит ее.

[0572] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол или лизофосфатидилсерин.

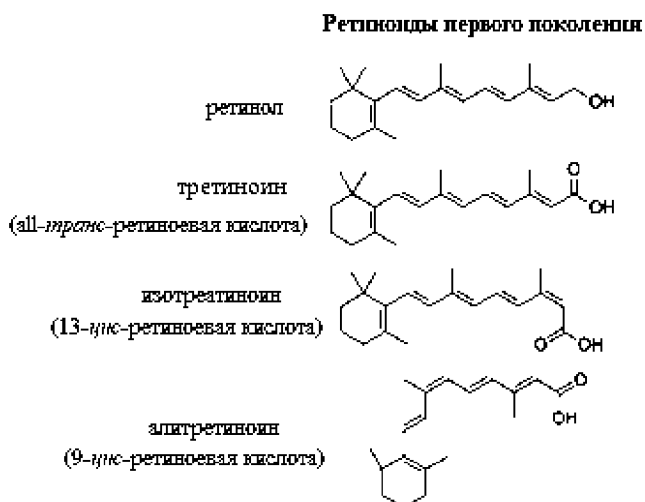
[0573] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит лизолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из

1-гексаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 лизо PC),
1-гептаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 лизо PC),
1-октаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 лизо PC),
1-нонаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 лизо PC),
1-деканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (10:0 лизо PC),
1-ундеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (11:0 лизо PC),
1-лауроил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (12:0 лизо PC),
1-тридеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (13:0 лизо PC),
1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0 лизо PC),
1-пентадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (15:0 лизо PC),
1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0 лизо PC),
1-гептадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (17:0 лизо PC),
1-стеароил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 лизо PC),
1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 лизо PC),
1-нонадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (19:0 лизо PC),
1-арахидоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:0 лизо PC),
1-бегеноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:0 лизо PC),
1-лигноцероил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:0 лизо PC),
1-гексакозаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (26:0 лизо PC),
1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (14:0 лизо PE),
1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0 лизо PE),
1-стеароил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0 лизо PE),
1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 лизо PE),
1-гексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (C16 лизо PC), и
любой их комбинации.

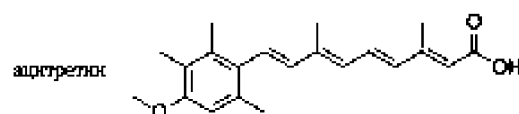
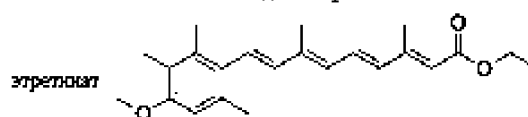
II.G.3.e Витамины

[0574] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит липофильный витамин, например, фолиевую кислоту, витамин А, витамин Е или витамин К.

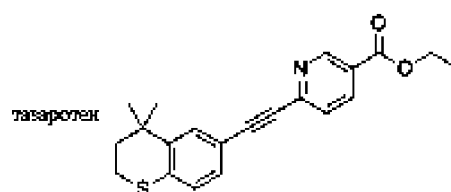
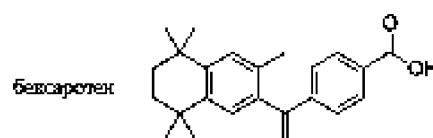
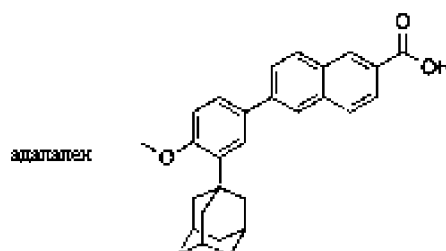
[0575] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит витамин А. Витамин А представляет собой группу ненасыщенных пищевых органических соединений, которая включает ретинол, ретиналь, ретиноевую кислоту и несколько каротиноидов провитамина А (в первую очередь, бета-каротин). В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит ретинол. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит ретиноид. Ретиноиды представляют собой класс химических соединений, которые являются витамином А или химически связаны с ним. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит ретиноид первого поколения (например, ретинол, третиноин, изотреатиноин или алитретиноин), ретиноид второго поколения (например, этретинат или ацитретин), ретиноид третьего поколения (например, адапален, бексаротен, или тазаротен) или любую их комбинацию.



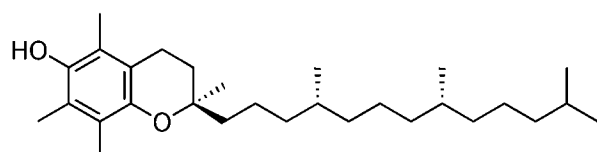
Ретиноиды второго поколения



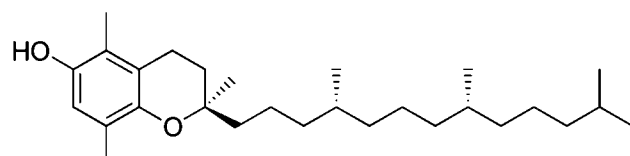
Ретиноиды третьего поколения



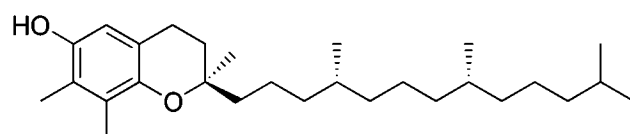
[0576] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит витамин Е. Токоферолы представляют собой класс метилированных фенолов, многие из которых обладают активностью витамина Е. Таким образом, в некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол или их комбинацию.



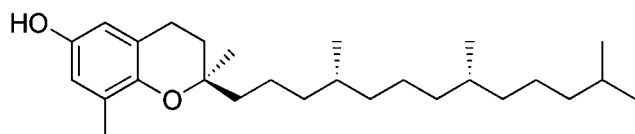
Альфа-токоферол



Бета-токоферол

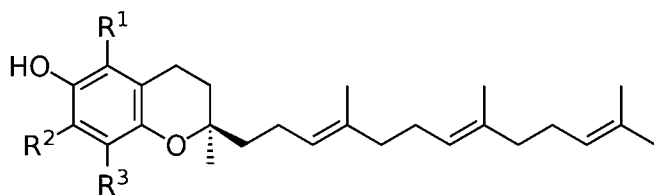


Гамма-токоферол



Дельта-токоферол

[0577] Токотриенолы также обладают активностью витамина Е. Критическое химическое структурное различие между токотриенолами и токоферолами состоит в том, что токотриенолы имеют ненасыщенную изопреноидную боковую цепь с тремя углерод-углеродными двойными связями по сравнению с насыщенными боковыми цепями токоферолов. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит альфа-токотриенол, бета-токотриенол, гамма-токотриенол, дельта-токотриенол или их комбинацию. Токотриенолы могут быть представлены следующей формулой



альфа(α)-Токотриенол: R1 = Me, R2 = Me, R3 = Me;

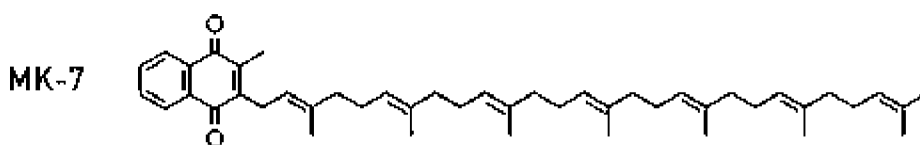
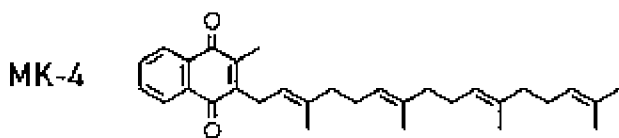
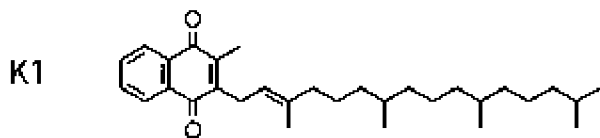
бета(β)-Токотриенол: R1 = Me, R2 = H, R3 = Me;

гамма(γ)-Токотриенол: R1 = H, R2 = Me, R3 = Me;

дельта(δ)-Токотриенол: R1 = H, R2 = H, R3 = Me.

[0578] В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит витамин К. Химически семейство витаминов К включает производные 2-метил-1,4-нафтохинона (3-). Витамин К включает два натуральных витамина: витамин К₁ и витамин К₂. В структуре витамина К₁ (также известного как фитонадион, филлохинон или (Е)-фитонадион) присутствует фитильная группа. Структуры витамина К₂ (менахиноны) отмечены полиизопренильной боковой цепью, присутствующей в молекуле, которая может содержать от шести до 13 изопренильных единиц. Таким образом, витамин К₂ состоит из ряда связанных химических подтипов с различной длиной боковых углеродных цепей, состоящих из изопреноидных групп атомов. МК-4 представляет собой наиболее распространенную форму витамина К₂. Формы с длинной цепью, такие как МК-7, МК-8 и МК-9, преобладают в ферментированных продуктах. Формы витамина К₂ с более длинной цепью, такие как МК-10-МК-13, синтезируются бактериями, но они плохо всасываются и не обладают достаточной биологической функцией. Помимо естественных форм витамина К, существует ряд синтетических форм витамина К, таких как витамин К₃ (менадион; 2-метилнафталин-1,4-дион), витамин К₄ и витамин К₅.

[0579] Соответственно, в некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит витамин К₁, К₂ (например, МК-4, МК-5, МК-6, МК-7, МК-8, МК-9, МК-10, МК-11, МК-12 или МК-13), К₃, К₄, К₅ или любую их комбинацию.



II.G.5 Химически индуцированные димеры

[0580] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера. В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с партнером по связыванию химически индуцированного димера, а биологически активная молекула связана с соответствующим партнером по связыванию. В этих аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) и биологически активная молекула ассоциируются друг с другом в присутствии химического вещества, которое индуцирует димеризацию партнеров по связыванию. В некоторых аспектах партнер по связыванию связан с N-концом каркасного фрагмента. В некоторых аспектах партнер по связыванию связан с C-концом каркасного фрагмента (например, каркасного белка). В некоторых аспектах партнер по связыванию связан с просветным доменом каркасного фрагмента (например, с каркасным белком).

[0581] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с аффинным агентом. В некоторых аспектах аффинный агент связан с N-концом каркасного фрагмента (например, каркасным белком). В некоторых аспектах аффинный агент связан с C-концом каркасного фрагмента (например, каркасного белка). В некоторых аспектах аффинный агент связан с просветным доменом каркасного фрагмента (например, с каркасным белком). В некоторых аспектах аффинный агент содержит полипептид, способный связываться с биологически активной молекулой. В некоторых аспектах аффинный агент содержит рецептор. В некоторых аспектах аффинный агент содержит

антитело или антигенсвязывающий домен, как раскрыто в данном документе. В некоторых аспектах аффинный агент связывается с одной или несколькими биологически активными молекулами.

[0582] В некоторых аспектах взаимодействие между аффинным агентом и биологически активной молекулой является временным. В некоторых аспектах биологически активная молекула диссоциирует от аффинного агента при определенных условиях. В определенных аспектах аффинность аффинного агента к биологически активной молекуле зависит от pH. В некоторых аспектах биологически активная молекула диссоциирует от аффинного агента при pH по меньшей мере приблизительно 3, по меньшей мере приблизительно 4, по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 6, по меньшей мере приблизительно 7, по меньшей мере приблизительно 8, по меньшей мере приблизительно 9, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 11 или по меньшей мере приблизительно 12. В некоторых аспектах аффинность аффинного агента к биологически активной молекуле зависит от концентрации кальция, магния, сульфата, фосфата или любой их комбинации в растворе, содержащем биологически активную молекулу и аффинный агент. В некоторых аспектах аффинность аффинного агента к биологически активной молекуле зависит от концентрации соли и/или ионной силы раствора, содержащего биологически активную молекулу и аффинный агент. В некоторых аспектах биологически активная молекула и аффинный агент диссоциируют в восстанавливающих условиях.

[0583] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с полипептидом, который может связываться с биологически активной молекулой. В некоторых аспектах связывающий полипептид связан с N-концом каркасного фрагмента (например, каркасным белком). В некоторых аспектах связывающий полипептид связан с C-концом каркасного фрагмента (например, каркасного белка). В некоторых аспектах связывающий полипептид связан с просветным доменом каркасного фрагмента (например, с каркасным белком).

[0584] В некоторых аспектах связывающий полипептид содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит мышинное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит химерное антитело (*например,*

моноклональное антитело мышь-человек, мышь-примат или примат-человек) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент верблюжьего антитела, IgNAR акулы или антиидиотипического антитела. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит верблюжье антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит IgNAR акулы или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0585] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечное антитело. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит (scFv)₂. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит Fab. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит Fab'. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит F(ab')₂. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит F(ab1)₂. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит Fv. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит dAb. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный Fab. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит Fd-фрагмент.

[0586] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит диатело. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит минитело. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит связанный с антителом полипептид. В конкретных аспектах антигенсвязывающий домен содержит нанотело.

[0587] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с Fc-рецептором, а биологически активная молекула связана с Fc. В определенных аспектах Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор, выбранный из Fc-гамма I-рецептора (FcγR1), FcγR2A, FcγR2B, FcγR3A и FcγR3B; а Fc представляет собой Fc IgG. В определенных аспектах Fc-рецептор представляет собой FcγR1, а Fc представляет собой Fc IgG. В некоторых аспектах Fc-рецептор представляет собой Fc-альфа I-рецептор (FcαR1), и при этом Fc представляет собой Fc IgA. В некоторых аспектах Fc-рецептор представляет собой Fc-эпсилон-рецептор, выбранный из Fc-эпсилон I-рецептора (FcεR1) и FcεR2, и при этом Fc представляет собой Fc из IgE.

[0588] В некоторых аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) связан с нанотелом; а биологически активная молекула связана с константной областью иммуноглобулина (Fc). В некоторых аспектах нанотело специфически связывается с Fc.

III. Способы изготовления

[0589] ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению могут быть получены с помощью химического синтеза, технологии рекомбинантной ДНК, биохимической или ферментативной фрагментации более крупных молекул, комбинаций вышеперечисленного или с помощью любого другого способа. В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ (*например, экзосомой*). Способ включает связывание биологически активной молекулы с ВВ (*например, экзосомой*) посредством малеимидного фрагмента, как описано выше.

[0590] Помимо аминореакционноспособных соединений, соединения, имеющие химические группы, которые образуют связи с сульфгидрилами ($-SH$), являются наиболее распространенными сшивающими агентами и модифицирующими реагентами для белков и других методик биоконъюгирования. Сульфгидрилы, также называемые тиолами, присутствуют в белках боковой цепи цистеиновых (Cys, C) аминокислот. Пары цистеинсульфгидрильных групп часто связаны дисульфидными связями ($-S-S-$) внутри полипептидных цепей или между ними, что является основой нативной третичной или четвертичной структуры белка. Обычно только свободные или восстановленные сульфгидрильные группы ($-SH$) [а не атомы серы в дисульфидных связях] доступны для реакции с тиол-реакционноспособными соединениями.

[0591] Сульфгидрильные группы являются применимыми мишенями для конъюгации белков и мечения. Во-первых, сульфгидрилы присутствуют в большинстве белков, но их не так много, как первичных аминов; таким образом, сшивание посредством сульфгидрильных групп является более селективным и точным. Во-вторых, сульфгидрильные группы в белках часто участвуют в дисульфидных связях, поэтому сшивание в этих сайтах обычно не приводит к значительному изменению основной структуры белка или блокированию сайтов связывания. В-третьих, количество доступных (т.е. свободных) сульфгидрильных групп можно легко контролировать или изменять; они могут быть получены путем восстановления природных дисульфидных связей или могут быть введены в молекулы посредством реакции с первичными аминами с использованием реагентов присоединения сульфгидрила, таких как 2-иминотиолан (реагент Траута), SATA, SATP или SAT (ПЭГ). Наконец, объединение групп, реагирующих с сульфгидрилом, с группами, реагирующими с амином, для получения гетеробифункциональных сшивающих агентов обеспечивает большую гибкость и контроль над процедурами сшивания. Например, используя 3-малеимидопропионовый эфир NHS, который содержит малеимидную группу и сложный эфир NHS, эфир NHS можно использовать для мечения первичных аминов ($-NH_2$) белков, аминомодифицированных олигонуклеотидов и других

аминосодержащих молекул. Малеимидная группа будет реагировать с тиоловой группой с образованием ковалентной связи, что делает возможным соединение биомолекулы с тиолом.

[0592] Малеимидная группа специфически реагирует с сульфгидрильными группами, когда значение pH реакционной смеси составляет от 6,5 до 7,5; в результате образуется стабильная тиоэфирная связь, которая не является обратимой (т.е. связь не может быть расщеплена восстанавливающими агентами). В более щелочных условиях (pH > 8,5) реакция благоприятствует первичным аминам, а также увеличивает скорость гидролиза малеимидной группы до нереакционноспособной малеаминовой кислоты. Малеимиды не реагируют с тирозинами, гистидинами или метионинами.

[0593] Тиолсодержащие соединения, такие как дитиотреитол (DTT) и бета-меркаптоэтанол (BME), должны быть исключены из реакционных буферов, используемых с малеимидами, поскольку они будут конкурировать за сайты связывания. Например, если бы DTT использовался для восстановления дисульфидов в белке, чтобы сделать сульфгидрильные группы доступными для конъюгации, DTT необходимо было бы тщательно удалять с помощью обессоливающей колонки перед иницированием реакции с малеимидом. Интересно отметить, что дисульфид-восстанавливающий агент TCEP не содержит тиолов и его не нужно удалять перед реакциями с участием малеимидных реагентов.

[0594] Избыток малеимида можно подавить в конце реакции путем добавления свободных тиолов. EDTA может быть включен в буфер для сочетания для хелатирования блуждающих двухвалентных металлов, которые в противном случае способствуют окислению сульфгидрилов (нереакционноспособных).

[0595] В одном аспекте связывание включает обработку ВВ (*например*, экзосомы) восстанавливающим агентом. Подходящие восстанавливающие агенты включают, например, TCEP (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин), DTT (дитиотреитол), BME (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент и любую их комбинацию. Тиолирующий агент может включать, *например*, реагент Траута (2-иминотиолан).

[0596] После обработки восстанавливающим агентом реакция связывания дополнительно включает приведение восстановленной ВВ (*например*, экзосомы) в контакт с малеимидным фрагментом. В одном аспекте малеимидный фрагмент связан с биологически активной молекулой до связывания с ВВ (*например*, экзосомой). В некоторых аспектах малеимидный фрагмент дополнительно присоединен к линкеру для соединения малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой. Соответственно, в

некоторых аспектах один или несколько линкеров или спейсеров расположены между малеимидным фрагментом и биологически активной молекулой.

IV. Терапевтические виды применения

[0597] В настоящем раскрытии предложены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению. В настоящем раскрытии также предложены способы предупреждения или облегчения симптомов заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению. Также предложены способы диагностики заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту композиции, содержащей ВВ, например, экзосом по настоящему изобретению.

[0598] В одном аспекте заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное заболевание, нейродегенеративное нарушение, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ.

[0599] В настоящем изобретении раскрытии также предложены способы предупреждения и/или лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту ВВ, *например*, экзосомы, раскрываемой в данном документе. В определенных аспектах заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью способов по настоящему раскрытию, включает рак, реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), аутоиммунное заболевание, инфекционные заболевания или фиброзные заболевания. В некоторых аспектах лечение носит профилактический характер. В других аспектах ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению используются для индукции иммунного ответа. В других аспектах ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению используются для вакцинации субъекта.

[0600] В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой рак. При введении субъекту, страдающему раком, в определенных аспектах ВВ, например экзосомы, по настоящему изобретению могут активировать иммунный ответ и усиливать нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или так называемые «горячие опухоли» или «воспалительные опухоли». В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению, характеризуется низкими уровнями или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли или так называемые

«холодные опухоли» или «невоспалительные опухоли». В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, вводится 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-клеток) в микроокружение опухоли. В некоторых аспектах рак включает рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичек, колоректальный рак, рак легкого, рак головы и шеи и яичников, лимфому, рак печени, глиобластому, меланому, миелому, лейкоз, рак поджелудочной железы или их комбинации. Другими словами, термин «дистальная опухоль» или «отдаленная опухоль» относится к опухоли, которая распространилась из исходной (или первичной) опухоли в отдаленные органы или отдаленные ткани, *например*, лимфатические узлы. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению приводят к лечению опухоли после метастатического распространения.

[0601] В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD). В некоторых аспектах заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, представляет собой аутоиммунное заболевание. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают: рассеянный склероз, периферический неврит, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, алопецию, аутоиммунный панкреатит, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, целиакию, болезнь Девича (нейромиелит зрительного нерва), гломерулонефрит, IgA-нефропатию, различные васкулиты, склеродермию, сахарный диабет, артериит, витилиго, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, псориаз, увеит, системную красную волчанку и их комбинации.

[0602] В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание. В определенных аспектах заболевание или нарушение вызвано онкогенным вирусом. В некоторых аспектах инфекционные заболевания, которые можно лечить согласно настоящему раскрытию, включают, но не ограничиваясь ими, человеческий гамма-вирус герпеса 4 (вирус Эпштейна-Барра), вирус гриппа А, вирус гриппа В, цитомегаловирус, золотистый стафилококк, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, HIV-1, HIV-2, коронавирусы (*например*, MERS-CoV и SARS CoV), филовирусы (*например*, Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, виды *Plasmodia* (*например*, *vivax* и *falciparum*), вирус Чикунга, вирус папилломы человека (HPV), вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус герпеса человека 8, вирус простого герпеса 2 (HSV2), *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Actinobacter* sp., коагулаза-отрицательные стафилококки (CoNS), *Mycoplasma* sp. или их комбинации.

[0603] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы инфузируют в подходящей жидкости и вводят в вену субъекта.

[0604] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[0605] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят субъекту с помощью интратекального введения. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (CSF).

[0606] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят интратуморально в одну или несколько опухолей субъекта.

[0607] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят субъекту с помощью интраназального введения. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы можно инсуфлировать через нос в форме местного введения или системного введения. В определенных аспектах ВВ, например, экзосомы вводят с помощью назального спрея.

[0608] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят субъекту с помощью интраперитонеального введения. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы инфузируют в подходящей жидкости и вводят в брюшину субъекта. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ, например, экзосом в лимфатических сосудах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ, например, экзосом в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ, например, экзосом в одном или нескольких лимфатических узлах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ, например, экзосом в одном или нескольких шейных лимфатических узлах, паховых лимфатических узлах, средостенных лимфатических узлах или грудных лимфатических узлах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ, например, экзосом в поджелудочной железе.

[0609] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят субъекту с помощью периокулярного введения. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы вводят в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственного средства включает пути субконъюнктивального, переднего субтеноновского, заднего субтеноновского и ретробульбарного введения.

[0610] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы вводят интраокулярно. Соответственно, в настоящем изобретении представлены способы лечения глазного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение эффективного количества композиции, содержащей внеклеточную везикулу (ВВ), *например*, экзосому, по настоящему изобретению, которая содержит полезную нагрузку (*например*, АVV), субъекту, при этом композиция вводится интраокулярно.

[0611] В некоторых аспектах интраокулярное введение выбрано из группы, состоящей из интравитреального введения, внутрикамерного введения, субконъюнктивального введения, субретиального введения, субсклерального введения, интрахориоидального введения и любой их комбинации. В некоторых аспектах интраокулярное введение включает инъекцию ВВ, *например*, экзосом, по настоящему изобретению. В некоторых аспектах интраокулярное введение представляет собой интравитреальную инъекцию.

V. Фармацевтические композиции и способы введения

[0612] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие ВВ, *например*, экзосомы, описанные в данном документе, которые подходят для введения субъекту. Фармацевтические композиции обычно содержат множество ВВ, *например* экзосом, содержащих биологически активную молекулу, ковалентно связанную с множеством ВВ, *например*, экзосом, посредством малеимидного фрагмента и фармацевтически приемлемого наполнителя или носителя в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители 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 ВВ, *например*, экзосом. См., *например*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990).

[0613] Фармацевтические композиции, как правило, разрабатываются стерильными и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит одно или несколько химических соединений, таких как, *например*, небольшие молекулы, ковалентно связанные с ВВ, *например*, экзосомой, описанные в данном документе.

[0614] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и ВВ, *например*, экзосому, описанные в данном документе.

В определенных аспектах ВВ, например, экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосому, вводится до введения дополнительных терапевтических агентов. В других аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосому, вводится после введения дополнительных терапевтических агентов. В дополнительных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосому, вводится одновременно с дополнительными терапевтическими агентами.

[0615] В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению, имеющие необходимую степень чистоты, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители или носители могут частично определяться 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, разрабатываются стерильными и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

[0616] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и ВВ, *например*, экзосому, описанные в данном документе. В определенных аспектах ВВ, например, экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосомы, вводится до введения дополнительных терапевтических агентов. В других аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосомы, вводится после введения дополнительных терапевтических агентов. В дополнительных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосомы, вводится одновременно с дополнительными терапевтическими агентами.

[0617] Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов (*например*, животных или человека) при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид

гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды (например, сахароза и трегалоза) и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты (например, маннит или сорбит); солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0618] Примеры носителей или разбавителей включают, но не ограничиваясь ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или соединение несовместимо с внеклеточными везикулами, описанными в данном документе, предполагается их применение в фармацевтических композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в эти композиции. Обычно фармацевтическая композиция составлена совместимой с предполагаемым путем ее введения. ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, интратуморальным, внутримышечным путем или в виде ингаляций. В определенных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например, экзосомы, вводится внутривенно, *например* путем инъекции. ВВ, например, экзосомы необязательно можно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые, по меньшей мере, частично эффективны при лечении заболевания, нарушения или состояния, для которого предназначены ВВ, например, экзосомы.

[0619] Растворы или суспензии могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, жирные 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 (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как

хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы.

[0620] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Парсипини, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Композиция обычно является стерильной и жидкой до той степени, до которой существует возможность легкого введения через шприц. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, *например*, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль, 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 может быть достигнута посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например*, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто посредством включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например*, моностеарата алюминия и желатина.

[0621] Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения ВВ, например, экзосом по настоящему изобретению в эффективном количестве и в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в данном документе, при необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения ВВ, например, экзосом в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и любые 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 плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. ВВ, например, экзосомы можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить устойчивое или пульсирующее высвобождение ВВ, *например*, экзосом.

[0622] Системное введение композиций, содержащих ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, также может осуществляться с помощью трансмукозальных путей. Для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны из уровня техники, и включают, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может быть осуществлено за счет использования *например*, назальных спреев.

[0623] В определенных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, вводится внутривенно субъекту, которому фармацевтическая композиция может принести пользу. В определенных аспектах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, *например* путем внутрилимфатической инъекции или путем внутриузловой инъекции (*см., например*, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)), или путем внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем интратуморальной инъекции, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[0624] В определенных аспектах фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, вводят в виде жидкой суспензии. В определенных аспектах фармацевтическую композицию вводят в виде состава, способного образовывать депо после введения. В определенных предпочтительных аспектах депо медленно высвобождает ВВ, например, экзосомы в кровоток или остается в форме депо.

[0625] Обычно фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, чтобы не содержать примесей, они биосовместимы и нетоксичны и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, вода является высокоочищенной и очищенной от контаминантов, *например*, эндотоксинов.

[0626] Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное масло, но не ограничиваясь ими. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать скользящее вещество, смачивающее вещество, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент, суспендирующий агент и/или консервант.

[0627] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат ВВ (например экзосомы), описанные в настоящем документе, и необязательно фармацевтически активный или терапевтический агент. Терапевтический агент может

представлять собой биологический агент, агент на основе малой молекулы или агент на основе нуклеиновой кислоты.

[0628] Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосомы, описанные в настоящем документе. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для интратуморальной инъекции.

[0629] В определенных аспектах препарат ВВ, например, экзосом по настоящему изобретению подвергается воздействию облучения, *например*, рентгеновских лучей, гамма-лучей, бета-частиц, альфа-частиц, нейтронов, протонов, элементарных ядер, УФ-лучей для повреждения остаточных репликационно-компетентных нуклеиновых кислот.

[0630] В определенных аспектах препарат ВВ, например, экзосом, по настоящему изобретению подвергается гамма-облучению с использованием дозы облучения более чем приблизительно 1, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100 или более 100 kGy.

[0631] В определенных аспектах препарат ВВ, например, экзосом, по настоящему изобретению подвергается облучению рентгеновскими лучами с использованием дозы облучения более приблизительно 0,1, приблизительно 0,5, приблизительно 1, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 500, приблизительно 600, приблизительно 700, приблизительно 800, приблизительно 900, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000, приблизительно 8000, приблизительно 9000 или приблизительно 10000.

[0632] ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению можно использовать одновременно с другими лекарственными средствами. В частности, ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению можно использовать вместе с лекарственными средствами, такими как гормональные терапевтические агенты, химиотерапевтические агенты, иммунотерапевтические агенты, лекарственные препараты, ингибирующие действие факторов роста клеток или рецепторов факторов роста клеток, и т.п.

VI. Наборы

[0633] В настоящем изобретении также предложены наборы или изделия, содержащие одну или несколько ВВ, например, экзосом по настоящему изобретению и необязательно инструкции по применению. В некоторых аспектах набор или изделие содержит фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, которая содержит по меньшей мере одну ВВ, *например*, экзосому по настоящему изобретению и инструкции по применению. В некоторых аспектах набор или изделие содержит по меньшей мере одну ВВ, *например*, экзосому по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосомы в одном или нескольких контейнерах. Специалист в данной области легко поймет, что ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, или их комбинации могут быть легко включены в один из установленных форматов набора, которые хорошо известны из уровня техники.

[0634] В некоторых аспектах набор или изделие включает ВВ, например, экзосомы, одну или несколько биологически активных молекул, реагентов для ковалентного присоединения одной или нескольких биологически активных молекул к ВВ, например экзосомам, посредством малеимидного фрагмента, или любую их комбинацию, и инструкции по проведению реакции для ковалентного присоединения одной или нескольких биологически активных молекул к ВВ, например, экзосомам, посредством малеимидного фрагмента.

[0635] В некоторых аспектах набор содержит реагенты для конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, *например*, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента, и инструкции по проведению конъюгации.

[0636] Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells*

(Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Ed. CRC Press (2007), и Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0637] Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0638] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

Примеры

[0639] Следующие ниже примеры представлены только для иллюстративных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем или содержание настоящего изобретения. В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам 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); Green & Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012); Colowick & Kaplan, Methods In Enzymology (Academic Press); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition (Pharmaceutical Press, 2012); Sundberg & Carey, Advanced Organic Chemistry: Parts A and B, 5th Edition (Springer, 2007).

Пример 1

Выделение и загрузка экзосом

[0640] *Выделение экзосом:* экзосомы собирали из супернатанта суспензионных культур клеток НЕК293 SF высокой плотности через 7-9 дней. Среду для культивирования клеток последовательно центрифугировали, при этом супернатант предыдущего

центрифугирования служил входным раствором для последующего центрифугирования: среду для культивирования клеток центрифугировали при 5000 x g в течение 30 минут, супернатант собирали и осадок отбрасывали; затем супернатант центрифугировали при 16000 x g в течение 30 минут, супернатант собирали, а осадок отбрасывали; затем супернатант центрифугировали при 133900 x g в течение 3 часов, полученный супернатант отбрасывали, а осадок собирали и ресуспендировали в 1 мл PBS. Ресуспендированный при 133900 x g осадок дополнительно очищали с использованием градиента йодиксанола OPTIPREP™: 4-х уровневый стерильный градиент готовили путем смешивания 3 мл OPTIPREP™ (60% йодиксанола) с 1 мл ресуспендированного осадка с получением 4 мл 45% йодиксанола, затем последовательно наслаивали 3 мл 30% йодиксанола, 2 мл 22,5% йодиксанола, 2 мл 17,5% йодиксанола и 1 мл PBS в пробирке Ultra-Clear на 12 мл (344059) для ротора SW 41 Ti. Градиент ультрацентрифугировали при 150000 x g в течение 16 часов при 4 °C. Ультрацентрифугирование приводило 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 ~ 2 мл из пробирки.

[0641] Фракцию экзосом разводили в ~32 мл PBS в 38,5 мл пробирке Ultra-Clear (344058) и центрифугировали при 10000 x g в течение 30 минут, подвергали ультрацентрифугированию при 133900 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. Конечную очищенную концентрацию экзосом определяли с помощью анализа отслеживания наночастиц (NTA).

[0642] *Загрузка экзосом:* для загрузки экзосом конъюгатами малеимида экзосомы химически восстанавливали с использованием TCEP (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид) в концентрациях от 1 до 50 mM; в некоторых случаях стадия восстановления включала обработку 1-2 M гидрохлорида гуанидина в течение одного часа при комнатной температуре или предшествовала ей. Экзосомы заменяли на PBS путем разбавления до 1 мл в PBS, центрифугирования при 100000 x g в течение 20 минут (ротор TLA 120.2, Beckman) для осаждения экзосом, супернатант удаляли и отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS; это повторяли один раз, чтобы обеспечить полную замену буфера. Конечный осадок экзосом ресуспендировали в 0,1 мл PBS, к которому добавляли загружаемое соединение до конечной концентрации до 300 мкМ. Экзосомы инкубировали в течение ночи при 4 °C с последующей промывкой PBS для удаления соединения, не конъюгированного с экзосомами (разведение до 1 мл в PBS, центрифугирование при 100000 x g в течение 20 минут (ротор TLA 120.2, Beckman) для осаждения экзосом, супернатант

удаляли и отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS; это повторяли один раз для обеспечения полной замены буфера).

Пример 2

Эффективность свободных и связанных с экзосомами агонистов STING

[0643] На Фиг. 1В представлены соединения-агонисты STING, которые исследовали в анализах с PBMC. Соединения синтезировали в Sygnature. PBMC выделяли из гепаринизированной крови человека с использованием стандартных протоколов с использованием градиента плотности фиколла-гипака. Для каждого исследуемого условия 500000 PBMC помещали в лунку 96-луночного планшета и культивировали в течение ночи с исследуемым образцом. На следующий день клетки центрифугировали в планшете ($500 \times g$ в течение 10 минут) и собирали супернатант. Высвобождение интерферона бета ($IFN\beta$) в супернатант клеточной культуры измеряли с помощью ELISA. Фиг. 2.

[0644] На Фиг. 2 показан агонизм STING сульфгидрильных или аминокреационноспособных соединений, оцененный с помощью анализа с PBMC. PBMC, полученные от трех разных здоровых людей-доноров, использовали для анализа активности либо свободных соединений (темные кружки), либо соединений, загруженных на экзосомы (белые кружки). Все соединения с химической структурой присоединения малеимида (CP227, CP229, CP250) продемонстрировали увеличение активности на 3-4 log при ассоциации с экзосомами. Ассоциация экзосом посредством пассивной нагрузки (CP232) продемонстрировала увеличение эффективности примерно на 2 log. Примечательно, что присоединение сукцинимидов приводило к низкой нагрузке, и индукцию высвобождения $IFN\beta$ не обнаруживали в образцах, нагруженных экзосомами (CP246).

[0645] На Фиг. 3А-3С продемонстрировано сравнение химических структур, реагирующих с сульфгидрилом и ассоциированных с липидами, для загрузки агонистов STING. PBMC, полученные от двух разных здоровых людей-доноров, использовали для анализа активности трех соединений: CP227, CP229 и CP238. Соединения исследовали либо в свободном состоянии (синие кружки/линии), либо в экзосомах (зеленые кружки/линии). Оба соединения, содержащие химическую структуру присоединения к реагирующему с сульфгидрилом малеимиду (CP227 и CP229), демонстрируют повышение активности более чем на 3 log при присоединении к экзосомам. В отличие от этого, соединение, содержащее ассоциированный с липидом холестерин, продемонстрировало сдвиг активности менее чем на 1 log при связывании с экзосомами. Таким образом, прикрепление малеимида превосходило холестерин.

[0646] На Фиг. 4А-4С продемонстрировано сравнение немодифицированных химических структур и реагирующих с сульфгидрилом химических структур для загрузки агонистов STING. Экзосомы, пассивно нагруженные циклическими динуклеотидными агонистами STING (ADUS100 и CL656), сравнивали с агонистами, химически присоединенными к экзосомам с химической структурой малеимида (те же данные для малеимидных соединений, что и на Фиг.2; т.е. исследуемыми соединениями были CP227, CP229 и CP238). Значения EC_{50} для обоих типов нагрузки сравнивали в таблице, представленной на Фиг. 4. Как правило, соединения, конъюгированные с малеимидом, демонстрировали более чем 10-кратное увеличение опосредованного экзосомами увеличения активности по сравнению с немодифицированными соединениями. Таким образом, прикрепление малеимида к экзосомам превосходило пассивную нагрузку.

[0647] На Фиг. 5А и 5В изображено сравнение загрузки и активности различных агонистов STING. Количество агониста STING, загруженного на экзосомы с использованием различных химических процессов прикрепления, определяли количественно с помощью масс-спектрометрии. Значения EC_{50} агониста STING рассчитывали на основе анализов с PBMC человека. Результаты указывают на то, что загрузка/активность агониста STING варьируется в зависимости от способов.

Пример 3

Эффективность MMAE, связанного с экзосомами

[0648] На Фиг. 6 представлена структура монометилауристатина Е (MMAE) и малеимид-vc-РАВС-MMAE (vc-MMAE). Эти два соединения использовали для исследования нагрузки цитотоксического соединения (MMAE) на экзосомы. Оба соединения коммерчески доступны и были заказаны в MedChemExpress.

[0649] Цитотоксичность MMAE оценивали на клетках RAW264.7 (RAW). См. Фиг. 7. Клетки RAW представляют собой клеточную линию макрофагов человека. 10000 клеток RAW высевали в каждую лунку 96-луночного планшета, и рост клеток контролировали с использованием прибора IncuCyte для визуализации клеток в течение приблизительно 5 дней. Свободный MMAE или DMSO (контроль-носитель) добавляли к клеткам RAW в диапазоне концентраций, и значительное ингибирование роста и гибель клеток отмечали для концентраций MMAE выше 1,1 нМ. Контроли DMSO не продемонстрировали влияния на жизнеспособность или рост клеток. На изображениях представлены клетки после 5 дней обработки указанной дозой MMAE или DMSO; ингибирование роста очевидно по уменьшению количества клеток после обработки MMAE, в то время как гибель клеток

указывается по округлению клеток (очевидно на изображениях при 10, 100 и 300 нМ). У MMAE имеет место крутая кривая доза-ответ.

[0650] Разница в эффективности MMAE с линкером малеимид-Val-Cit-PABC или без него изображена на Фиг. 8А. Клетки RAW обрабатывали указанными концентрациями либо немодифицированного MMAE, либо vc-MMAE. vc-MMAE, по-видимому, примерно в 100 раз менее токсичен, чем немодифицированный MMAE, при введении в клетки в виде свободного лекарственного средства. Таким образом, присоединение MMAE к линкеру vc приводит к снижению активности.

[0651] На Фиг. 8В изображена очистка экзосом после инкубации с MMAE. Экзосомы инкубировали с MMAE в течение ночи при 4 °С, затем дважды промывали ультрацентрифугированием (осаждали центрифугированием при 100000 x g в течение 20 минут, ресуспендировали в PBS, затем осаждали второй раз с последующим ресуспендированием). Ни в каких исследуемых условиях не было обнаружено, что экзосомы, обработанные MMAE, вызывают какое-либо ингибирование роста или токсичность при добавлении к клеткам RAW. Это указывает на то, что свободный MMAE существенно не связывается с экзосомами и что процедура очистки устраняет MMAE из экзосом.

[0652] На Фиг. 8С изображено, что экзосомы, нагруженные vc-MMAE, проявляют значительную биологическую активность. Экзосомы химически восстанавливали с помощью TCEP (5 mM) и концентраций гидрохлорида гуанидина (Gdn) в диапазоне от 0,1 до 2 М. Экзосомы очищали ультрацентрифугированием (осаждали центрифугированием при 100000 g в течение 20 минут, ресуспендировали в PBS, затем осаждали второй раз с последующим ресуспендированием), затем добавляли к клеткам RAW с указанной MOI (количество экзосом на клетку). Токсичность оценивали путем измерения ингибирования роста клеток через 5 дней культивирования. Клетки RAW демонстрировали дозозависимое снижение пролиферации после обработки нагруженными vc-MMAE экзосомами. Таким образом, vc-MMAE в значительной степени присоединялся к экзосомам и не вымывался хаотропным агентом и центрифугированием. Кроме того, MMAE, прикрепленный к экзосоме, проявлял сильное ингибирующее действие на рост клеток.

[0653] На Фиг. 8D изображено, что химическое восстановление экзосом необходимо для активности vc-MMAE. Экзосомы либо хранили в PBS, либо обрабатывали PBS 5 mM TCEP, затем инкубировали либо с MMAE, либо с vc-MMAE. Образцы очищали ультрацентрифугированием, затем добавляли к клеткам RAW. Рост клеток заметно ингибировался только восстановленными TCEP экзосомами, инкубированными с vc-MMAE (темно-красные треугольники). Это указывает на то, что малеимидная группа в

соединении *vc*-MMAE конъюгирована с сульфгидрильными группами, образованными на экзосомах после химического восстановления.

[0654] На Фиг. 9А изображено влияние восстанавливающих условий и загрузочной концентрации соединения на активность экзосом. Экзосомы обрабатывали рядом восстанавливающих условий (0-50 мМ ТСЕР с 1 М гидрохлоридом гуанидина или без него), очищали ультрацентрифугированием, а затем инкубировали с 10 или 100 мкМ *vc*-MMAE в течение ночи при 4 °С. Экзосомы очищали ультрацентрифугированием, затем добавляли к клеткам RAW для исследования их влияния на рост клеток. Экзосомы, которые не были химически восстановлены обработкой ТСЕР, не оказывали влияния на рост клеток. При сравнении в восстанавливающих условиях нагрузка 100 мкМ *vc*-MMAE приводила к резкому увеличению эффективности по сравнению с нагрузкой 10 мкМ *vc*-MMAE. В присутствии 1 М Gdn все концентрации ТСЕР приводили к аналогичной активности, за исключением самой высокой концентрации ТСЕР (50 мМ), которая демонстрировала сниженную активность. В отсутствие гидрохлорида гуанидина увеличение концентрации ТСЕР с 1,5 до 15 мМ приводило к увеличению эффективности; 50 мМ ТСЕР также продемонстрировало снижение эффективности в отсутствие гидрохлорида гуанидина.

[0655] Аналогично Фиг. 9А, на Фиг. 9В изображено влияние восстанавливающих условий и загрузочной концентрации соединения на активность экзосом, но при более высоких концентрациях *vc*-MMAE. Использовали те же экспериментальные условия в эксперименте, представленном на Фиг. 9А, но с использованием 100 и 300 мкМ *vc*-MMAE в качестве загрузочных концентраций. Подобно тому, что наблюдали с 10 и 100 мкМ *vc*-MMAE, увеличение загрузочной концентрации до 300 мкМ *vc*-MMAE дополнительно увеличивало эффективность. Важно отметить, что при 300 мкМ *vc*-MMAE сопоставимую эффективность наблюдали между условиями 0 и 1 М Gdn при 15 мМ ТСЕР; это указывает на то, что нагрузка может быть проведена без гидрохлорида гуанидина при условии, что восстанавливающие условия и концентрация нагрузки оптимизированы.

[0656] Эксперименты с MMAE иллюстрируют сложное взаимодействие между концентрациями ТСЕР, гидрохлорида гуанидина и Val-Cit-MMAE и демонстрируют множество неожиданных взаимодействий (например, 1М Gdn более эффективно, чем 2М, Фиг. 8В; 15 мМ ТСЕР более эффективно, чем 50 мМ, Фиг. 9А и 9В: увеличение концентрации ТСЕР с 1,5 мМ до 15 мМ увеличивает эффективность в отсутствие Gdn, но не влияет на 1М Gdn, Фиг.9В).

Пример 4

PROTAC, связанные с экзосомами

[0657] PROTAC TBK1 в соответствии с Фиг. 10С присоединяется к экзосоме в соответствии с описанными выше способами. PROTAC содержит TBK1-нацеливающий лиганд, линкер и лиганд, способный связываться с E3-убиквитинлигазой VHL.

[0658] PROTAC прикрепляется к экзосоме, например, к внешней поверхности и/или просветной поверхности мембраны экзосомы посредством малеимидного фрагмента (прямо или косвенно посредством линкера). PROTAC может быть присоединен к экзосоме посредством малеимид-VA-PABC-расщепляемого линкера. PROTAC может быть присоединен к экзосоме посредством связывающего лиганда VHL (E3-лигаза).

[0659] Функциональность PROTAC TBK1, присоединенного к экзосоме по настоящему изобретению, может быть определена с использованием методов *in vitro* или *in vivo*. Способы *in vitro* включают вестерн-блоттинг для (i) прямого измерения расщепления TBK1 в клеточных линиях, (ii) определения ингибирования фосфорилирования IRF3 после стимуляции агонистом STING (поли I: C, CL656, LPS и т.д.) или (iii) определения нокдауна белка TBK1 в моноцитах человека. Другой анализ *in vitro* может определять ингибирование агонизма STING, например, с использованием линии репортерных клеток B16 IRF (например, предварительно обработав конъюгатом экзосома-PROTAC, стимулировать агонистом STING и измерить ответ в отчете) или моноцитов человека (например, измерить высвобождение IFB-бета).

[0660] Анализы *in vivo* для определения функциональности конъюгатов экзосома-PROTAC по настоящему изобретению включают, например, анализы для определения (i) нокдауна белка TBK1 в перитонеальных макрофагах (например, внутрибрюшинное введение конъюгата экзосома-PROTAC, сбор перитонеальных макрофагов и измерение нокдауна с помощью вестерн-блоттинга или проточной цитометрии), (ii) ингибирования сывороточных цитокинов, вызванных агонизмом STING (например, предварительно обработать внутрибрюшинно конъюгатом экзосома-PROTAC, стимулировать внутрибрюшинно агонистом STING и измерить цитокины плазмы крови/сыворотки крови в определенные моменты времени), или (iii) ингибирования фосфо-IRF3, индуцированного агонизмом STING (например, если нокдаун очень селективен и не наблюдается снижения сывороточных цитокинов, определение уровней pIRF3 в различных типах клеток, например, с использованием антитела к pIRF и проточной цитометрии, может способствовать демонстрации селективности).

Пример 5

Ингибиторы LPA1, связанные с экзосомами, – EhoAM152

[0661] Лизофосфатидная кислота (LPA) представляет собой мощный эндогенный липидный медиатор, который защищает и спасает клетки от запрограммированной клеточной смерти. LPA, благодаря своему высокоаффинному рецептору LPA1, является важным медиатором фиброгенеза.

[0662] AM152 (также известный как BMS-986020) является специфическим ингибитором LPA1. AM152 представляет собой высокоаффинный антагонист LPA1, который ингибирует переносчики желчных кислот и фосфолипидов с IC_{50} 4,8 мкМ, 6,2 мкМ и 7,5 мкМ для BSEP, MRP4 и MDR3 соответственно. Химические структуры ингибиторов LPA1 AM152 и AM095 представлены на Фиг. 12. На фигуре изображено, что реагенты, содержащие малеимид, могут быть конъюгированы с группами карбоновой кислоты и/или карбамата AM152. Тот же подход можно использовать для дериватизации AM095, поскольку те же реакционноспособные группы присутствуют в AM095.

[0663] Антагонисты LPA1, такие как AM095 и AM152, могут быть химически связаны с поверхностью экзосом с использованием способов, раскрываемых в настоящем описании. Результаты будут представлять собой ВВ, например, экзосомы, содержащие множество молекул-антагонистов на их поверхности. См. Фиг. 13.

[0664] На Фиг. 14 представлен пример того, как реакционноспособная группа с малеимидом может быть добавлена к AM152 посредством кислотной группы. В примере показана малеимидная группа как часть комплекса, включающего расщепляемый линкер ala-val, расположенный между малеимидной группой и хлорметилбензольной группой, реагирующей с карбоновой кислотой. На Фиг. 15 представлены два иллюстративных реагента, которые можно использовать для дериватизации AM152. Верхний реагент содержит (i) хлорметилбензольную группу, которая может реагировать с группой карбоновой кислоты AM152, и (ii) малеимидную группу, и между ними расположены расщепляемый cit-val и спейсер C5. Нижний реагент содержит (i) хлорметилбензольную группу, которая может реагировать с группой карбоновой кислоты AM152, и (ii) малеимидную группу, и между ними расположены расщепляемый дипептид ala-val и спейсер C5. Малеимидная группа впоследствии может быть использована для присоединения AM152 (или AM095), например, к фрагменту каркаса либо прямо, либо косвенно посредством одного или нескольких спейсеров или линкеров.

[0665] На Фиг. 16 изображен продукт, который может возникнуть в результате расщепления дипептида cit-val или ala-val (например, катепсином В) в продукте конъюгации. Продукт, сложный эфир анилина AM152, может быть дополнительно обработан эндогенной эстеразой с получением продукта AM152 в виде свободной кислоты.

[0666] На Фиг. 17 изображены несколько производных AM152, содержащих свободную малеимидную группу и различные комбинации спейсеров. Дополнительные производные изображены на Фиг. 18.

[0667] На Фиг. 19 представлено, что после защиты группы карбоновой кислоты можно использовать те же реагенты, которые использовались для дериватизации группы карбоновой кислоты для дериватизации AM152 по его карбаматной группе. В полученном продукте впоследствии будет снята защита, чтобы освободить группу карбоновой кислоты.

[0668] На Фиг. 20 представлен пример, в котором комплекс с малеимидной группой присоединен к карбаматной группе AM152 посредством линкера. Подходящие линкеры включают любые линкеры, раскрытые в настоящем описании.

[0669] Способы, раскрываемые в этом примере, относятся к получению производного AM152 или AM095, содержащего свободную реакционноспособную группу с малеимидом, которая впоследствии могла бы взаимодействовать с каркасным фрагментом либо прямо, либо косвенно посредством одного или нескольких спейсеров или линкеров. В результате AM152 или AM095 будут прикреплены к внешней поверхности ВВ, например, к экзосоме.

[0670] Однако настоящее изобретение также может быть осуществлено на практике, сначала путем дериватизации каркасного фрагмента, например, бифункциональной группой, включающей малеимид, а затем взаимодействия дериватизированного каркасного фрагмента, например, имеющего свободную хлорметилбензольную группу, либо с карбоновой кислотой, либо с карбаматной группой AM152, как изображено на Фиг. 21.

[0671] В некоторых аспектах химическое связывание AM152 (или AM095) с поверхностью ВВ, например, экзосомами, посредством малеимидного фрагмента улучшает по меньшей мере одно полезное свойство неконъюгированного AM152 (или AM095) и/или снижает по меньшей мере одно вредное свойство неконъюгированного AM152. или AM095 (например, токсичность, такую как токсичность в отношении мочевого пузыря и/или токсичность в отношении печени). В некоторых аспектах химическое связывание AM152 (или AM095) с ВВ, например, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента улучшает эффективность AM152 или AM095 (по сравнению со свободным AM152 или свободным AM095) при лечении фиброзного заболевания, например, фиброза легких, такоого как IPF.

Пример 6

Ингибиторы NLRP3, связанные с экзосомами, – ExoMCC950

[0672] MCC950 (N-[[[(1,2,3,5,6,7-гексагидро-s-индацен-4-ил)амино]карбонил]-4-(1-гидрокси-1-метилэтил)-2-фурансульфонамид) является мощным и селективным ингибитором NLRP3 (NOD-подобного рецептора (NLR) белка 3, содержащего пириновый домен) инфламмасомы. MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β , индуцированное активаторами NLRP3, такими как АТФ, MSU и нигерицин, путем предупреждения олигомеризации адапторного белка инфламмасомы ASC (ассоциированного с апоптозом Speck-подобного белка, содержащего CARD). Coll et al. (2015) Nature Med. 21:248-255. MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β в макрофагах, примированных LPS и активированных АТФ или нигерицином с IC₅₀ примерно 7,5 нМ. Хотя MCC950 блокирует высвобождение IL-1 β , индуцированное NLRP3, MCC950 не ингибирует инфламмасомы NLRC4, AIM2 или NLRP1. Кроме того, MCC950 не ингибирует передачу сигналов TLR2 или примирование NLRP3.

[0673] MCC950 активен *in vivo*, блокируя выработку IL-1 β и увеличивая выживаемость в моделях рассеянного склероза у мышей. MCC950 также ингибирует индуцированное NLRP3 продуцирование IL-1 β в моделях инфаркта миокарда. van Hout et al (2015) Eur. Heart J. ehw247. MCC950 также активен в образцах *ex vivo* от индивидуумом с синдромом Макл-Уэллса. Таким образом, MCC950 является потенциальным терапевтическим агентом для лечения NLRP3-ассоциированных синдромов, включая аутовоспалительные и аутоиммунные заболевания.

[0674] На Фиг. 22 изображена структура MCC950, бифункциональных реагентов, которые можно использовать для дериватизации MCC950 для введения реакционноспособной группы с малеимидом, и производных MCC950, содержащих реакционноспособную группу с малеимидом. Бензольные группы бифункциональных реагентов (**) могут реагировать с карбаматной группой MCC950 (*), приводя к образованию производных MCC950, изображенных на Фиг. 22.

[0675] Способы, раскрываемые в этом примере, относятся к получению производного MCC950, содержащего свободную реакционноспособную группу с малеимидом и, необязательно, один или несколько линкеров, вставленных между фрагментом MCC950 и малеимидной группой (например, расщепляемый линкер и/или один или несколько спейсеров), которые впоследствии могли бы реагировать с каркасным фрагментом прямо или косвенно посредством одного или нескольких спейсеров или линкеров. В результате MCC950 будет прикреплен к внешней поверхности ВВ, например, к экзосоме.

[0676] Настоящее изобретение также может быть осуществлено на практике путем дериватизации каркасного фрагмента, например, бифункциональной группой,

включающей малеимид, а затем взаимодействия дериватизированного фрагмента каркаса, например, имеющего свободную хлорметилбензольную группу или бензольную группу, с карбаматной группой MCC950 или другой подходящей дериватируемой группой.

[0677] В некоторых аспектах химическое связывание MCC950 с поверхностью ВВ, например, экзосомами, посредством малеимидного фрагмента улучшает по меньшей мере одно полезное свойство неконъюгированного MCC950 и/или снижает по меньшей мере одно вредное свойство неконъюгированного MCC950 (например, токсичность, такую как токсичность в отношении мочевого пузыря и/или токсичность в отношении печени). В некоторых аспектах химическое связывание MCC950 с ВВ, например, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента улучшает эффективность MCC950 (по сравнению со свободным MCC950) при лечении заболеваний или нарушений, связанных с инфламмасомой NLRP3, таких как рассеянный склероз, сахарный диабет 2 типа, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, нейровоспаление, болезнь Паркинсона, прионные заболевания, повреждение сердца в результате инфаркта миокарда, подагра и вообще любые NLRP3-ассоциированные синдромы, включая аутовоспалительные и аутоиммунные заболевания.

[0678] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат» указаны один или несколько, но не все иллюстративные аспекты настоящего изобретения, как это предусмотрено изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[0679] Настоящее раскрытие было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в данном документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[0680] Вышеизложенное описание конкретных аспектов полностью отражает общий характер настоящего изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных путей применения таких конкретных аспектов, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах значения и диапазона

эквивалентов раскрываемых аспектов на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете инструкций и указаний.

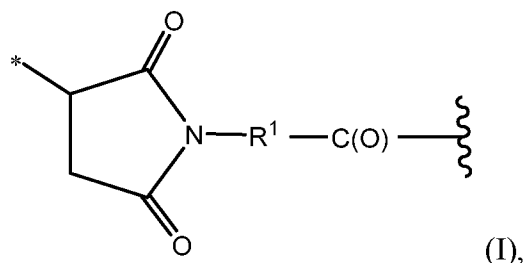
[0681] Объем притязаний и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных аспектов, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

[0682] Содержание всех процитированных ссылок (включая литературные ссылки, патенты, заявки на патенты и веб-сайты), которые могут цитироваться в настоящей заявке, явным образом включены в данный документ посредством ссылки для любых целей в полном объеме, как и ссылки, цитируемые в ней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Внеклеточная везикула (ВВ), содержащая биологически активную молекулу, ковалентно связанную с ВВ посредством малеимидного фрагмента.

2. Внеклеточная везикула по п. 1, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (I):



где

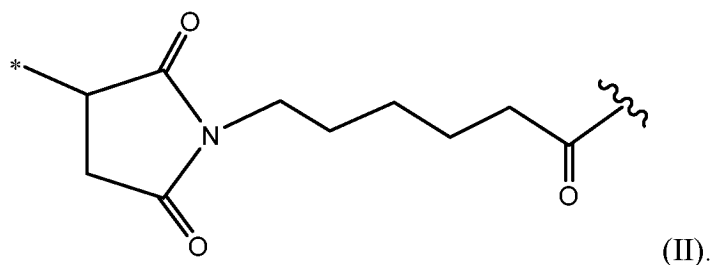
R^1 выбран из группы, состоящей из $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ карбоцикло-, $-O-(C_{1-8}$ алкилен)-, -арил-, $-C_{1-10}$ алкилен-арил-, -арил- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ карбоцикло)-, $-(C_{3-8}$ карбоцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ гетероцикло-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ гетероцикло)-, $-(C_{3-8}$ гетероцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_r$ и $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$;

г является целым числом от 1 до 10;

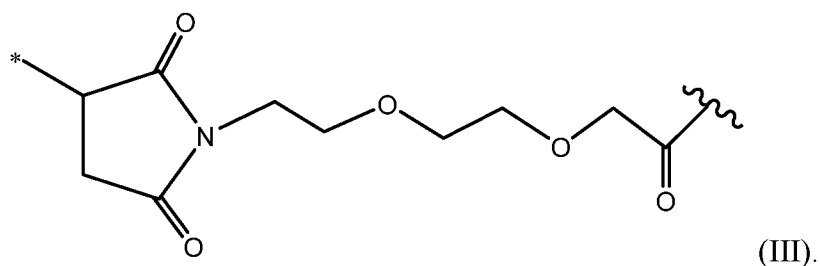
* указывает на сайт ковалентного присоединения малеимидного фрагмента к ВВ; и волнистая линия указывает на сайт присоединения малеимидного фрагмента к биологически активной молекуле.

3. Внеклеточная везикула по п. 2, в которой R^1 представляет собой $-(CH_2)_s-$, где s равно 4, 5 или 6.

4. Внеклеточная везикула по пп. 2 или 3, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (II), где R^1 представляет собой $-(CH_2)_5-$:



5. Внеклеточная везикула по п. 2, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (III), где R^1 представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где r равно 2:



6. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-5, в которой малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ, где функциональная группа представляет собой сульфгидрильную группу.
7. Внеклеточная везикула по п. 6, в которой сульфгидрильная группа находится на белке на поверхности ВВ.
8. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-7, в которой малеимидный фрагмент связан с биологически активной молекулой с помощью линкера.
9. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.
10. Внеклеточная везикула по п. 9, в которой расщепляемый линкер расщепляется протеазой.
11. Внеклеточная везикула по п. 10, в которой протеаза представляет собой катепсин.
12. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой линкер представляет собой линкер, чувствительный к восстановлению, или кислотолабильный линкер.
13. Внеклеточная везикула по любому из пп. 8-12, в которой линкер имеет формулу (IV):



где каждый $-A-$ независимо представляет собой аминокислотную единицу, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; $-Y-$ представляет собой спейсерную единицу, а y равно 0, 1 или 2.

14. Внеклеточная везикула по п. 13, в которой $-A_a-$ представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид.

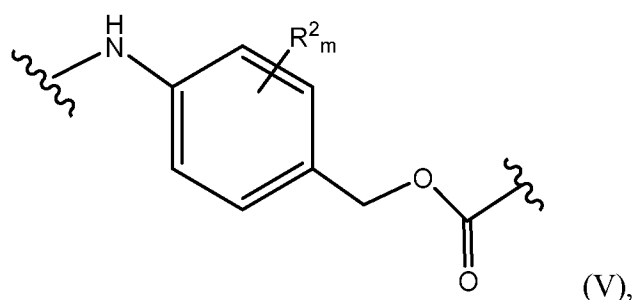
15. Внеклеточная везикула по п. 14, в которой a равно 2 и $-A_a-$ выбран из группы, состоящей из валин-аланина, валин-цитруллина, фенилаланин-лизина, N-метилвалин-цитруллина, циклогексилаланин-лизина и бета-аланин-лизина.

16. Внеклеточная везикула по п. 15, в которой указанный $-A_a-$ представляет собой валин-аланин или валин-цитруллин.

17. Внеклеточная везикула по любому из пп. 13-16, в которой u равно 1.

18. Внеклеточная везикула по любому из пп. 13-17, в которой $-Y-$ представляет собой саморасщепляющийся спейсер.

19. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой $-Y_y-$ имеет формулу (V):



где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

20. Внеклеточная везикула по п. 19, в которой m равно 0, 1 или 2.

21. Внеклеточная везикула по п. 20, в которой m равно 0.

22. Внеклеточная везикула по любому из пп. 8-21, в которой расщепляемый линкер представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

23. Внеклеточная везикула по любому из пп. 13-17, в которой $-Y-$ представляет собой несаморасщепляющийся спейсер.

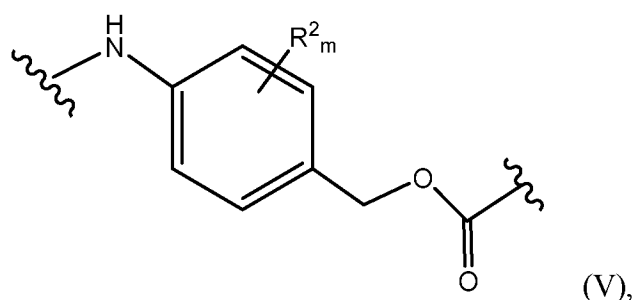
24. Внеклеточная везикула по п. 23, в которой несаморасщепляющийся спейсер представляет собой –Gly- или –Gly-Gly-.

25. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой линкер представляет собой кислотолабильный линкер.

26. Внеклеточная везикула по п. 25, в которой кислотолабильный линкер представляет собой цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

27. Внеклеточная везикула по пп. 25 или 26, в которой кислотолабильный линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с кислотолабильным линкером.

28. Внеклеточная везикула по п. 27, в которой спейсерная единица имеет формулу (V):



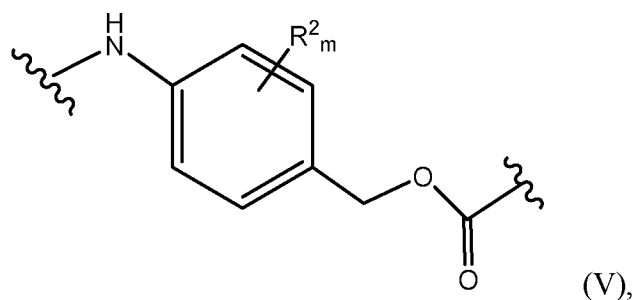
где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

29. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

30. Внеклеточная везикула по п. 29, в которой нерасщепляемый линкер содержит тетраэтиленгликоль (ТЭГ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию.

31. Внеклеточная везикула по пп. 29 или 30, в которой нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером.

32. Внеклеточная везикула по п. 31, в которой спейсерная единица имеет формулу (V):



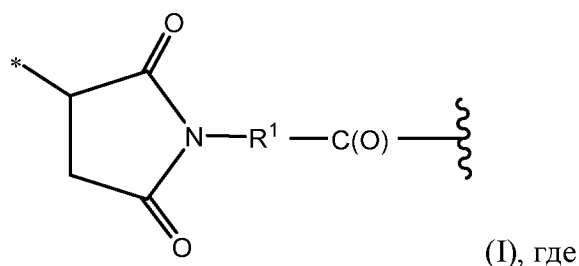
где каждый R^2 независимо представляет собой C_{1-8} алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

33. Внеклеточная везикула, содержащая биологически активную молекулу и расщепляемый линкер, причем расщепляемый линкер соединяет ВВ с биологически активной молекулой.

34. Внеклеточная везикула по п. 33, в которой расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

35. Внеклеточная везикула по пп. 33 или 34, дополнительно содержащая малеимидный фрагмент, который связывает ВВ с расщепляемым линкером посредством функциональной группы, присутствующей на ВВ.

36. Внеклеточная везикула по п. 35, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (I):



R^1 выбран из группы, состоящей из $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ карбоцикло-, $-O-(C_{1-8}$ алкилен)-, -арил-, $-C_{1-10}$ алкилен-арил-, -арил- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ карбоцикло)-, $-(C_{3-8}$ карбоцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-C_{3-8}$ гетероцикло-, $-C_{1-10}$ алкилен- $(C_{3-8}$ гетероцикло)-, $-(C_{3-8}$ гетероцикло)- $-C_{1-10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_g$ и $-(CH_2CH_2O)_g-CH_2-$;

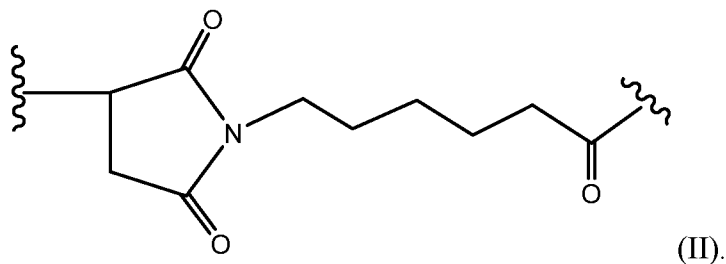
g является целым числом от 1 до 10; и

* указывает на сайт ковалентного присоединения малеимидного фрагмента к ВВ; и

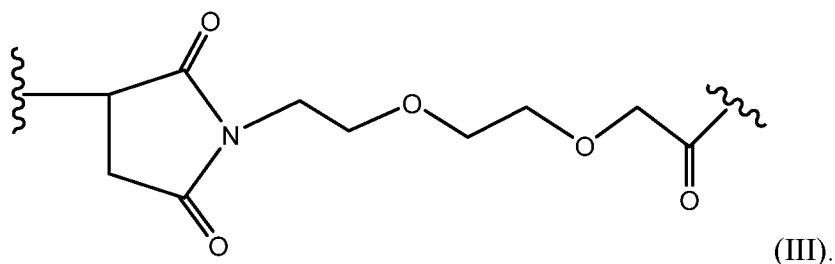
волнистая линия указывает на сайт присоединения малеимидного фрагмента к биологически активной молекуле.

37. Внеклеточная везикула по п. 36, в которой R^1 представляет собой $-(CH_2)_s-$, где s равно 4, 5 или 6.

38. Внеклеточная везикула по пп. 36 или 37, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (II), где R^1 представляет собой $-(CH_2)_5-$:



39. Внеклеточная везикула по п. 36, в которой малеимидный фрагмент имеет формулу (III), где R^1 представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где r равно 2:



40. Внеклеточная везикула по любому из пп. 34-39, в которой малеимидный фрагмент ковалентно связан с функциональной группой, присутствующей на ВВ.

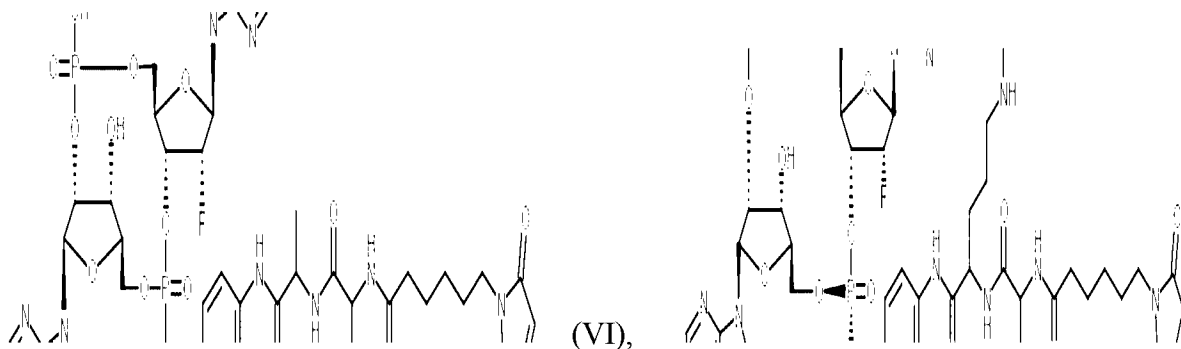
41. Внеклеточная везикула по п. 40, в которой функциональная группа находится на гликане на ВВ.

42. Внеклеточная везикула по п. 40, в которой функциональная группа представляет собой сульфгидрил.

43. Внеклеточная везикула по пп. 41 или 42, в которой функциональная группа находится на белке на поверхности ВВ.

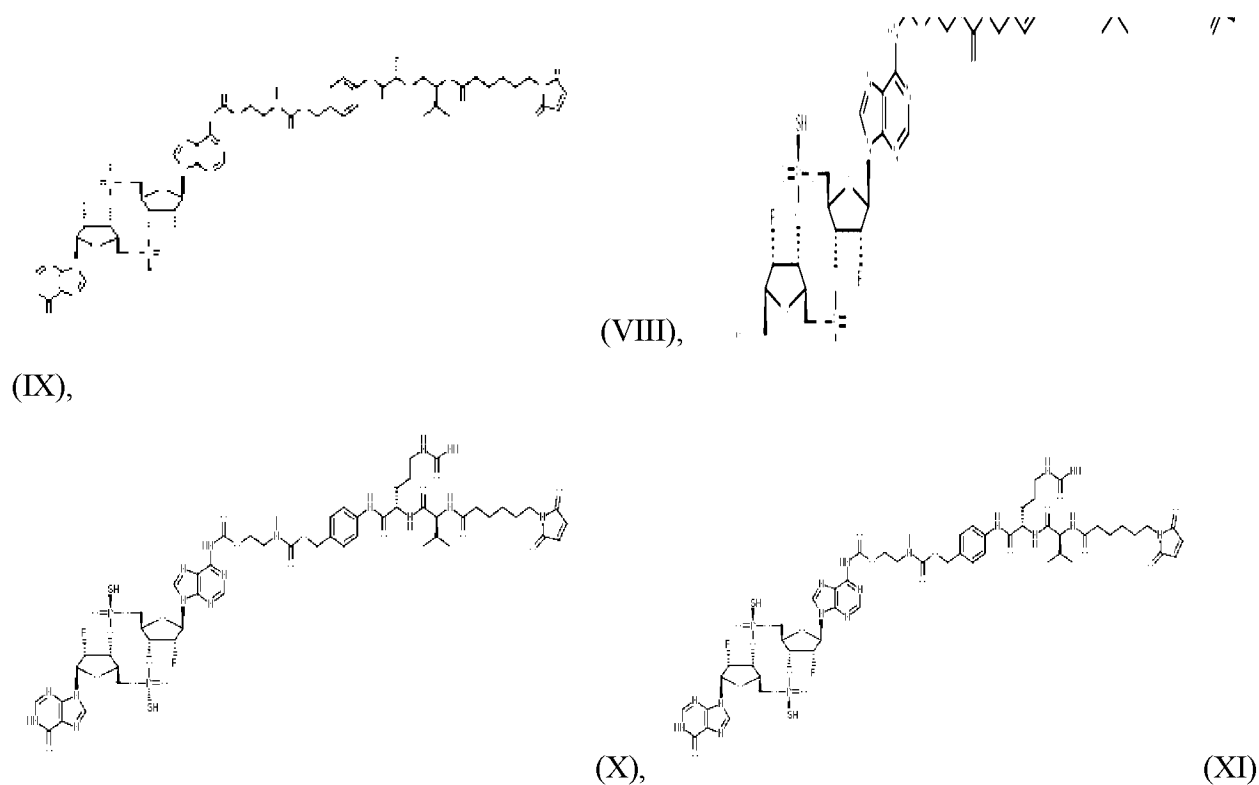
44. Внеклеточная везикула по п. 43, в которой белок представляет собой каркасный фрагмент.
45. Внеклеточная везикула по п. 44, в которой белок представляет собой полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид-переносчик АТФ или их фрагмент.
46. Внеклеточная везикула, содержащая малеимидный фрагмент, расщепляемый линкер и биологически активную молекулу, при этом малеимидный фрагмент связывает ВВ с расщепляемым линкером, а расщепляемый линкер соединяет малеимидный фрагмент с биологически активной молекулой.
47. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-46, в которой биологически активная молекула представляет собой полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение или любую их комбинацию.
48. Внеклеточная везикула по п. 47, в которой биологически активная молекула представляет собой химическое соединение.
49. Внеклеточная везикула по п. 48, в которой химическое соединение представляет собой малую молекулу.
50. Внеклеточная везикула по п. 49, в которой малая молекула представляет собой химерное соединение, нацеленное на протеолиз (PROTAC).
51. Внеклеточная везикула по п. 47, в которой биологически активная молекула представляет собой нуклеотид, причем нуклеотид является агонистом стимулятора генов интерферона (STING).
52. Внеклеточная везикула по п. 51, в которой агонист STING включает циклический динуклеотидный агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING.

53. Внеклеточная везикула по п. 52, содержащая (малеимидный фрагмент)-(расщепляемый линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (VI) или (VII):



(VII) или их фармацевтически приемлемую соль.

54. Внеклеточная везикула по п. 52, содержащая (малеимидный фрагмент)-(расщепляемый линкер)-(биологически активную молекулу), имеющие формулу (VIII), (IX), (X) или (XI):



или их фармацевтически приемлемую соль.

55. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-5, 8-32 и 35-45, причем ВВ модифицирована для экспонирования функциональной группы на поверхности для ковалентного связывания малеимидного фрагмента.

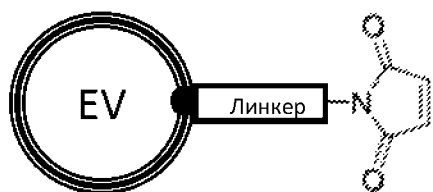
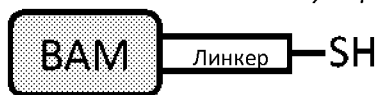
56. Внеклеточная везикула по п. 55, в которой функциональная группа представляет собой сульфгидрильную группу.
57. Внеклеточная везикула по п. 56, в которой функциональная группа экспонируется с помощью обработки ВВ восстанавливающим агентом.
58. Внеклеточная везикула по п. 57, в которой восстанавливающий агент включает ТСЕР (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин), DTT (дителиотреитол), ВМЕ (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент или любую их комбинацию.
59. Внеклеточная везикула по п. 58, в которой тиолирующий агент представляет собой реагент Траута (2-иминотиолан).
60. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-59, в которой ВВ представляет собой экзосому.
61. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому из пп. 1-60, и фармацевтически приемлемый носитель.
62. Способ конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, включающий связывание малеимидного фрагмента с ВВ.
63. Способ по п. 62, в котором связывание включает обработку ВВ восстанавливающим агентом.
64. Способ по п. 63, в котором восстанавливающий агент представляет собой ТСЕР (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин), DTT (дителиотреитол), ВМЕ (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент или любую их комбинацию.
65. Способ по п. 64, в котором тиолирующий агент представляет собой реагент Траута (2-иминотиолан).
66. Способ по любому из пп. 62-65, в котором связывание дополнительно включает приведение восстановленной ВВ в контакт с малеимидным фрагментом.

67. Способ по п. 66, в котором малеимидный фрагмент связан с биологически активной молекулой до связывания с ВВ.
68. Способ по п. 67, в котором малеимидный фрагмент дополнительно присоединен к линкеру для соединения малеимидного фрагмента с биологически активной молекулой.
69. Набор, содержащий ВВ по любому из пп. 1-60, и инструкцию по применению.
70. Набор, содержащий реагенты для конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, и инструкцию по проведению конъюгации, за счет чего образуется ВВ по любому из пп. 1-60.
71. Способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту ВВ по любому из пп. 1-60.
72. Способ по п. 71, в котором заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное нарушение, нейродегенеративное нарушение, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ.
73. Способ по пп. 71 или 72, в котором ВВ вводят внутривенно, внутривентриально, назально, перорально, внутримышечно, подкожно, парентерально, внутриопухолево, интратекально или интраокулярно.
74. Внемембранная везикула (ВВ), содержащая по меньшей мере одну биологически активную молекулу, ковалентно связанную с каркасным фрагментом посредством малеимидного фрагмента.
75. Внемембранная везикула по п. 74, в которой малеимидный фрагмент представляет собой бифункциональную молекулу.
76. Внемембранная везикула по пп. 74 или 75, в которой малеимидный фрагмент содержит по меньшей мере один линкер или спейсер.
77. Внемембранная везикула по п. 76, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.

78. Внеклеточная везикула по любому из пп. 74-77, в которой каркасный фрагмент представляет собой каркасный белок или каркасный липид.
79. Внеклеточная везикула по п. 78, в которой каркасный белок представляет собой белок каркаса X.
80. Внеклеточная везикула по п. 79, в которой белок каркаса X представляет собой полипептид PTGFRN, полипептид BSG, полипептид IGSF2, полипептид IGSF3, полипептид IGSF8, полипептид ITGB1, полипептид ITGA4, полипептид SLC3A2, полипептид-переносчик АТФ или их фрагмент.
81. Внеклеточная везикула по любому из пп. 74-80, в которой биологически активная молекула представляет собой антиген вакцины, адъювант вакцины или любую их комбинацию.
82. Внеклеточная везикула по любому из пп. 74-80, в которой биологически активная молекула включает STING, ASO, синтетический противоопухолевый агент (например, MMAE), ингибитор высвобождения цитокинов (например, MCC950), ингибитор mTOR (например, рапамицин), ингибитор аутотаксина (например, PAT409), антагонист LPA1 (например, AM152) или любую их комбинацию.
83. Внеклеточная везикула по любому из пп. 74-82, причем внеклеточная везикула дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма, антифагоцитарный сигнальный фрагмент или любую их комбинацию.
84. Внеклеточная везикула по п. 83, в которой нацеливающий фрагмент, фрагмент тропизма, антифагоцитарный сигнальный фрагмент или их комбинация связаны с внеклеточной везикулой посредством малеимидного фрагмента.

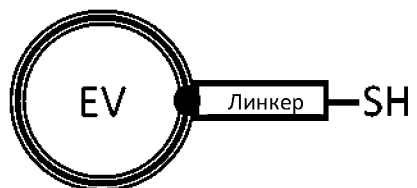
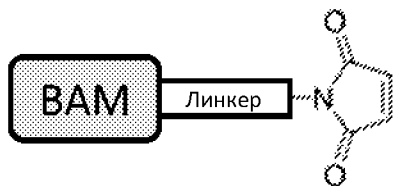
Биологически активная молекула

Сульфгидрил (тиол)

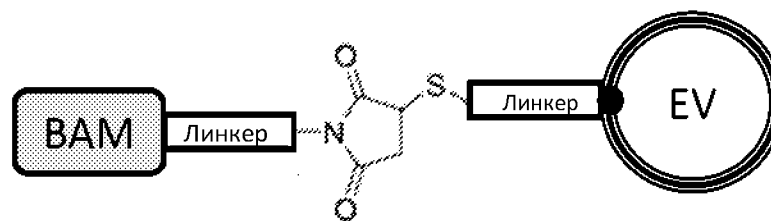
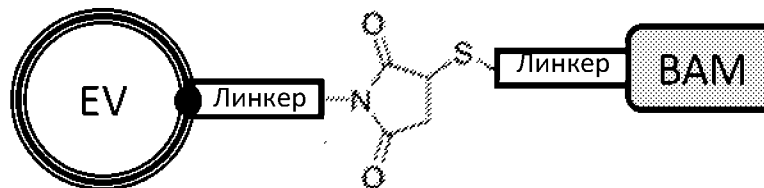


Внеклеточная везикула (например, экзосома)

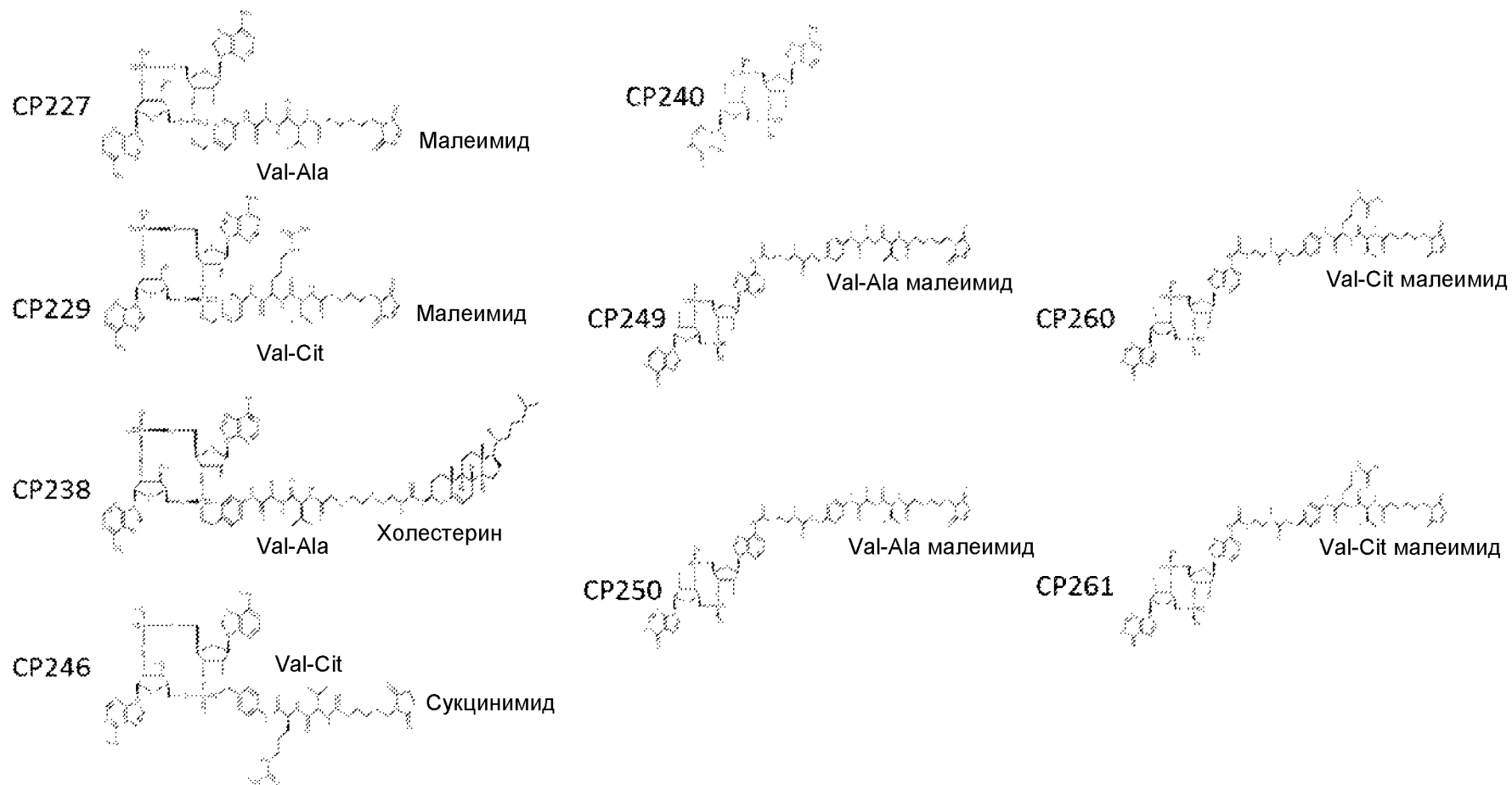
Малеимидный фрагмент



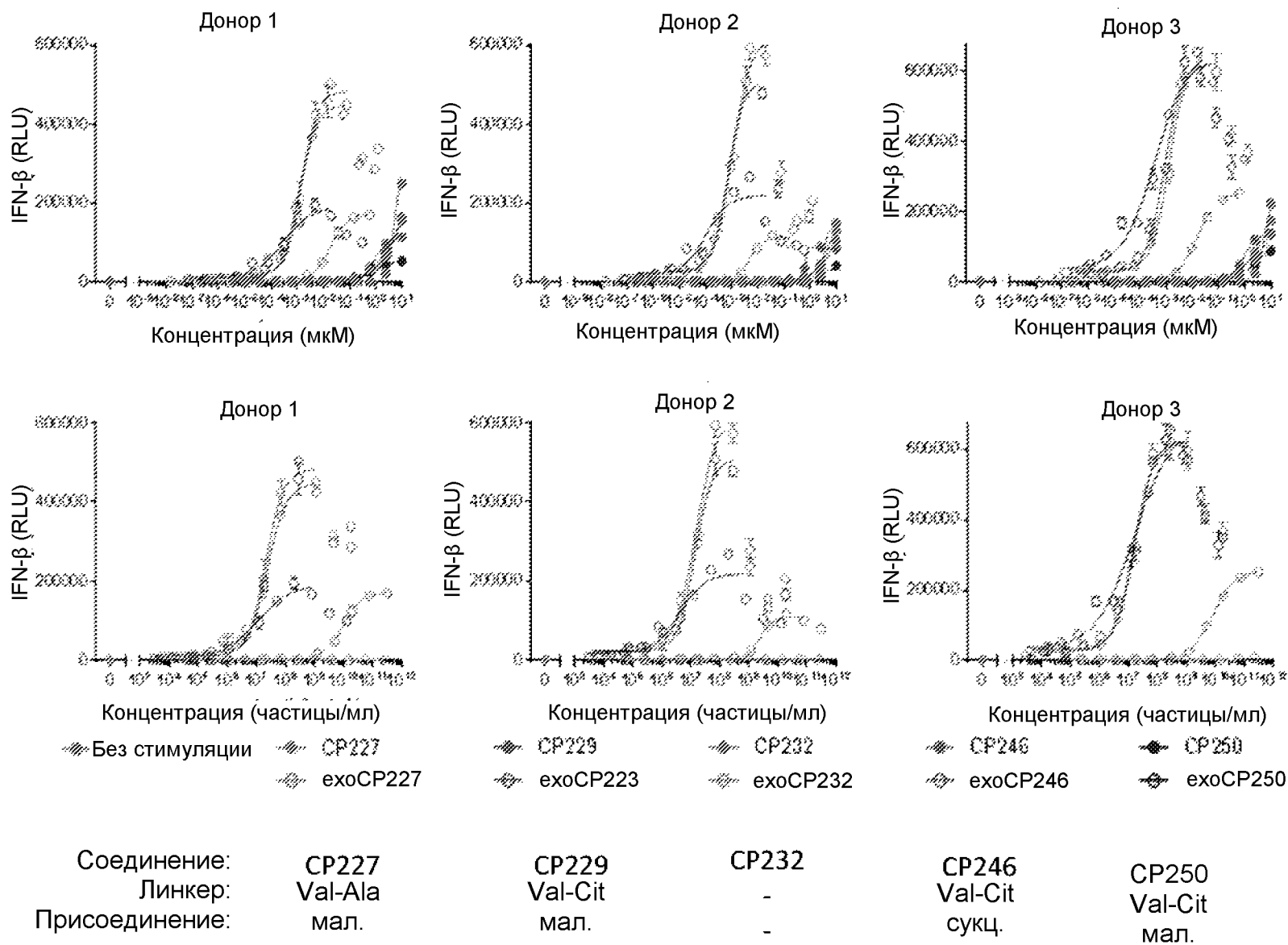
Каркасный фрагмент (например, белковый или липидный каркас)



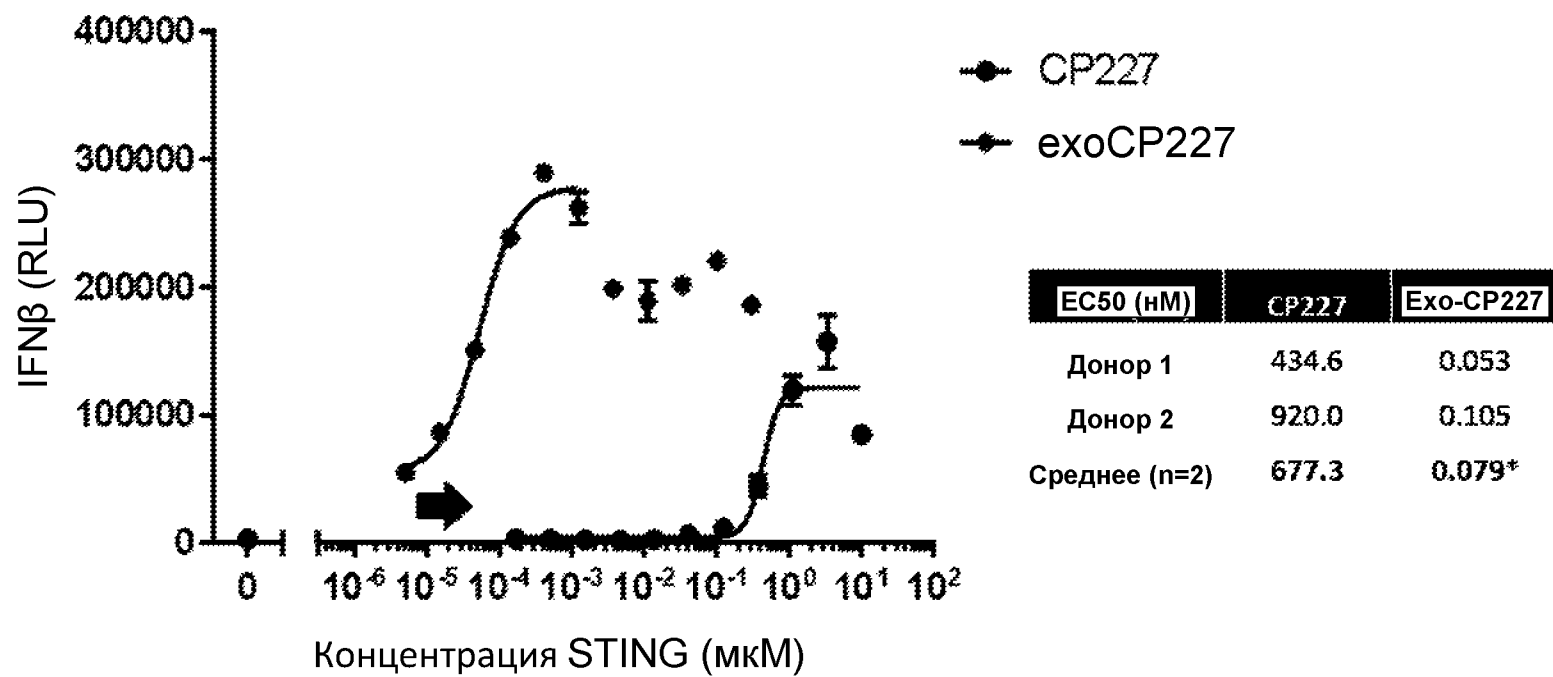
Фиг. 1А



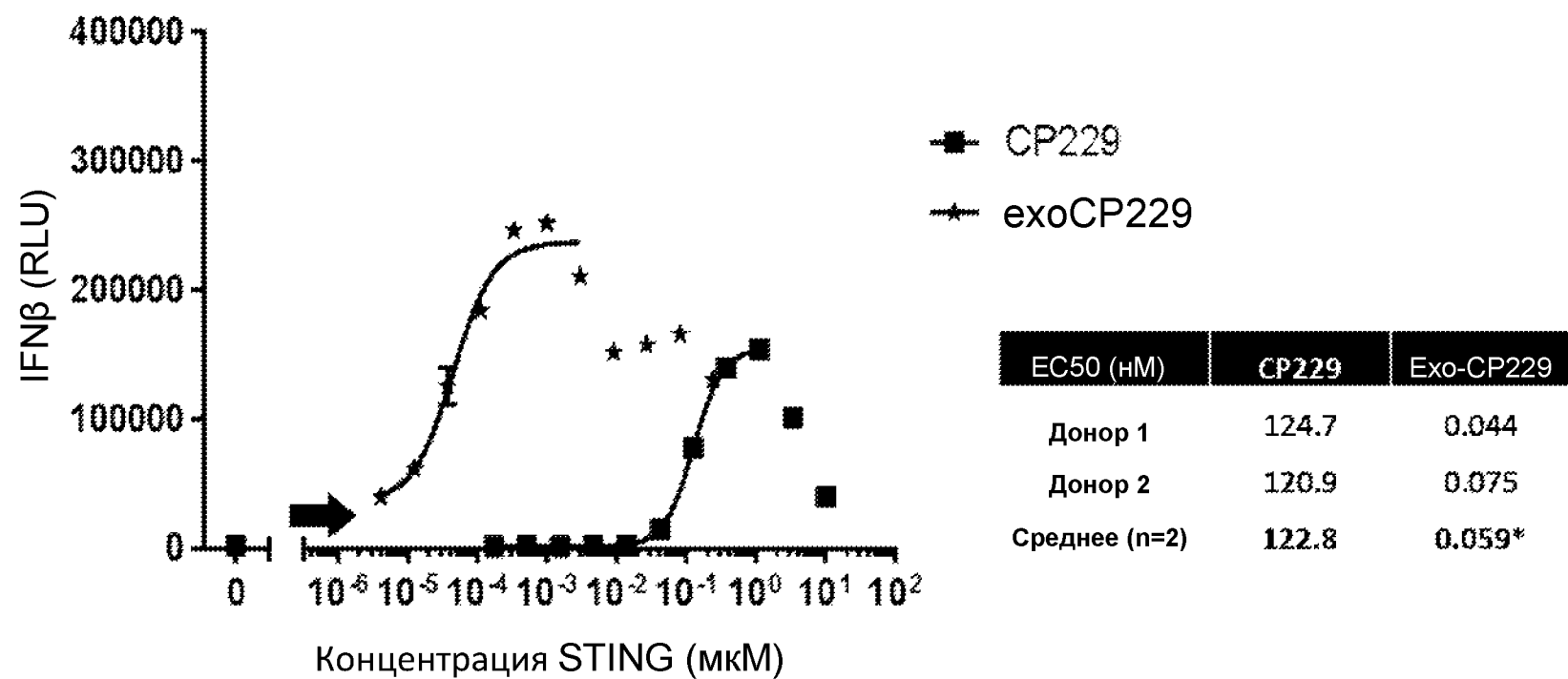
Фиг. 1В



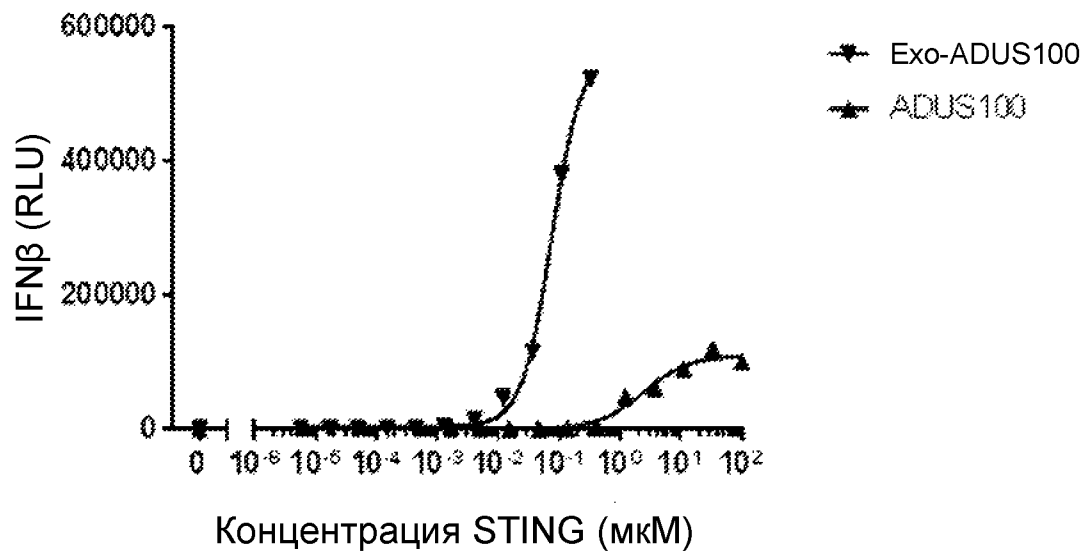
Фиг. 2



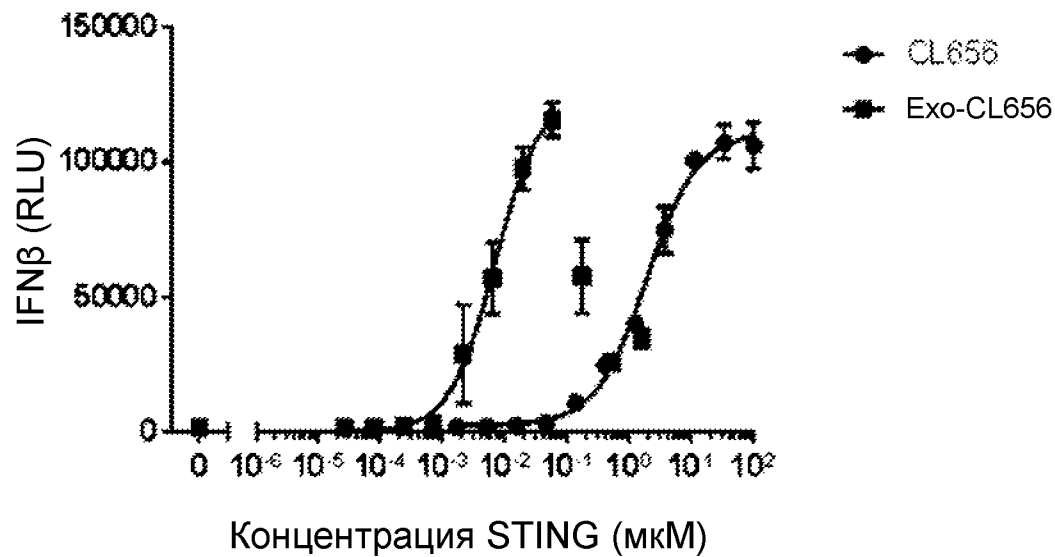
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4А



Фиг. 4В

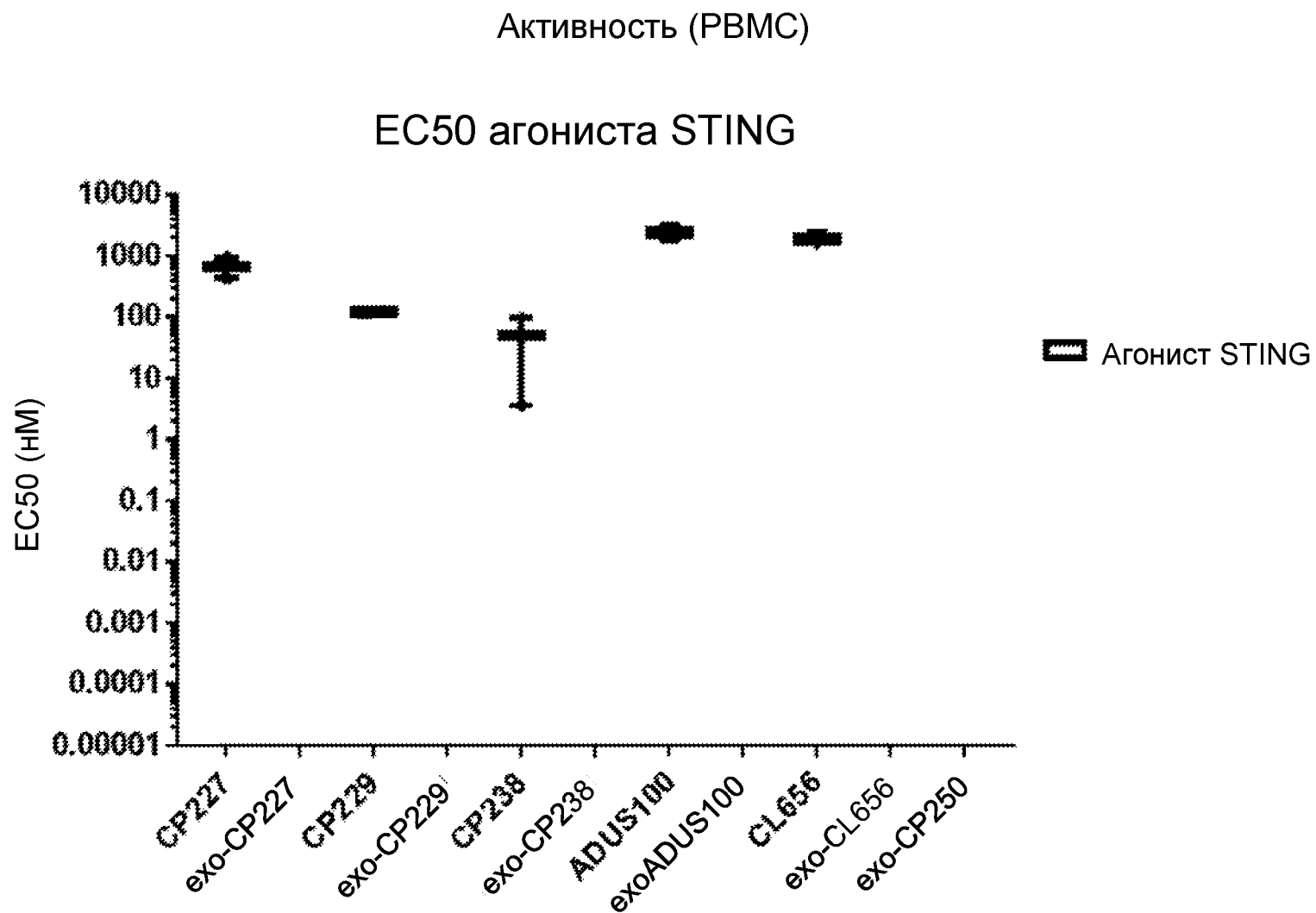
EC50 (нМ)	Свободное лекарственное средство	Exo-STING	Кратность повышения активности
ADUS100	2406	75.000	32
CL656	1899	2.400	791
CP227	677	0.079	8570
CP229	122	0.059	2068
CP238	49	1.665	29

Фиг. 4С

Образец	Реакционноспособная группа	Молекулы-агонисты/EV	
		(Экс. 1)	(Экс. 2)
exoCP227	Малеимид	64700	*42700
exoCP229	Малеимид	44500	31 700
exoCP250	Малеимид		15100
exoCP238	Холестерин	1600	
exoCP232	Отсутствует		1100
exoCP246	Сукцинимид		250

*Образец имел значение выше ULOQ - вероятно выше указанного значения

Фиг. 5А



Фиг. 5В

ММАЕ (монометил ауристатин Е)

CID в PubChem:

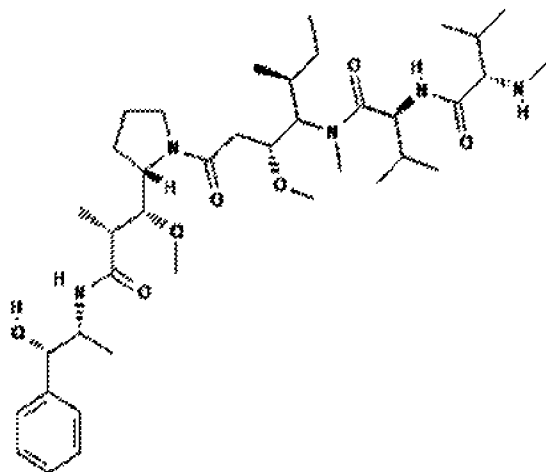
Молекулярная формула:

Молекулярная масса

53297465

$C_{39}H_{67}N_5O_7$

717993



Фиг. 6

mc-vc-PABC-MMAE

CID соединения:

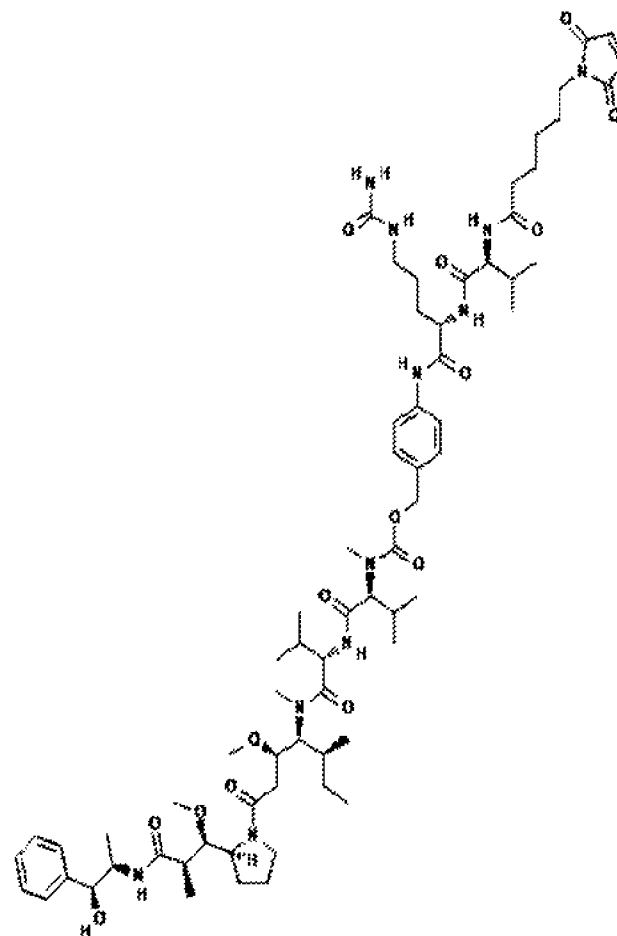
Молекулярная

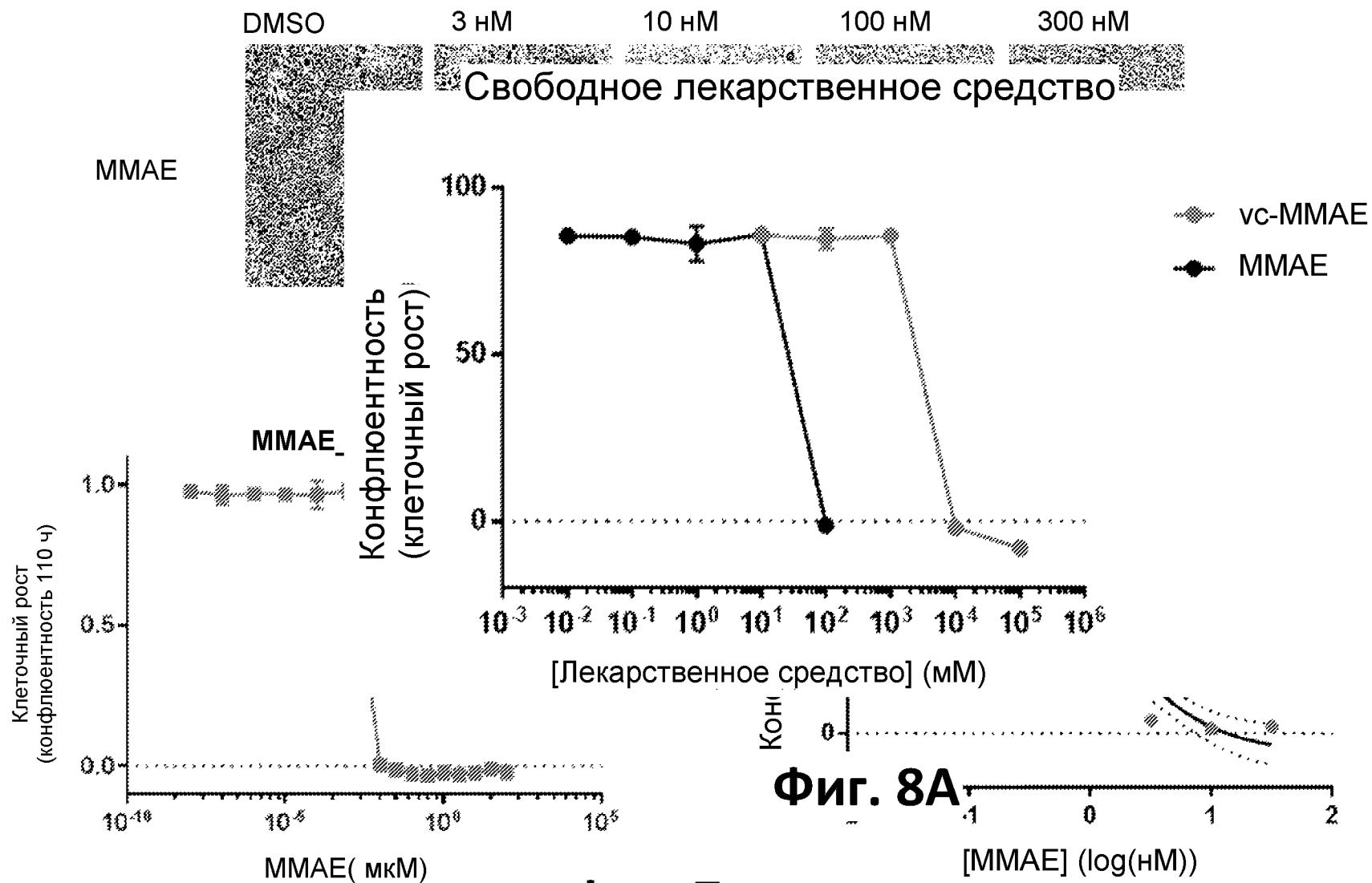
формула:

46944733

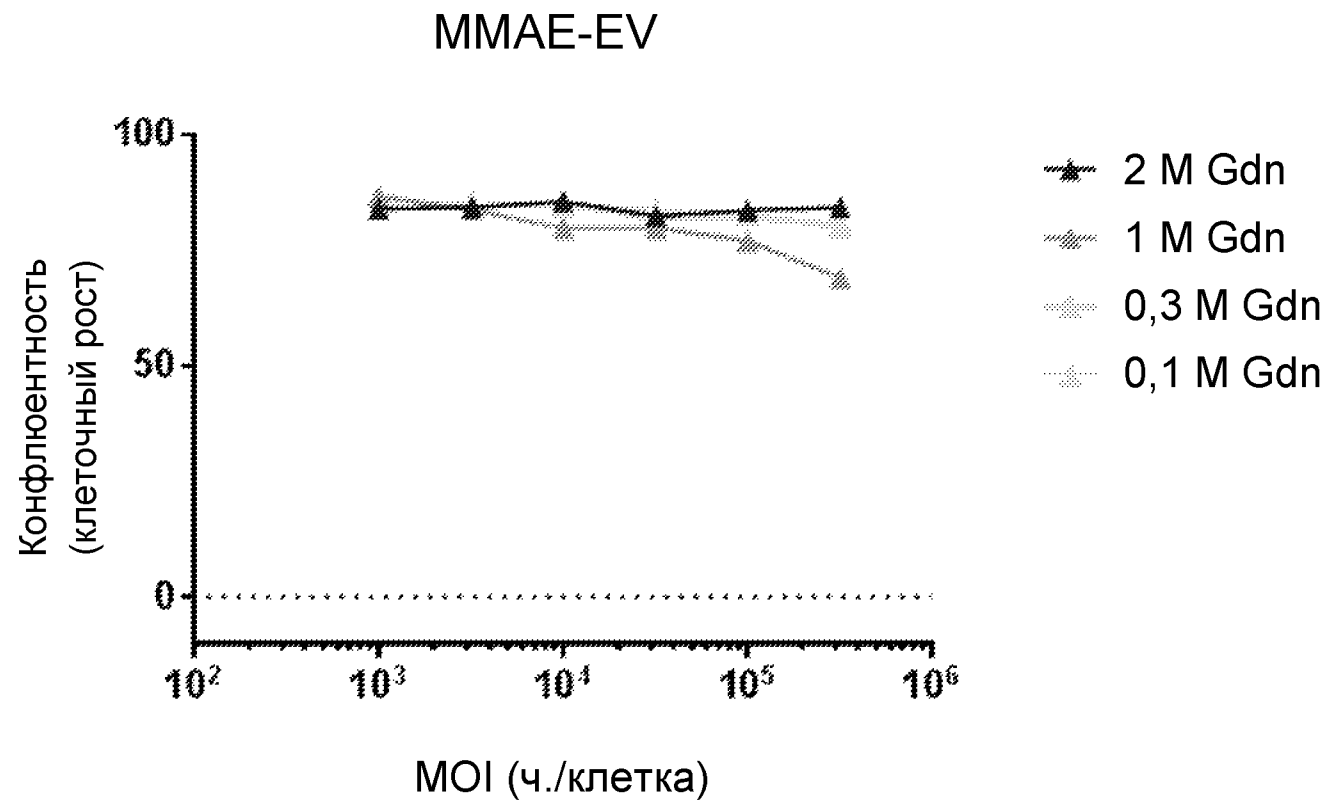
$C_{68}H_{105}N_{11}O_{15}$

1316,65

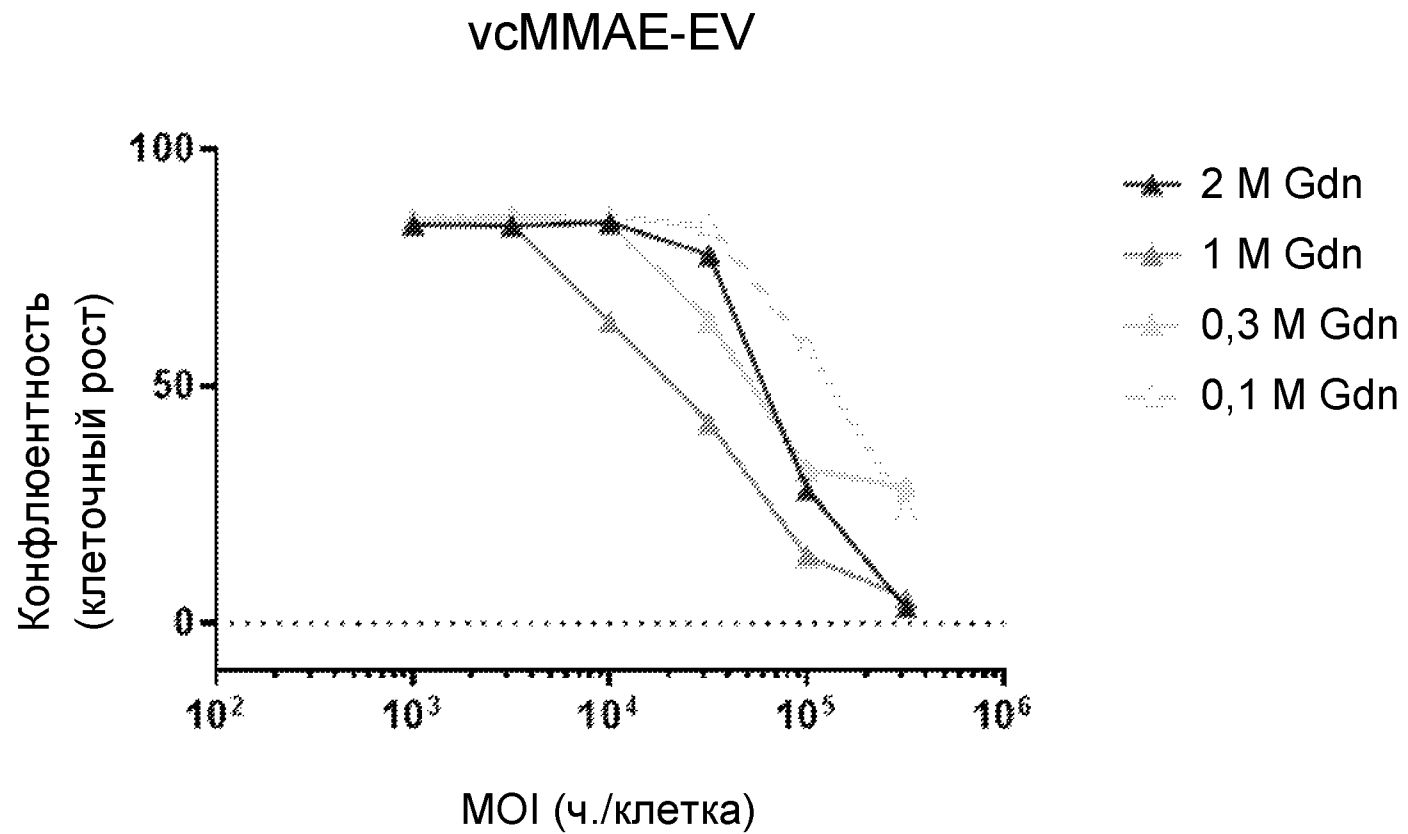




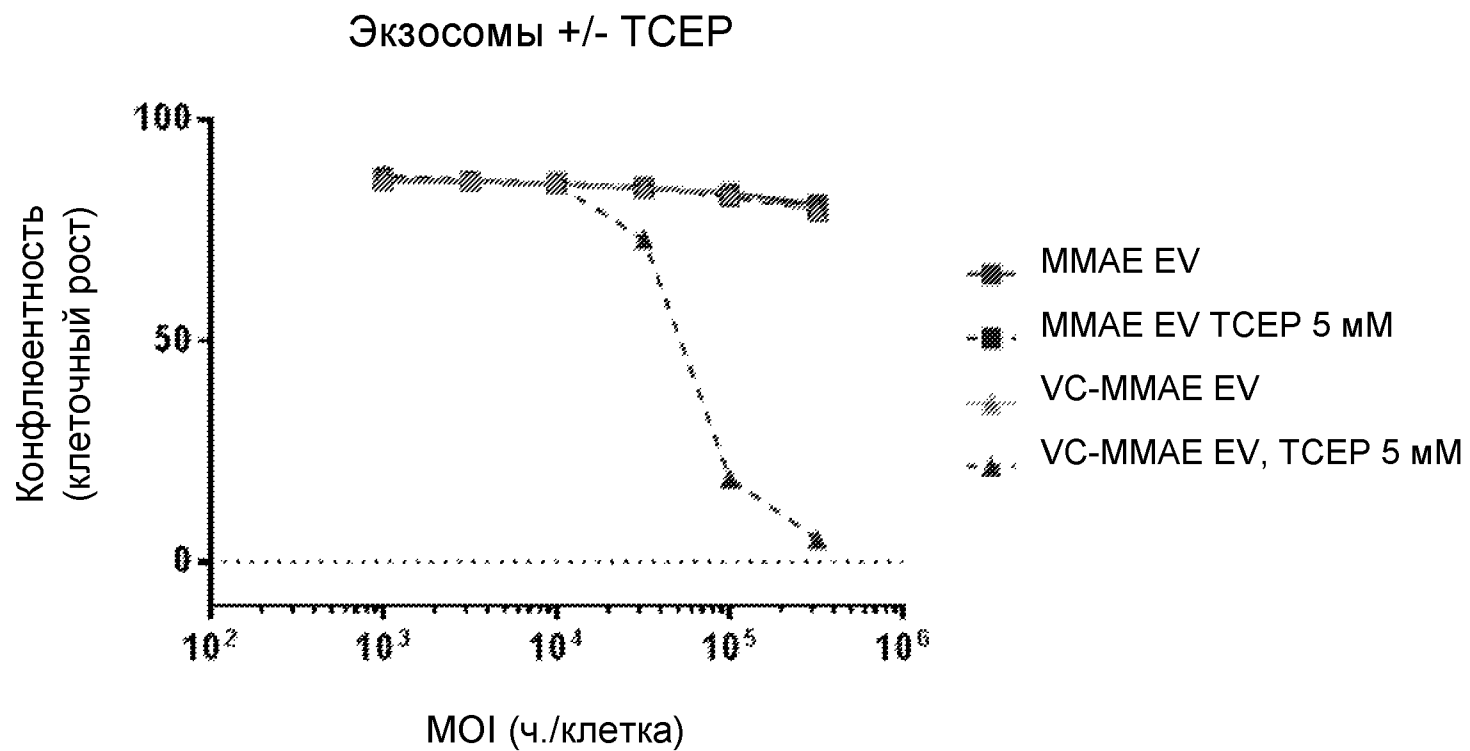
Фиг. 7



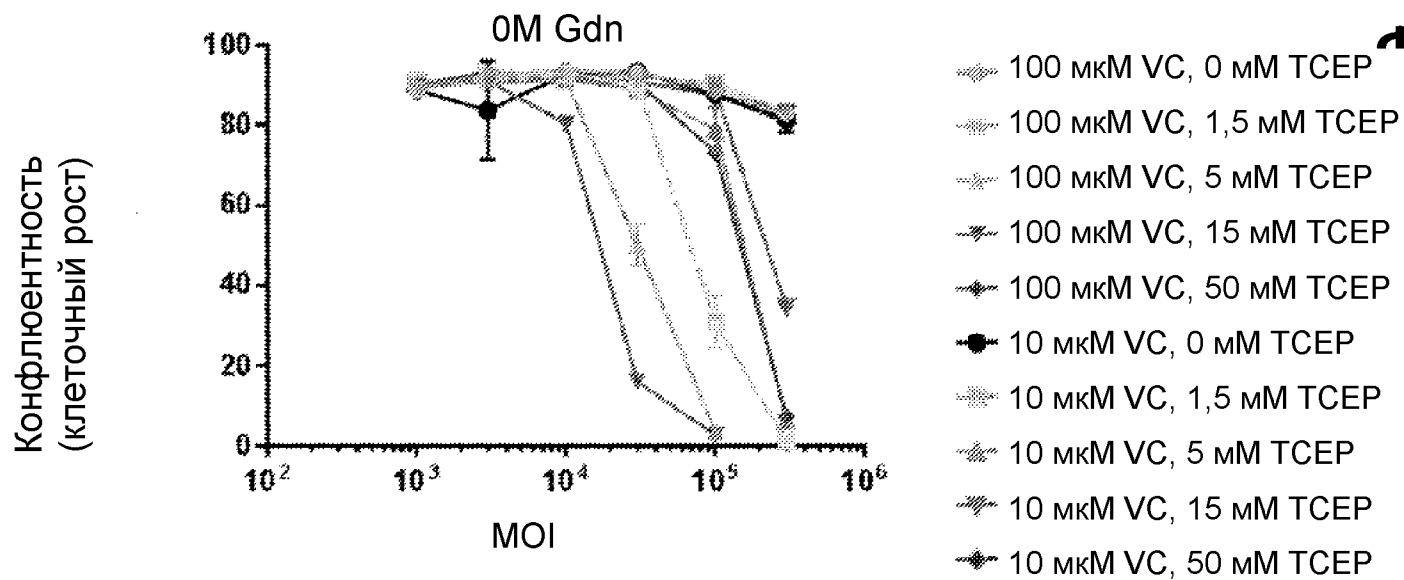
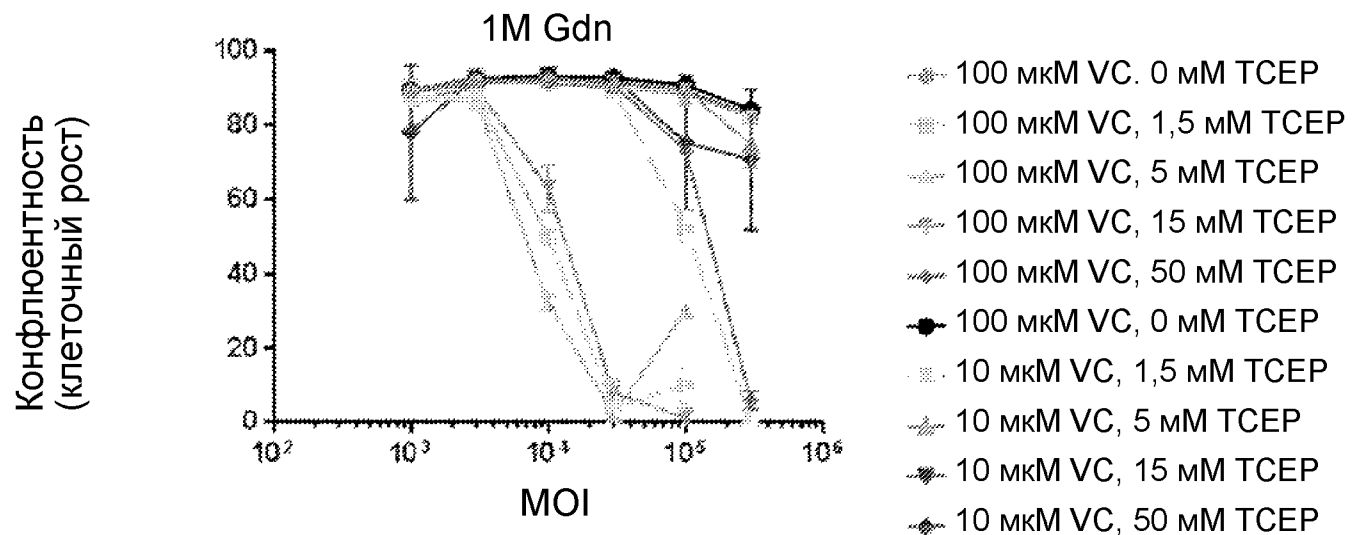
Фиг. 8В



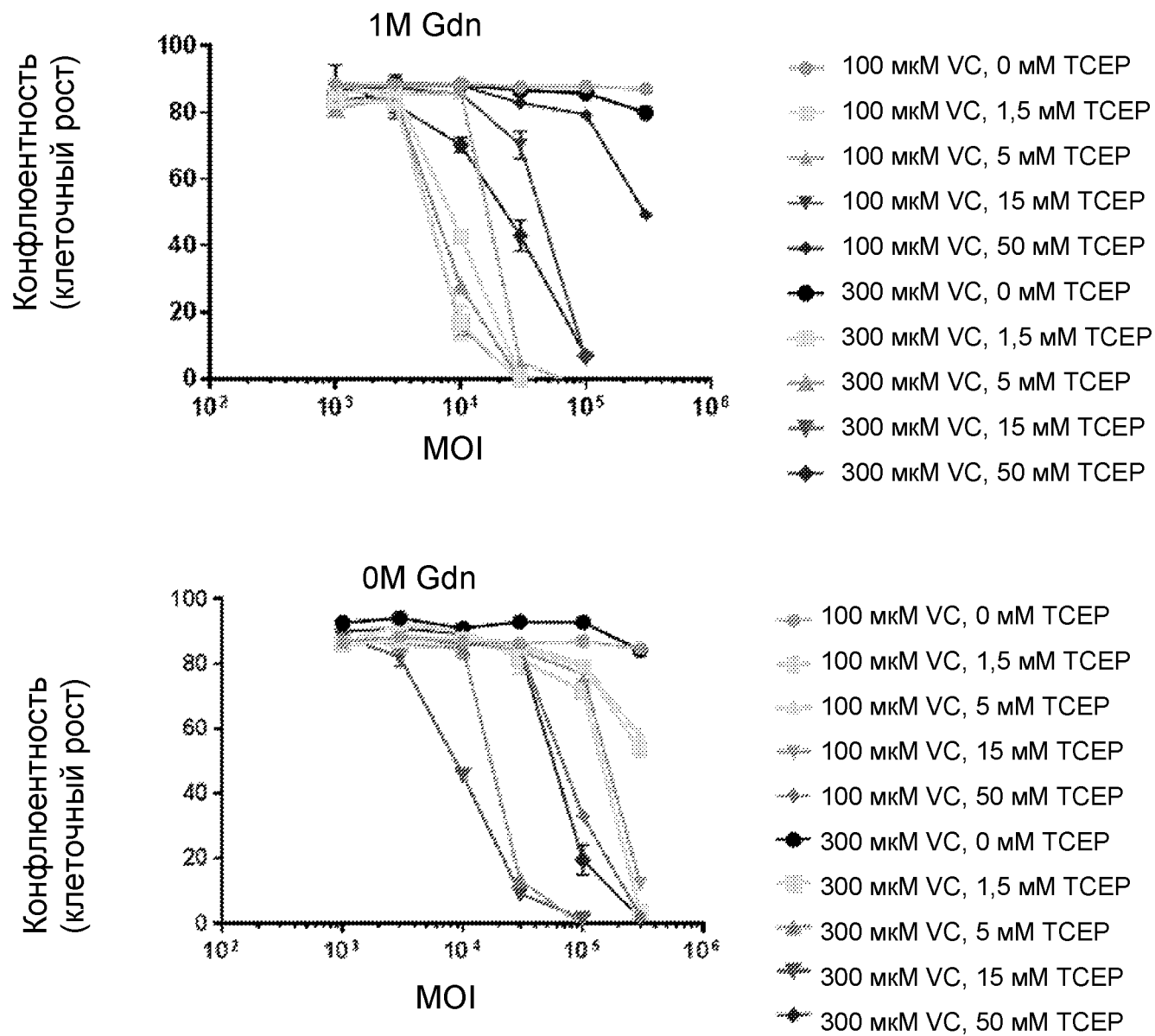
Фиг. 8С



Фиг. 8D

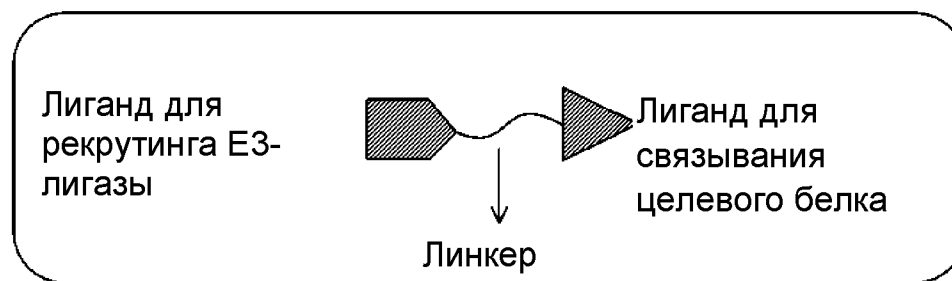


Фиг. 9А

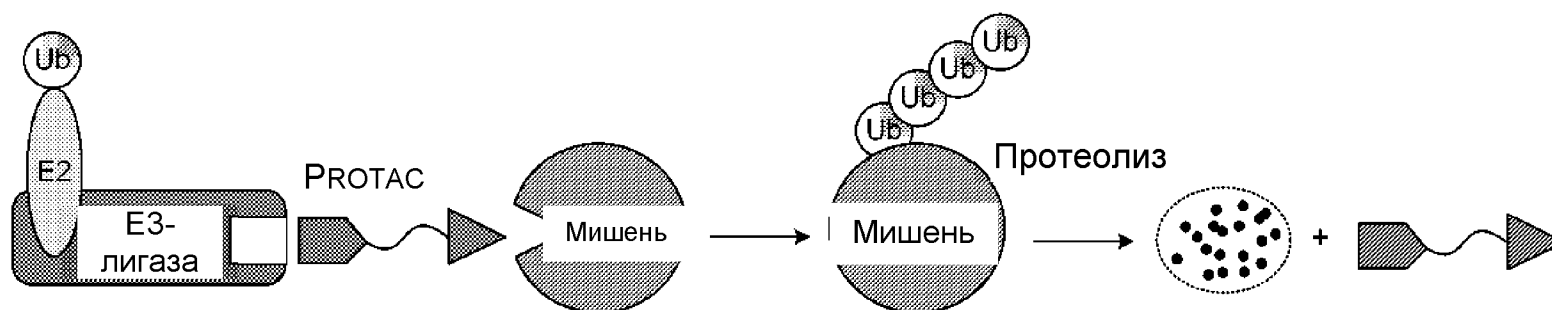


Фиг. 9В

Фиг. 10А

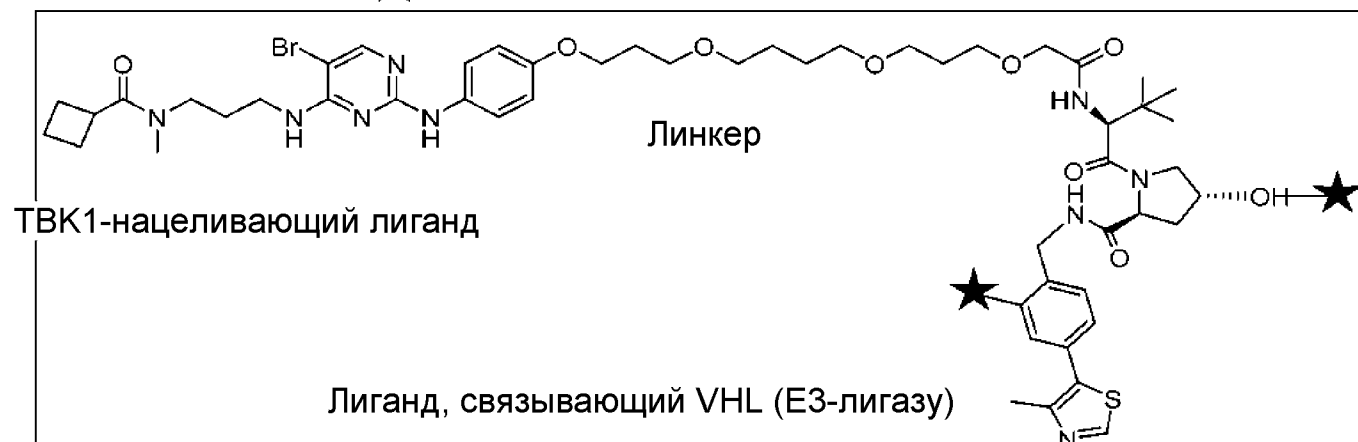


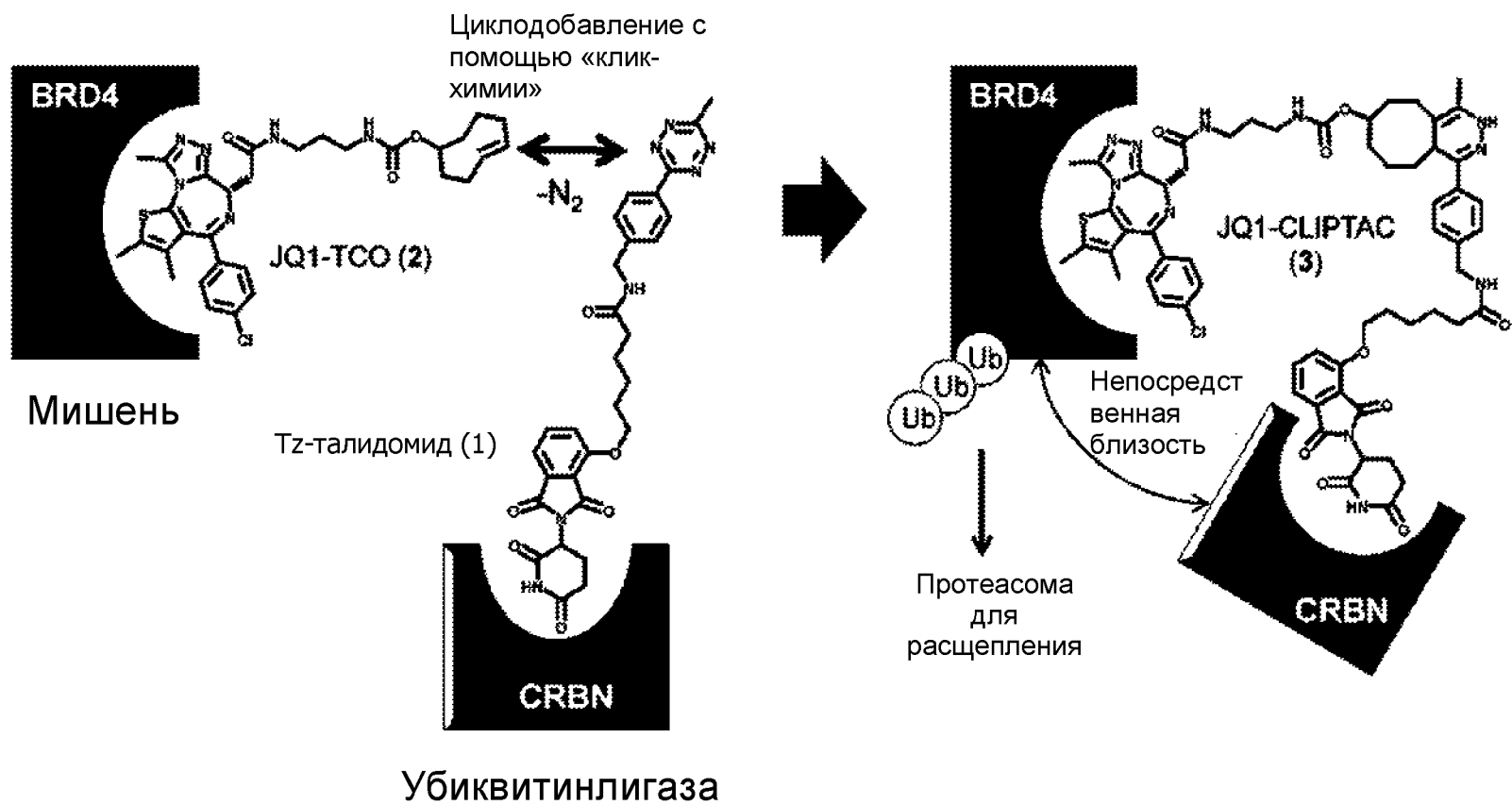
Фиг. 10В



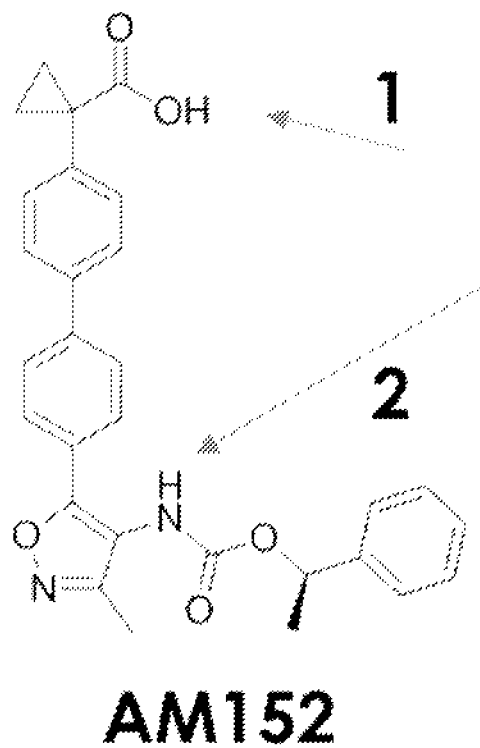
★ Сайты присоединения линкера малеимид-VA

Фиг. 10С

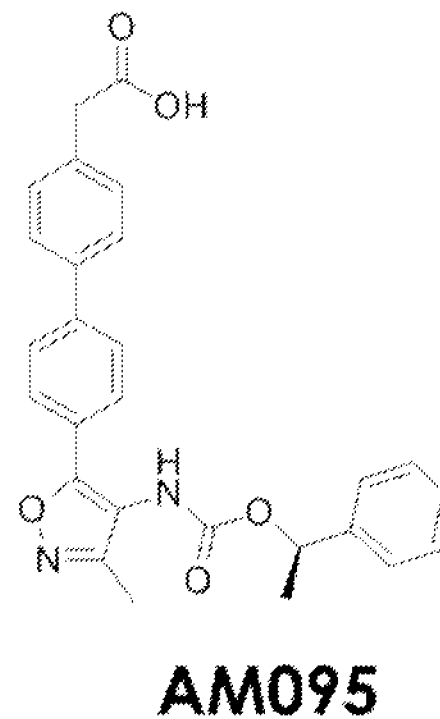




Фиг. 11

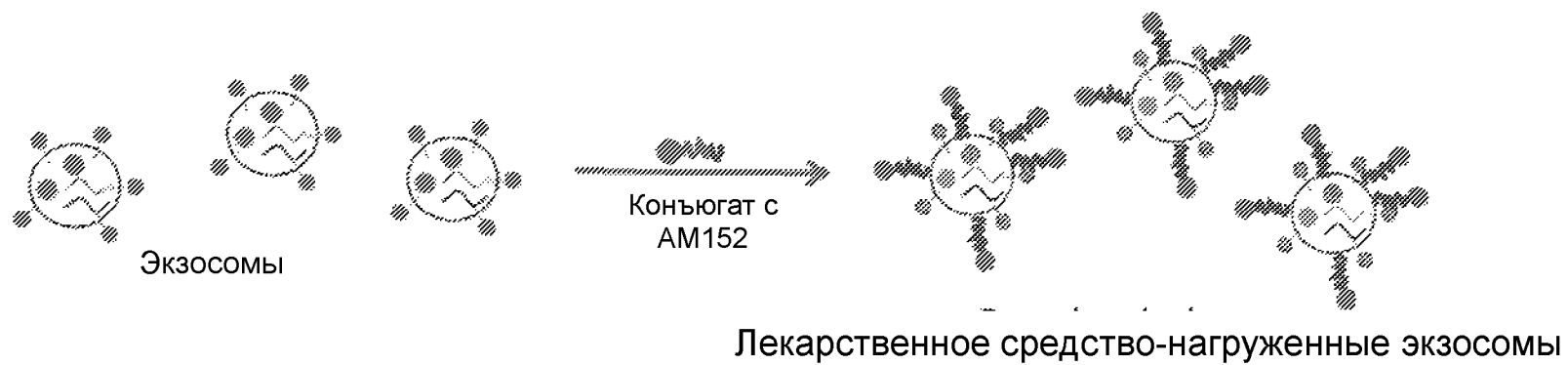


Малеимидные
конъюгаты

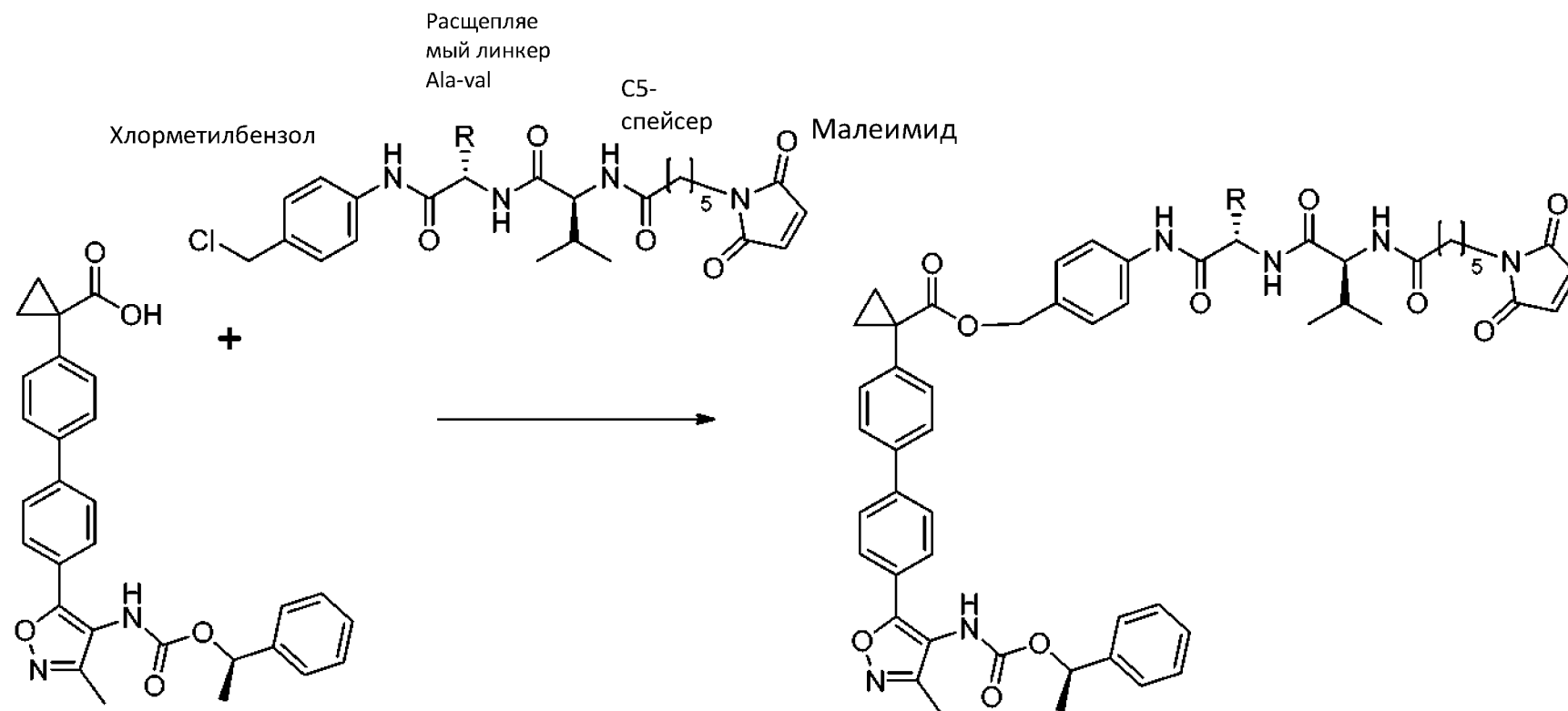


Фиг. 12

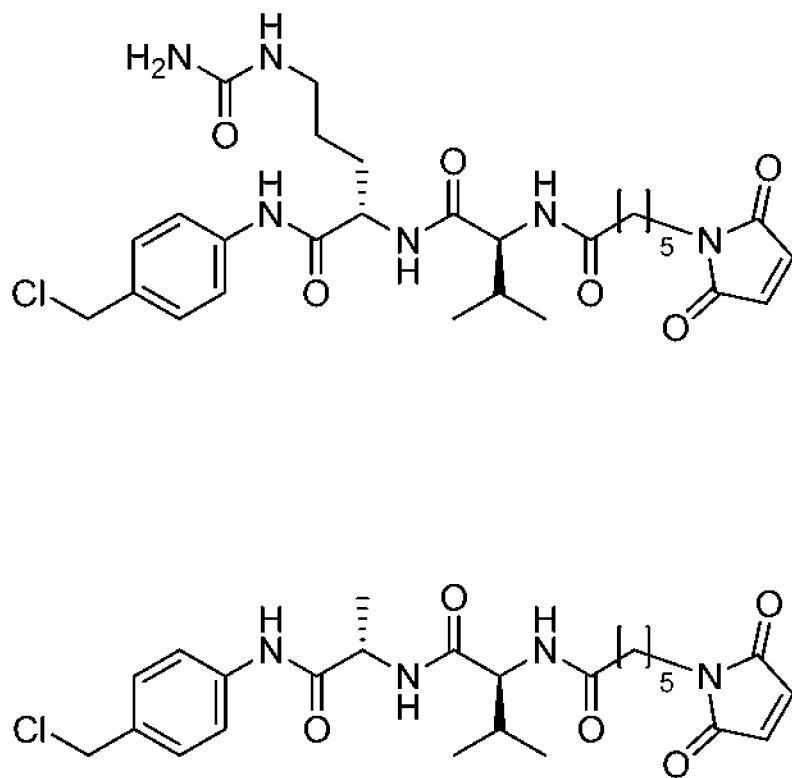
Конъюгирование экзосом и доставка AM152



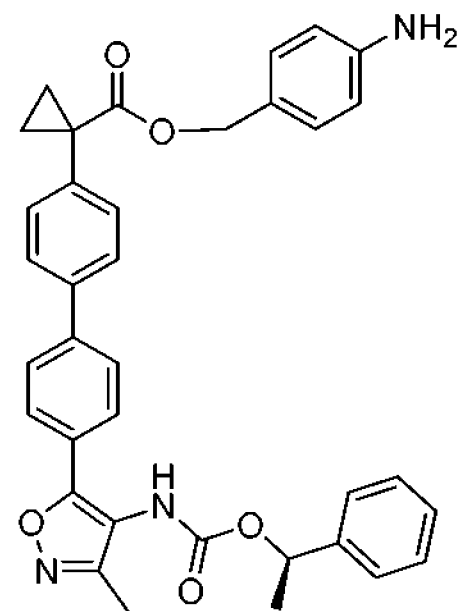
Фиг. 13



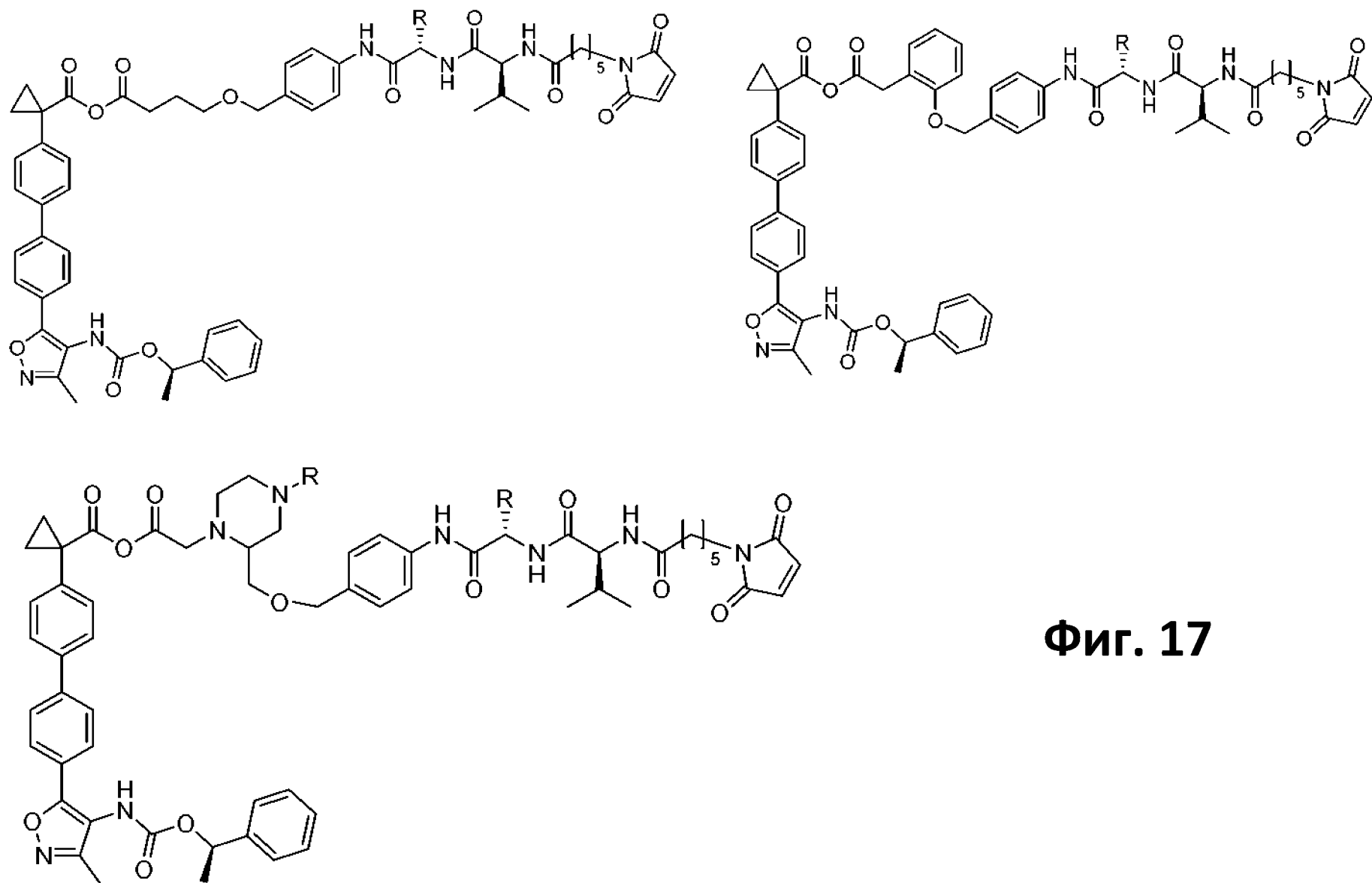
Фиг. 14



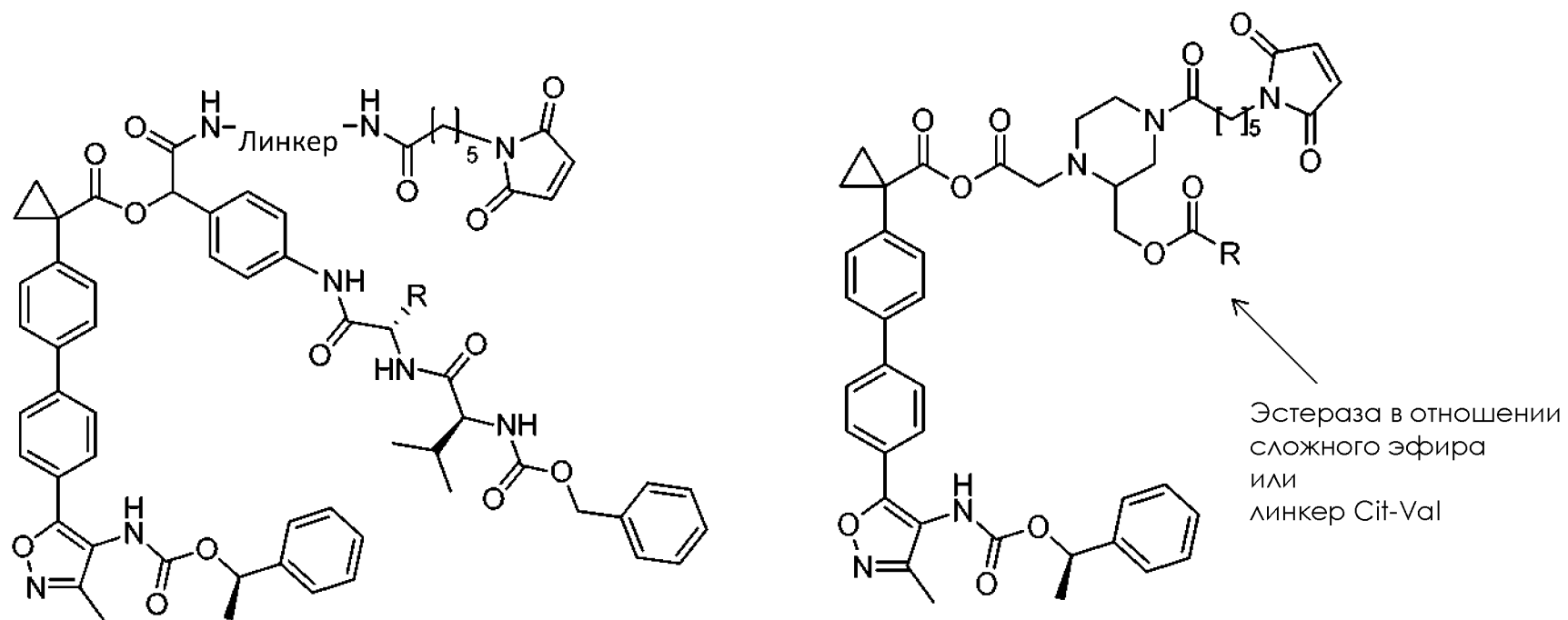
Фиг. 15



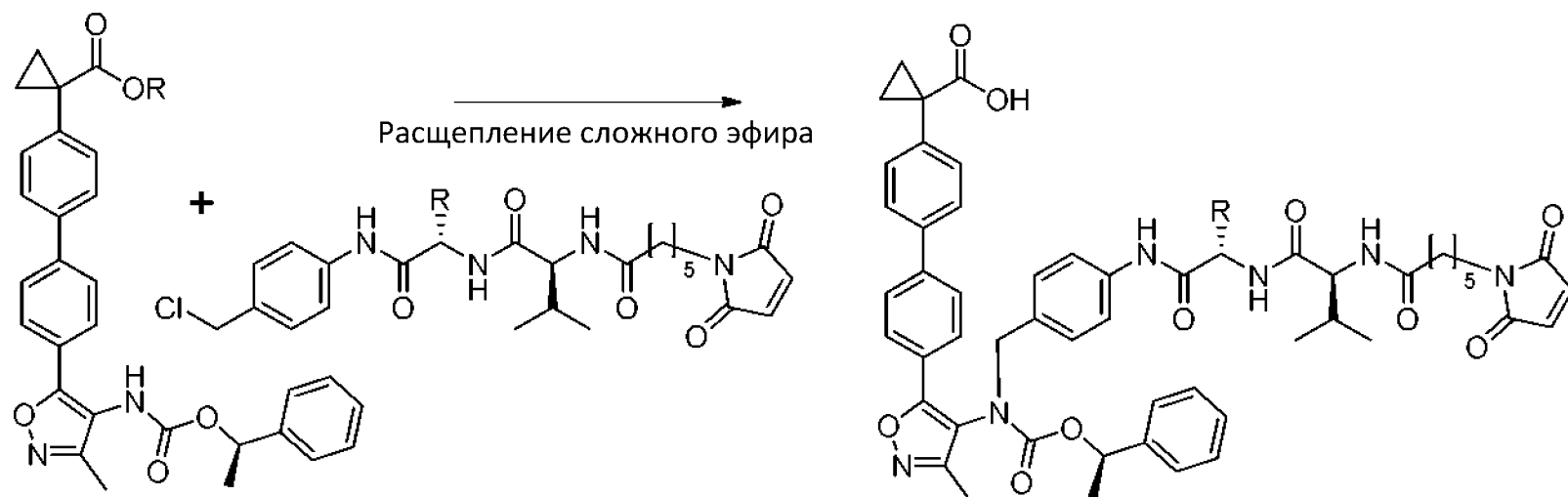
Фиг. 16



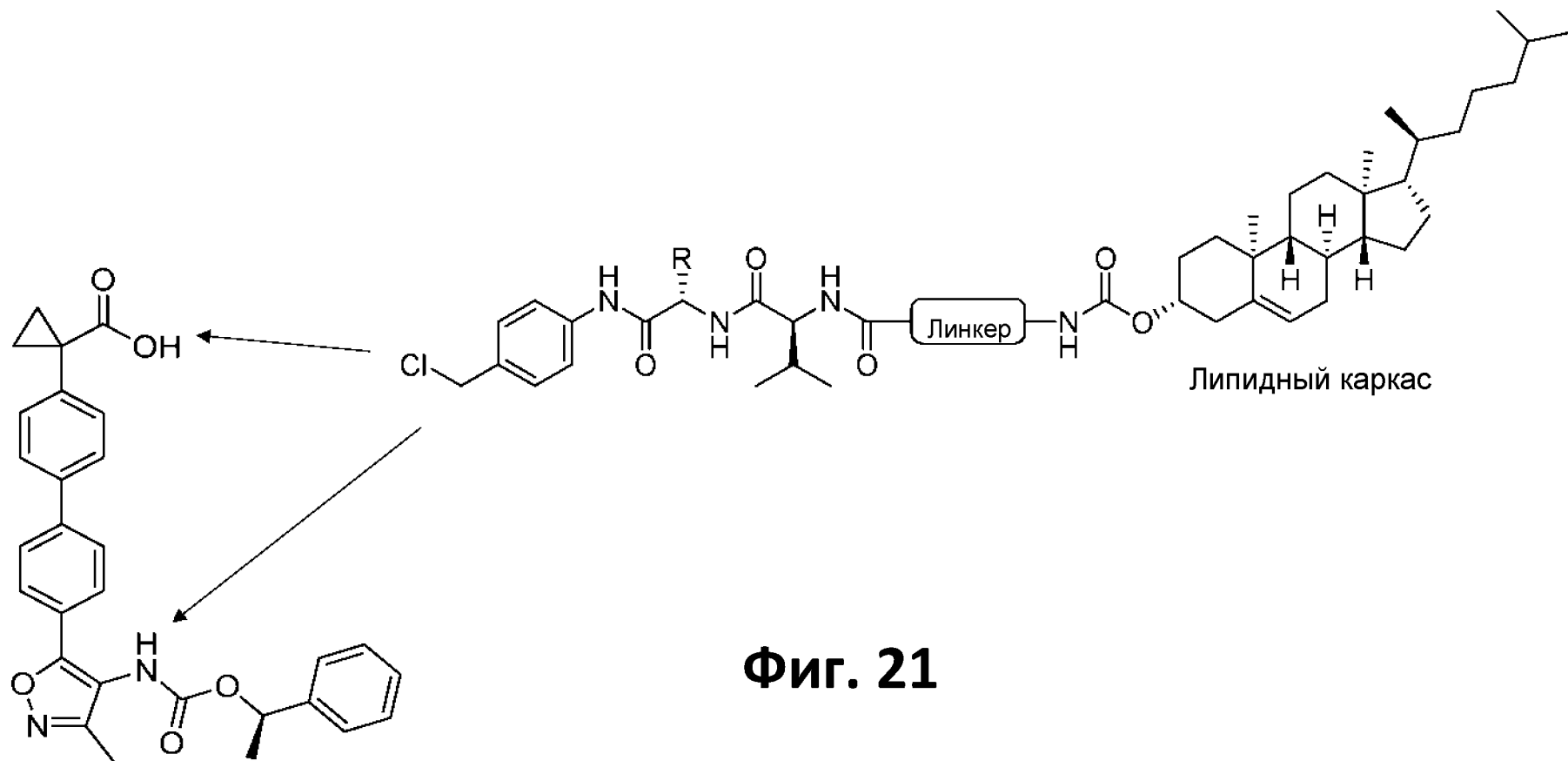
Фиг. 17



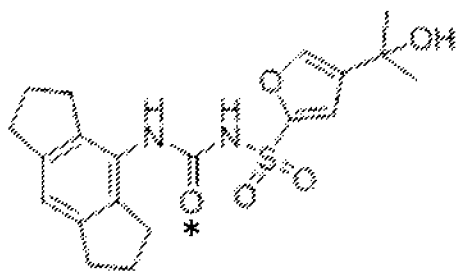
Фиг. 18



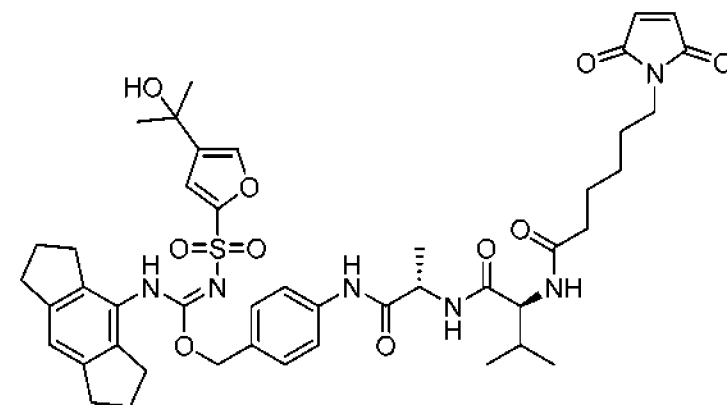
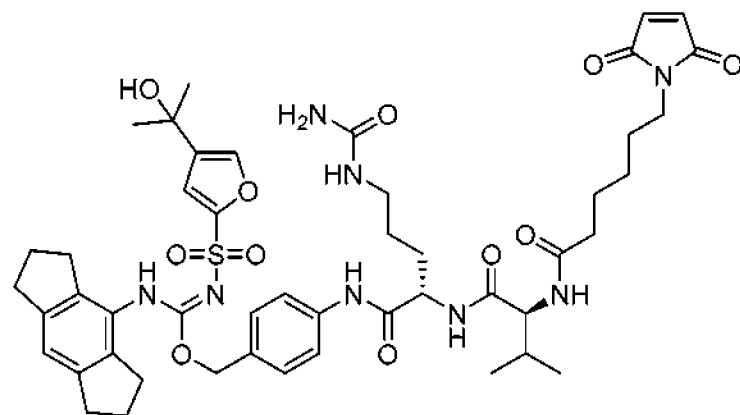
Фиг. 19



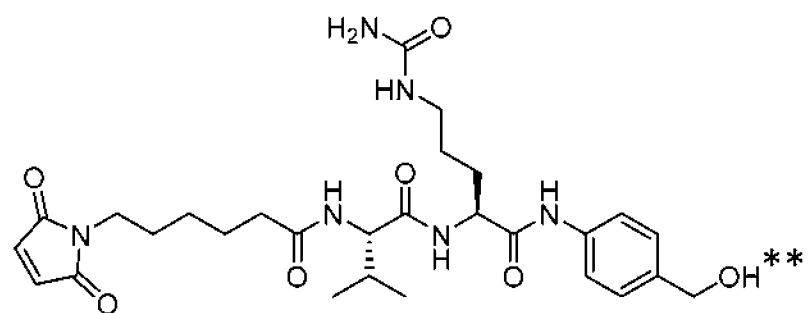
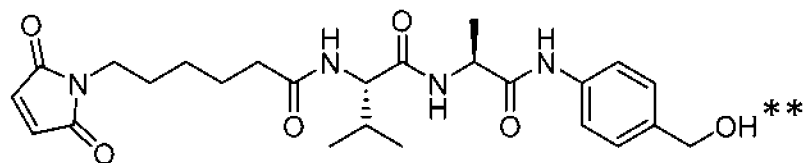
Фиг. 21



MCC950
(ИНГИБИТОР ИНФЛАММАСОМЫ NLRP3)



ПРОИЗВОДНЫЕ МАЛЕИМИД-MCC950



БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

Фиг. 22