

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290481 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.16

(51) Int. Cl. A61K 47/69 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(54) ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ВЕЗИКУЛА, СВЯЗАННАЯ С МОЛЕКУЛАМИ, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/886,941; 62/895,398

(32) 2019.08.14; 2019.09.03

(33) US

(86) PCT/US2020/046560

(87) WO 2021/030777 2021.02.18

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

(72) Изобретатель:

Чжан И, Нойес Аарон Р., Боутин
Адам Т. (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Парамонова 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 якорного фрагмента, которые могут быть применимы в качестве средства для профилактики или лечения рака или других заболеваний. В изобретении также предложены способы получения внеклеточных везикул и способы применения внеклеточных везикул для лечения заболеваний или нарушений.

A1

202290481

202290481

A1

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ВЕЗИКУЛА, СВЯЗАННАЯ С МОЛЕКУЛАМИ, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Данная заявка согласно РСТ испрашивает приоритет по предварительным заявкам США №№ 62/886941, поданной 14 августа 2019 г.; и 62/895398, поданной 3 сентября 2019 г.; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

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

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (название: 4000.057PC02_Seqlisting_ST25.txt, размер: 765394 байта; и дата создания: 14 августа 2020 г.), поданного в этой заявке, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

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 якорного 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

[0007] Настоящее изобретение направлено на внеклеточную везикулу (ВВ), содержащую биологически активную молекулу (ВАМ), ковалентно связанную с ВВ посредством якорного фрагмента (АМ), причем якорный фрагмент содержит:



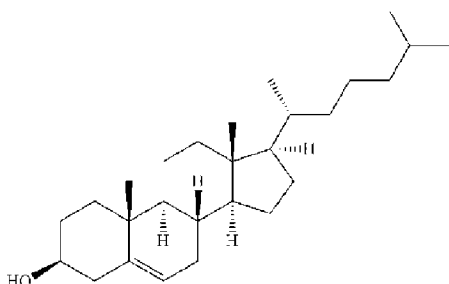
где n является любым целым числом. В некоторых аспектах n является любым числом от 0 до 10.

[0008] В других аспектах якорный фрагмент содержит стерин, GM1, липид (*например*, фосфолипид или жирную кислоту), витамин, малую молекулу, пептид или их комбинацию. Например, якорный фрагмент содержит по меньшей мере 6 атомов углерода, по меньшей мере 7 атомов углерода, по меньшей мере 8 атомов углерода, по меньшей мере 9 атомов углерода, по меньшей мере 10 атомов углерода, по меньшей мере 11 атомов углерода, по меньшей мере 12 атомов углерода, по меньшей мере 13 атомов углерода, по

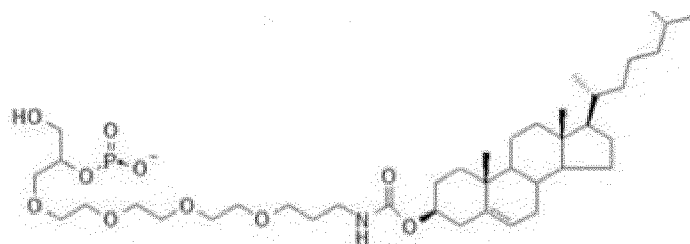
меньшей мере 14 атомов углерода, по меньшей мере 15 атомов углерода, по меньшей мере 16 атомов углерода, по меньшей мере 17 атомов углерода, по меньшей мере 18 атомов углерода, по меньшей мере 19 атомов углерода, по меньшей мере 20 атомов углерода, по меньшей мере 25 атомов углерода, по меньшей мере 30 атомов углерода, по меньшей мере 35 атомов углерода, по меньшей мере 40 атомов углерода, по меньшей мере 45 атомов углерода, по меньшей мере 50 атомов углерода, по меньшей мере 55 атомов углерода, по меньшей мере 60 атомов углерода, по меньшей мере 65 атомов углерода, по меньшей мере 70 атомов углерода, по меньшей мере 75 атомов углерода, по меньшей мере 80 атомов углерода, по меньшей мере 85 атомов углерода или по меньшей мере 90 атомов углерода.

[0009] В других аспектах якорный фрагмент содержит стерин, стероид, гопаноид, гидроксистероид, секостероид, их аналог или любую их комбинацию. В некоторых других аспектах якорный фрагмент содержит эргостерин, 7-дегидрохолестерин, холестерин, 24S-гидроксистерин, ланостерин, циклоартенол, фукостерол, сарингостерин, кампестерин, β -ситостерин, ситостанол, копростанол, авенастерол, стигмастерол или любую их комбинацию.

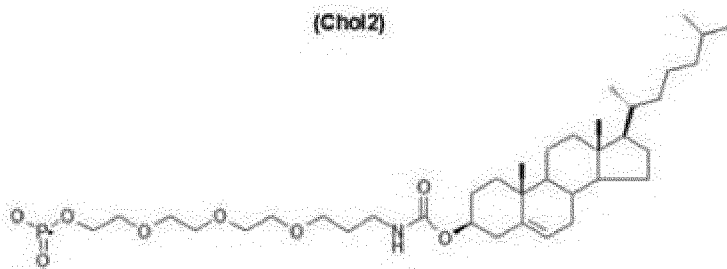
[0010] В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой холестерин, имеющий структуру:



[0011] В некоторых аспектах якорный фрагмент имеет структуру



или



[0012] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стероид, который

представляет собой дигидротестостерон, уваол, гецигенин, диосгенин, прогестерон, кортизол или любую их комбинацию.

[0013] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит липид. В других аспектах якорный фрагмент содержит цепь C₂-C₆₀. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит 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, 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.

[0014] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит жирную кислоту с прямой цепью, разветвленную жирную кислоту, ненасыщенную жирную кислоту, мононенасыщенную жирную кислоту, полиненасыщенную жирную кислоту, гидроксильную жирную кислоту, поликарбоновую кислоту или любую их комбинацию. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит жирную кислоту с прямой цепью, которая представляет собой масляную кислоту, капроновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидоновую кислоту, бегеновую кислоту, лигноцериновую кислоту, гексакозановую кислоту, октакозановую кислоту, триаконтановую кислоту и н-дотриаконтановую кислоту, 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, гептакозановая кислота, или любую их комбинацию.

[0015] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит разветвленную жирную кислоту, которая представляет собой 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-децилпентадекановую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту, кислоту Fine oхocol

1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.), 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, или любую их комбинацию.

[0016] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит ненасыщенную жирную кислоту, которая представляет собой 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-гексадекатетраеновую 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 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит гидроксигирную кислоту, которая представляет собой 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 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит поликарбоновую кислоту, которая представляет собой щавелевую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, адипиновую кислоту, пимелиновую кислоту, субериновую кислоту, азелаиновую кислоту, себациновую кислоту, D,L-яблочную кислоту или любую их комбинацию.

[0017] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит фосфолипид. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидовую кислоту, 2 лизофосфатидилхолин, сфингомиелин или любую их комбинацию. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой фосфатидилэтаноламины, которые представляют собой

дилауроилфосфатидилэтаноламин, димиристоилфосфатидилэтаноламин,
дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, дистеароилфосфатидилэтаноламин,
диолеоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин, 1-олеил-
2-пальмитоилфосфатидилэтаноламин, диерукоилфосфатидилэтаноламин или любую их
комбинацию. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой фосфатидилглицерин,
который представляет собой дилауроилфосфатидилглицерин,
димиристоилфосфатидилглицерин, дипальмитоилфосфатидилглицерин,
дистеароилфосфатидилглицерин, диолеоилфосфатидилглицерин, 1-пальмитоил-2-
олеилфосфатидилглицерин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилглицерин,
диерукоилфосфатидилглицерин или любую их комбинацию. В некоторых аспектах
фосфолипид представляет собой фосфатидилсерин, который представляет собой
дилауроилфосфатидилсерин, димиристоилфосфатидилсерин,
дипальмитоилфосфатидилсерин, дистеароилфосфатидилсерин,
диолеоилфосфатидилсерин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилсерин, 1-олеил-2-
пальмитоилфосфатидилсерин, диерукоилфосфатидилсерин или любую их комбинацию. В
некоторых аспектах фосфолипид представляет собой фосфатидную кислоту, которая
представляет собой дилауроилфосфатидную кислоту, димиристоилфосфатидную кислоту,
дипальмитоилфосфатидную кислоту, дистеароилфосфатидную кислоту,
диолеоилфосфатидную кислоту, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидную кислоту, 1-олеил-2-
пальмитоилфосфатидную кислоту, диерукоилфосфатидную кислоту или любую их
комбинацию. В некоторых аспектах фосфатидилинозитол, который представляет собой
дилауроилфосфатидилинозитол, димиристоилфосфатидилинозитол,
дипальмитоилфосфатидилинозитол, дистеароилфосфатидилинозитол,
диолеоилфосфатидилинозитол, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилинозитол, 1-олеил-2-
пальмитоилфосфатидилинозитол, диерукоилфосфатидилинозитол или любую их
комбинацию. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой симметричный
фосфолипид, который представляет собой 1,2-дипропионил-sn-глицеро-3-фосфохолин
(03:0 PC); 1,2-дибутирил-sn-глицеро-3-фосфохолин (04:0 PC); 1,2-дипентаноил-sn-глицеро-
3-фосфохолин (05:0 PC); 1,2-дигексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (06:0 PC); 1,2-
дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (07:0 PC); 1,2-диооктаноил-sn-глицеро-3-
фосфохолин (08:0 PC); 1,2-динонаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (09:0 PC); 1,2-
дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (10:0 PC); 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-3-
фосфохолин (11:0 PC, DUPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (12:0 PC); 1,2-
дитридеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (13:0 PC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-
фосфохолин (14:0 PC, DMPC); 1,2-дипентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (15:0 PC);

1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0 PC, DPPC); 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (4ME 16:0 PC); 1,2-дигептадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (17:0 PC); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 PC, DSPC); 1,2-динонадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (19:0 PC); 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:0 PC); 1,2-дигенаарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (21:0 PC); 1,2-дибегеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:0 PC); 1,2-дитрикозаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (23:0 PC); 1,2-дилигноцериол-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:0 PC); 1,2-димиристолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:1 (Δ^9 -цис) PC); 1,2-димиристеаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:1 (Δ^9 -транс) PC); 1,2-дипальмитолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:1 (Δ^9 -цис) PC); 1,2-дипальмителаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:1 (Δ^9 -транс) PC); 1,2-дипетроселеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ^6 -цис) PC); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ^9 -цис) PC, DOPC); 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ^9 -транс) PC); 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:2 (цис) PC, DLPC); 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:3 (цис) PC, DLnPC); 1,2-дизйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:1 (цис) PC); 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:4 (цис) PC, DAPC); 1,2-диерукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:1 (цис) PC); 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:6 (цис) PC, DHAPC); 1,2-динервноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:1 (цис) PC); 1,2-дигексаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (06:0 PE); 1,2-диоктаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (08:0 PE); 1,2-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (10:0 PE); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (12:0 PE); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (14:0 PE); 1,2-дипентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (15:0 PE); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (16:0 PE); 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (4ME 16:0 PE); 1,2-дигептадеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (17:0 PE); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (18:0 PE, DSPE); 1,2-дипальмитолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (16:1 PE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (18:1 (Δ^9 -цис) PE, DOPE); 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (18:1 (Δ^9 -транс) PE); 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (18:2 PE, DLPE); 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (18:3 PE, DLnPE); 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (20:4 PE, DAPE); 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (22:6 PE, DHAPE); 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 диэфир PC); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевую соль (DOPG) или любую их комбинацию.

[0018] В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой асимметричный фосфолипид, который представляет собой 1-миристоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0-16:0 PC, MPPC); 1-миристоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин

(14:0-18:0 PC, MSPC); 1-пальмитоил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-02:0 PC); 1-пальмитоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-14:0 PC, PMPC); 1-пальмитоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:0 PC, PSPC); 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:1 PC, POPC); 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:2 PC, PLPC); 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-20:4 PC); 1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0-22:6 PC); 1-стеароил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-14:0 PC, SMPC); 1-стеароил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-16:0 PC, SPPC); 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-18:1 PC, SOPC); 1-стеароил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-18:2 PC); 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-20:4 PC); 1-стеароил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-22:6 PC); 1-олеоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-14:0 PC, OMPC); 1-олеоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-16:0 PC, OPPC); 1-олеоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-18:0 PC, OSPC); 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0-18:1 PE, POPE); 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0-18:2 PE); 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0-20:4 PE); 1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0-22:6 PE); 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-18:1 PE); 1-стеароил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-18:2 PE); 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-20:4 PE); 1-стеароил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-22:6 PE); 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (OChemsPC) или любую их комбинацию.

[0019] В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой лизолипид. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол, лизофосфатидилсерин или любую их комбинацию. В некоторых аспектах фосфолипид представляет собой 1-гексаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (06:0 лизо PC); 1-гептаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (07:0 лизо PC); 1-октаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (08:0 лизо PC); 1-нонаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (09:0 лизо PC); 1-деканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (10:0 лизо PC); 1-ундеканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (11:0 лизо PC); 1-лауроил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (12:0 лизо PC); 1-тридеканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (13:0 лизо PC); 1-миристоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0 лизо PC); 1-пентадеканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (15:0

лизо PC); 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0 лизо PC); 1-гептадеканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (17:0 лизо PC); 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 лизо PC); 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 лизо PC); 1-нонадеканоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (19:0 лизо PC); 1-арахидоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:0 лизо PC); 1-бегеноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:0 лизо PC); 1-лигноцериол-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:0 лизо PC); 1-гексакозаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (26:0 лизо PC); 1-миристоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (14:0 лизо PE); 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (16:0 лизо PE); 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:0 лизо PE); 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:1 лизо PE); 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C16 лизо PC) или любую их комбинацию.

[0020] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин D, витамин K, витамин E или любую их комбинацию. В некоторых аспектах якорный фрагмент дополнительно содержит линкер между биологически активной молекулой и якорным фрагментом.

[0021] В некоторых аспектах линкер включает в себя нерасщепляемый линкер. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), глицерин, алкил, сукцинимид, малеимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), характеризуемый формулой $R3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или $R3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$, где R3 представляет собой водород, метил или этил, а n является целым числом от 2 до 200. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), гексаэтиленгликоль (HEG), пентаэтиленгликоль или любую их комбинацию.

[0022] В некоторых аспектах линкер содержит полиглицерин (PG), имеющий формулу $((R3-O-(CH_2-CHOH-CH_2O))_n-)$, где R3 представляет собой водород, метил или этил, а n является целым числом от 3 до 200. В некоторых аспектах линкер содержит диглицерин, триглицерин, тетраглицерин (TG), пентаглицерин, гексаглицерин (HG) или любую их комбинацию.

[0023] В некоторых аспектах е-линкер содержит алкил. В некоторых аспектах линкер содержит алкенил, алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкенилреилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил,

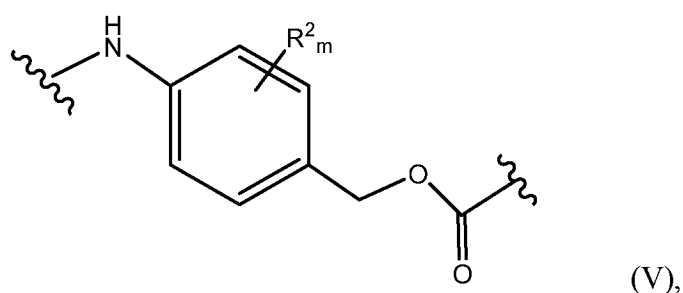
алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкил,
 алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил,
 алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил,
 алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил,
 алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил,
 алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил или любую их комбинацию.

[0024] В некоторых аспектах линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой линкер, расщепляемый окислительно-восстановительным методом, линкер, расщепляемый реактивными формами кислорода, pH-зависимый расщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, линкер, расщепляемый протеазой, линкер, расщепляемый эстеразой, линкер, расщепляемый фосфатазой, фотоактивированный расщепляемый линкер, саморасщепляющийся линкер или любую их комбинацию. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой саморасщепляющийся линкер. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой циннамильную группу, нафтильную группу, бифенильную группу, гетероциклическое кольцо, гомоароматическую группу, кумарин, фуран, тиофен, тиазол, оксазол, изоксазол, пиррол, пиразол, пиридин, имидазон, триазол или любую их комбинацию.

[0025] В некоторых аспектах линкер имеет формулу:

$-A_a-Y_y-$

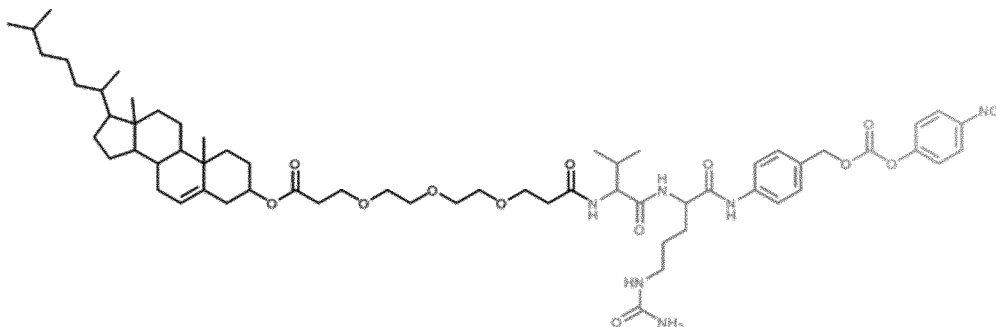
[0026] где каждый $-A-$ независимо представляет собой аминокислотную единицу, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; $-Y-$ представляет собой спейсерную единицу, а y равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах $-A_a-$ представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид. В некоторых аспектах a 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. 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. В некоторых аспектах m равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах m равно 0.

[0027] 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 $-Gly-Gly-$.

[0028] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит:



[0029] В некоторых аспектах ВВ содержит якорный фрагмент, выбранный из SEQ ID NO: 301–324, 401–567, их фрагмента или их комбинации, и линкер, выбранный из линкерной комбинаций из **таблицы 1** и **таблицы 2**.

[0030] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит каркасный белок. В некоторых аспектах ВВ дополнительно содержит каркасный фрагмент. В некоторых аспектах якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляют собой каркас X. В некоторых аспектах каркас X выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена суперсемейства иммуноглобулинов 2 (белок IGSF2); члена суперсемейства иммуноглобулинов 3 (белок IGSF3); члена суперсемейства иммуноглобулинов 8 (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4); их функционального фрагмента и любой их комбинации. В некоторых аспектах каркас X представляет собой белок PTGFRN или его функциональный фрагмент. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 301–324, их фрагменты и их комбинации.

[0031] В некоторых аспектах якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляют собой каркас Y. В некоторых аспектах каркас Y представляет собой каркасный белок, который способен прикреплять биологически активную молекулу к поверхности просвета внеклеточной везикулы и/или к внешней поверхности внеклеточной

везикулы. В некоторых аспектах каркас Y выбран из группы, состоящей из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C (белок MARCKS); миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C типа 1 (белок MARCKSL1); кислоторастворимого белка головного мозга 1 (белок BASP1), их функционального фрагмента и любой их комбинации. В некоторых аспектах каркас Y представляет собой белок BASP1 или его функциональный фрагмент. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 401–567, их фрагменты и их комбинации.

[0032] В некоторых аспектах биологически активная молекула связана с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ. В некоторых аспектах биологически активная молекула связана с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ. 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 биологически активная молекула содержит антисмысловый олигонуклеотид (ASO), мРНК, микроРНК, кшРНК, нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активная молекула содержит пептид, белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или любую их комбинацию. В некоторых аспектах его антигенсвязывающий фрагмент содержит фрагмент scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₁₂, Fv, dAb и Fd, диатела, связанный с антителом полипептид или любой их фрагмент. В некоторых аспектах биологически активная молекула содержит ASO. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, который представляет собой транскрипт *STAT6*, транскрипт *CEBP/β*, транскрипт *STAT3*, транскрипт *KRAS*, транскрипт *NRAS*, транскрипт *NLPR3*, транскрипт *PMP22* или любую их комбинацию. В некоторых аспектах транскрипт *STAT6* содержит SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах ASO *STAT6* содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–SEQ ID NO: 703. В некоторых аспектах транскрипт *CEBP/β* содержит SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах ASO *CEBP/β* содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–SEQ ID NO: 806. В некоторых аспектах транскрипт *STAT3* содержит SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В некоторых аспектах ASO *STAT3* содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–SEQ ID NO: 988. В некоторых аспектах транскрипт *NRAS* содержит SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 53. В некоторых аспектах ASO *NRAS* содержит последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–SEQ ID NO: 1088. В некоторых аспектах транскрипт *NLPR3* содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–SEQ ID NO: 200. В некоторых аспектах транскрипт *KRAS* представляет собой транскрипт мутанта *KRAS*. В некоторых аспектах мутант *KRAS* представляет собой G12D *KRAS*. В некоторых аспектах транскрипт *KRAS* содержит SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–SEQ ID NO: 888. В некоторых аспектах транскрипт *PMP22* содержит SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270.

[0033] В некоторых аспектах ВВ представляет собой экзосому.

[0034] В некоторых аспектах изобретение направлено на фармацевтическую композицию, содержащую внеклеточную везикулу и фармацевтически приемлемый носитель.

[0035] В некоторых аспектах изобретение направлено на способ конъюгации биологически активной молекулы с ВВ, включающий в себя связывание якорного фрагмента с ВВ, набор, содержащий ВВ и инструкцию по применению.

[0036] В некоторых аспектах изобретение направлено на способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту ВВ. 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 вводится внутривенно, внутривнутрибрюшинно, назально, перорально, внутримышечно, подкожно, парентерально или внутриопухолево.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[0037] На **ФИГ. 1А** представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO, которые нацелены на транскрипт *NLPR3*. Таблица включает в себя следующую информацию (слева направо): (i) идентификационный номер последовательности, предназначенный только для последовательности ASO, (ii) целевые начальное и конечное положения на геномной последовательности *NLPR3* (SEQ ID NO: 1), (iii) целевые начальное и конечное положения на последовательности мРНК *NLPR3* (SEQ ID NO: 2), (iv) последовательность ASO без какой-либо конкретной конструкции или химической структуры и (v) последовательность ASO с химической структурой. ASO

представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0038] На ФИГ. 1В представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO STAT6, описанные в настоящем документе, и расположение комплементарной последовательности для каждой в последовательности мРНК. ASO представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0039] На ФИГ. 1С представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO CEBP/β, описанные в настоящем документе, и расположение комплементарной последовательности для каждой в последовательности мРНК. ASO представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0040] На ФИГ. 1D представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO STAT3, описанные в настоящем документе, и расположение комплементарной последовательности для каждой в последовательности мРНК. ASO представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0041] На ФИГ. 1Е представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO NRas, описанные в настоящем документе, и расположение комплементарной последовательности для каждой в последовательности мРНК. ASO представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0042] На ФИГ. 1F представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO KRAS, описанные в настоящем документе, и расположение комплементарной последовательности для каждой в последовательности пре-мРНК (SEQ ID NO: 30) или мРНК (SEQ ID NO: 32). ASO представляют собой от 5' до 3'. Символы в химических структурах являются следующими: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; а s означает фосфоротиоат.

[0043] На ФИГ. 2А-2С представлены графические изображения выработки IL-1β в моноцитах (ФИГ. 2А), макрофагах M0 (ФИГ. 2В) и мышинных BMDM (ФИГ. 2С). Путь

NLRP3 активировался в образце каждого типа путем обработки LPS в течение 3 часов и АТФ в течение трех часов. Образцы затем обрабатывали возрастающей концентрацией MCC950 (log мкМ), как показано, и измеряли уровни IL-1 β (пг/мл).

[0044] На **ФИГ. 3А** представлена хронология, иллюстрирующая схему дозирования и сбора образцов для внутрибрюшинной нагрузки LPS у мышей. На **ФИГ. 3В** представлено графическое изображение уровней IL-1 β в сыворотке мышей после введения возрастающих количеств MCC950.

[0045] На **ФИГ. 4А-4Д** представлены графические изображения уровней Су5, определенных с помощью флуоресценции (MFI) и нормализованных к контролям ФСБ. Су5 используют в качестве маркера поглощения экзосом, содержащих ASO Су5 («Ехо ASO»; слева) или свободные ASO (справа), как показано, в различных типах клеток, выделенных из крови (**ФИГ. 4А**), печени (**ФИГ. 4В**), селезенки (**ФИГ. 4С**) и опухоли (СТ26; **ФИГ. 4Д**). Горизонтальные линии обозначают среднее значение MFI. На **ФИГ. 4Е-4J** представлены флуоресцентные изображения образцов ткани костного мозга, взятых от двух доноров, показывающие поглощение экзосом, содержащих Су5-репортерные ASO (**ФИГ. 4Е-4F**) или свободные ASO (**ФИГ. 4G-4H**), по сравнению с отрицательными контролями ФСБ (**ФИГ. 4I-4J**).

[0046] На **ФИГ. 5А-5В** представлены графические изображения нормализованной экспрессии генов (%) *STAT6* (**ФИГ. 5А**) и *CD163* (**ФИГ. 5В**) в поляризованных макрофагах после обработки Ехо ASO *STAT6*, свободным ASO *STAT6* или скремблированным Ехо ASO (отрицательный контроль), как показано (**ФИГ. 5А-5В**).

[0047] На **ФИГ. 5С-5D** представлены графические изображения нормализованной экспрессии генов (%) *STAT6* (**ФИГ. 5С**) и *CD163* (**ФИГ. 5D**) в поляризованных макрофагах после обработки Ехо ASO *STAT6*, свободным ASO *STAT6* или скремблированным Ехо ASO (отрицательный контроль), как показано (**ФИГ. 5С-5D**).

[0048] На **ФИГ. 6А-6J** представлены графические изображения экспрессии *TGF β 1* (**ФИГ. 6А**), *CD163* (**ФИГ. 6В**), *STAT5b* (**ФИГ. 6С**), *STAT6* (**ФИГ. 6D**), *CEBP/ β* (**ФИГ. 6Е**), *IL12 β* (**ФИГ. 6F**), *AIF1* (**ФИГ. 6G**), *MYC* (**ФИГ. 6H**), *HLA DQA* (**ФИГ. 6I**) и *CD74 (MIF)* (**ФИГ. 6А**) в первичных макрофагах человека, необработанных или обработанных скремблированным Ехо ASO, *STAT6*-Ехо-ASO, свободным ASO *STAT-6*, *CEBP/ β* -Ехо-ASO или свободным ASO *CEBP/ β* , как показано.

[0049] На **ФИГ. 7А-7F** представлены графические изображения результатов проточной цитометрии для выделения CD11b⁺ клеток. На **ФИГ. 7А-7С** показана экспрессия CD45 до обработки (**ФИГ. 7А**), после обработки отрицательным контролем (скремблированный Ехо ASO, **ФИГ. 7В**) или после обработки Ехо-ASO (**ФИГ. 7С**). На **ФИГ.**

7D-7F показана экспрессия CD11b до обработки (ФИГ. 7D), после обработки отрицательным контролем (скремблированный Echo ASO, ФИГ. 7E) или после обработки Echo-ASO (ФИГ. 7F). На ФИГ. 7G показано, что объем опухоли был значительно меньшим у мышей, получавших Echo-STAT6-ASO и Echo-CEBP/βASO, по сравнению с мышами, получавшими скремблированный контроль Echo-ASO, и мыши, получавшие Echo-STAT6-ASO или Echo-CEBP/β-ASO, имели меньшие опухоли, чем мыши, получавшие свободный ASO STAT6.

[0050] На **ФИГ. 8A-8C** представлены графические изображения экспрессии *STAT6* (ФИГ. 8A), *CEBP/β* (ФИГ. 8B) и *ARG1* (ФИГ. 8C) в CD11b-обогащенных клетках по сравнению с небогащенными клетками после воздействия скремблированного Echo-ASO (ФИГ. 8A-8C), свободного ASO STAT6 (ФИГ. 8A и 8C), свободного ASO CEBP/β (ФИГ. 8B), STAT6-Echo-ASO (ФИГ. 8A и 8C) или CEBP/β-Echo-ASO (ФИГ. 8B-8C).

[0051] На **ФИГ. 9A-9L** представлены графические изображения экспрессии *STAT6* (ФИГ. 9A), *CEBP/β* (ФИГ. 9B), *TGFβ1* (ФИГ. 9C), *STAT3* (ФИГ. 9D), *SIRP-α* (ФИГ. 9E), *CD47* (ФИГ. 9F), *NOS2* (ФИГ. 9G), *ARG1* (ФИГ. 9H), *CD206* (ФИГ. 9I), *CD274* (ФИГ. 9J), *NLRP3* (ФИГ. 9K), *CSF1R* (ФИГ. 9L), *CD36* (ФИГ. 9M), *STAB1* (ФИГ. 9N), *IL13* (ФИГ. 9O), *PI3KG* (ФИГ. 9P), *LY6C* (ФИГ. 9Q), *LY6G* (ФИГ. 9R), *IFNβ1* (ФИГ. 9S), *IFNγ* (ФИГ. 9T), *IFNα1* (ФИГ. 9U) и *IL6Rα* (ФИГ. 9V) в CD11b-обогащенных клетках, обработанных скремблированным Echo ASO, STAT6-Echo-ASO, свободным ASO STAT-6 или CEBP/β-Echo-ASO, как показано.

[0052] На **ФИГ. 10A и 10C** представлены графические изображения нормализованной экспрессии генов (%) *STAT6* (ФИГ. 10A) и *TGFβ1* (ФИГ. 10C) в первичных макрофагах M2 человека, поляризованных путем обработки IL-13/TGFβ с последующей обработкой Echo ASO STAT6, свободным ASO STAT6 или скремблированным Echo ASO (отрицательный контроль), как показано.

[0053] На **ФИГ. 10B и 10D** представлены графические изображения нормализованной экспрессии генов (%) *CEBP/β* (ФИГ. 10B) и *TGFβ1* (ФИГ. 10D) в первичных макрофагах M2 человека, поляризованных путем обработки IL-13/TGFβ с последующей обработкой Echo ASO CEBP/β, свободным ASO CEBP/β или скремблированным Echo ASO (отрицательный контроль), как показано.

[0054] На **ФИГ. 11** представлено графическое изображение поглощения экзосом, о чем свидетельствуют уровни Cy5, в TD2 легкого после назального введения отрицательного контроля (-C) или Echo-ASO-Cy5 («IN») интактным мышам или мышам, которым вводили блеомицин для индуцирования фиброза легких («bleo»).

[0055] На **ФИГ. 12A-12H** представлены изображения флуоресцентной

гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом нормальной легочной тканью и легочной тканью с индуцированным фиброзом.

[0056] На **ФИГ. 13A-13H** представлены изображения гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом нормальной легочной тканью и легочной тканью с индуцированным фиброзом.

[0057] На **ФИГ. 13I** представлено графическое изображение, показывающее уровень насыщения на изображениях гибридизации *in situ*, что указывает на уровень поглощения экзосом в нормальной и фиброзной ткани.

[0058] На **ФИГ. 14A-14F** представлены изображения флуоресцентной гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом легочной тканью у мышей Hsp1-6.

[0059] На **ФИГ. 15A-15F** представлены изображения гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом легочной тканью у мышей Hsp1-6.

[0060] На **ФИГ. 16A-16J** показаны результаты различных экспериментов IC50 с использованием ASO NRas.

[0061] На **ФИГ. 17A-17N** показаны результаты различных экспериментов IC50 с использованием ASO STAT3.

[0062] На **ФИГ. 18** показан график, изображающий результаты экспериментов ASO STAT3, демонстрируя общее истощение мРНК.

[0063] На **ФИГ. 19** показан график, изображающий результаты экспериментов ASO NRas, демонстрируя общее истощение мРНК.

[0064] На **ФИГ. 20** показана кривая объем опухоли-ответ после инокуляции Eho-ASO STAT3 и свободным ASO STAT3.

[0065] На **ФИГ. 21** показан ответ профиля экспрессии генов с использованием STAT3, Eho-ASO, свободного ASO STAT3 и свободного ASO STAT3 2X.

[0066] На **ФИГ. 22** показаны проценты инфильтрирующих MDSC/CD45 (CD11bHigh F40/80High/CD45) после воздействия ФСБ, скремблированного Eho-ASO, MOE Eho-ASO STAT3 и MOE свободного ASO STAT3.

[0067] На **ФИГ. 23** показаны проценты инфильтрирующих MDSC/общих MDSC (Ly6GHigh CD11bHigh/IA/IELow) после воздействия ФСБ, скремблированного Eho-ASO, MOE Eho-ASO STAT3 и MOE свободного ASO STAT3.

[0068] На **ФИГ. 24** показан нормализованный подсчет мРНК после обработки ФСБ, скремблированным Eho-ASO, Eho-ASO STAT3 и свободным ASO STAT3.

[0069] На **ФИГ. 25** представлена таблица, показывающая, что на количество молекул ASO, загруженных на сконструированную экзосому, влияет структура линкера.

Также показаны структуры используемых конструкций.

[0070] На ФИГ. 26 представлена таблица, показывающая, что на количество молекул ASO, загруженных на нативную экзосому, влияет структура линкера. Также показаны структуры используемых конструкций.

[0071] На ФИГ. 27А-27С показано, что на активность Echo-ASO влияет структура линкера ASO. Структуры конструкций C1-C9, T1-T9 и L1-L3 представляют собой структуры, показанные на ФИГ. 25. На ФИГ. 27А показана активность конструкций с липидным якорем холестерин-С6. На ФИГ. 27В показана активность конструкций с липидным якорем токоферол-С8 (L1) или токоферола пальмитат-С6 (L2 и L3). На ФИГ. 27С показана активность конструкций с липидным якорем холестерин-ТЭГ.

[0072] На ФИГ. 28 представлена таблица, показывающая последовательность молекул ASO, нацеленных на Pmp22.

[0073] На ФИГ. 29 представлена таблица, показывающая дополнительные последовательности молекул ASO, нацеленных на Pmp22.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0074] Настоящее изобретение направлено на внеклеточные везикулы (ВВ), например, экзосомы, содержащие по меньшей мере одну биологически активную молекулу, ковалентно связанную с ВВ, например, экзосомой, посредством якорного фрагмента, и пути их применения. В настоящем изобретении представлены неограничивающие примеры различных аспектов.

[0075] 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 настоящем 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.

[0076] Заголовки, представленные в настоящем 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 настоящем документе, применяется только для описания конкретных

аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0077] Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

I. Определения

[0078] Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0079] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают в себя 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 более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем 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.

[0080] Кроме того, использование в настоящем документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения фраз «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).

[0081] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[0082] Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях 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, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в раскрытии этого изобретения.

[0083] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают в себя 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 настоящем 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.

[0084] 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 настоящем 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.

[0085] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записывают слева направо в направлении от 5' к 3'. Нуклеотиды обозначаются в настоящем документе 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 урацил.

[0086] Аминокислотные последовательности записывают слева направо в направлении от amino-конца к карбокси-концу. Аминокислоты обозначаются в настоящем документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[0087] В контексте настоящего документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «около» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0088] 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 осуществляется любым подходящим путем, включая внутритрофоцитарно, перорально, пульмонально, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриаартериально, внутримышечно, внутривисцерально или подкожно), ректально, внутривисцерально, интратрахеально, 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.

[0089] В контексте настоящего 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 в себя гормоны, нейромедиаторы и циклические динуклеотиды. Неограничивающие примеры экзогенных агонистов включают в себя лекарственные средства, малые молекулы и циклические динуклеотиды. Агонист может представлять собой полный, частичный или обратный агонист.

[0090] Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или эталонной последовательности (*например* последовательности дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или эталонной 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 A_nY , при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой $A_n(YZ)$, 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 замещающие аминокислотные остатки, которые могут заменить A.

[0091] В контексте настоящего документа термин «антагонист» относится к молекуле, которая блокирует или подавляет опосредованный агонистом ответ, а не сама 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 в себя альфа-блокаторы, бета-блокаторы и блокаторы кальциевых каналов. Антагонист может представлять собой конкурентный, неконкурентный или внеконкурентный антагонист.

[0092] Используемый в настоящем документе термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, независимо от того, является ли он природным или частично или полностью синтезированным, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает в себя полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывает и распознает антиген. При применении термина «антитело» он включает в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно включает в себя одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например*, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает в себя биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически

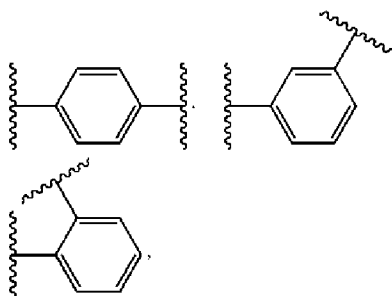
активная молекула представляет собой антитело или молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[0093] Термины «конъюгат антитело-лекарственное средство» и «ADC» используются взаимозаменяемо и относятся к антителу, связанному, *например*, ковалентно, с терапевтическим агентом (иногда называемым в настоящем документе агентом, лекарственным средством или активным фармацевтическим ингредиентом) или агентами. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0094] В контексте настоящего документа термин «примерно» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично указанному эталонному 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 эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[0095] Термин «арил» относится к карбоциклической ароматической группе. Примеры арильных групп включают в себя, помимо прочего, фенил, нафтил и антраценил. Карбоциклическая ароматическая группа может быть незамещенной или замещенной одной или несколькими группами, включая, помимо прочего, $-C_{1-8}$ 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.

[0096] 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 с помощью вплоть до четырех групп, включая, помимо прочего, $-C_{1-8}$ алкил, $-O-(C_{1-8}$ алкил), -арил, $-C(O)R'$, -

$\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)OR}'$, $-\text{C(O)NH}_2$, $-\text{C(O)NHR}'$, $-\text{C(O)N(R)'}_2$ -, $-\text{NHC(O)R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{галоген}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH(R)'}$, $-\text{N(R)'}_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R' независимо представляет собой H , $-\text{C}_{1-8}$ алкил или арил.

[0097] Термин «биологически активная молекула» в контексте настоящего документа относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к ВВ, *например*, экзосоме, посредством якорного 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 в себя 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.

[0098] Термин « C_{1-8} алкил» в контексте настоящего документа относится к насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 1 до 8 атомов углерода. Типичные группы « C_{1-8} алкила» включают в себя, помимо прочего, метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и 2-метилбутил.

[0099] Термин « C_{1-10} алкилен» относится к насыщенной углеводородной группе с прямой цепью формулы $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Примеры C_{1-10} алкилена включают в себя метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен и декален.

[0100] Термин « C_{3-8} карбоцикл» относится к 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членному насыщенному или ненасыщенному неароматическому карбоциклическому кольцу. Типичные C_{3-8} карбоциклы включают в себя, помимо прочего, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил. C_{3-8} карбоциклическая группа может быть незамещенной или замещенной одной или несколькими группами, включая, помимо прочего, $-\text{C}_{1-8}$ алкил, $-\text{O}-(\text{C}_{1-8}$ алкил), арил, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)OR}'$, $-\text{C(O)NH}_2$, $-\text{C(O)NHR}'$, $-\text{C(O)N(R)'}_2$ -, $\text{NHC(O)R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{галоген}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH(R)'}$, $-\text{N(R)'}_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R' независимо представляет собой H , $-\text{C}_{1-8}$ алкил или арил.

[0101] Термин « C_{3-8} карбоцикло» относится к C_{3-8} карбоциклической группе, определенной выше, в которой один или несколько атомов водорода карбоцикла заменены связью.

[0102] 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 в себя, помимо прочего, 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 с помощью вплоть до семи групп, включая, помимо прочего, -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.

[0103] Термин «C₃₋₈ гетероцикло» относится к C₃₋₈ гетероциклической группе, определенной выше, в которой один из атомов водорода гетероциклической группы заменен связью. C₃₋₈ гетероцикло может быть незамещенным или замещенным с помощью вплоть до шести групп, включая, помимо прочего, -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.

[0104] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную 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, при замене аминокислоты в полипептиде 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.

[0105] В контексте настоящего документа термин «консервативный» относится к

нуклеотидам 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.

[0106] 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 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «высококонсервативными», если они на около 70% идентичны, около 80% идентичны, около 90% идентичны, около 95%, около 98% или около 99% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «консервативными», если они на по меньшей мере 30% идентичны, по меньшей мере 40% идентичны, по меньшей мере 50% идентичны, по меньшей мере 60% идентичны, по меньшей мере 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «консервативными», если они на около 30% идентичны, около 40% идентичны, около 50% идентичны, около 60% идентичны, около 70% идентичны, около 80% идентичны, около 90% идентичны, около 95% идентичны, около 98% идентичны или около 99% идентичны друг другу. Консервативность последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или характеристике.

[0107] В контексте настоящего документа термин «обычный белок ВВ» означает белок, ранее известный как обогащенный в ВВ.

[0108] В контексте настоящего документа термин «обычный экзосомный белок» означает белок, ранее известный как обогащенный в экзосомах, включая, помимо прочего, CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент или пептид, который связывается с ним.

[0109] В контексте настоящего документа термин «производное» относится к ВВ, *например*, экзосоме, компоненту (*например*, 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 тиольной 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 тиольными 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 тиольными группами в биологически активной молекуле, *например*, антителе.

[0110] Термины «наполнитель» и «носитель» используются взаимозаменяемо и относятся к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения.

[0111] В контексте настоящего 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 представляют собой все связанные с мембраной везикулы (*например*, экзосомы, нановезикулы), которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. В некоторых аспектах внеклеточные 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 нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В некоторых аспектах внеклеточный носитель содержит каркасный фрагмент. В качестве примера и без ограничения внеклеточные везикулы включают в себя 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.

[0112] В контексте настоящего 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.

[0113] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, *например*, нановезикулы, по настоящему изобретению сконструированы путем ковалентного связывания по меньшей мере одной биологически активной молекулы (*например*, белка, такого как антитело или ADC, РНК или ДНК, например, антисмысловой олигонуклеотид, низкомолекулярное лекарственное средство, токсин) с ВВ, *например*, экзосомой, *например*, нановезикулой, посредством якорного фрагмента.

[0114] 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 (наружной) 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*, каркас X). 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 без ограничения нановезикулы, микросомы, микровезикулы, внеклеточные тельца или апоптотические тельца.

[0115] В контексте настоящего документа термин «фрагмент» белка (*например*,

биологически активная молекула, такая как терапевтический белок, или каркасный белок, такой как каркас X или каркас Y) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче, чем встречающаяся в природе последовательность, deletирована на N-и/или C-конце, или любая часть белка deletирована по сравнению со встречающимся в природе белком.

[0116] В контексте настоящего документа термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка, *например*, каркасного белка X, сохраняет способность прикреплять биологически активную молекулу на поверхности просвета или на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, посредством малеимидного фрагмента. Аналогичным образом, в определенных аспектах функциональный фрагмент каркасного белка Y сохраняет способность прикреплять фрагмент на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы.

[0117] 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 ЗФБ. В определенных аспектах функциональный фрагмент каркасного белка X сохраняет, *например*, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100% способности встречающегося в природе каркасного белка X прикреплять биологически активную молекулу на поверхности просвета или на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, посредством малеимидного фрагмента.

[0118] В контексте настоящего документа «прикрепление» биологически активной молекулы на поверхности просвета или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению посредством каркасного белка относится к ковалентному присоединению биологически активной молекулы к части каркасной молекулы расположенной на поверхности просвета или внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы), соответственно.

[0119] В определенных аспектах функциональный фрагмент каркасного белка Y сохраняет, *например*, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100% способности встречающегося в природе каркасного белка Y прикреплять фрагмент на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы.

[0120] В контексте настоящего 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 настоящего документа термин «гомология» охватывает как идентичность, так и сходство.

[0121] В некоторых аспектах полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% мономеров в молекуле являются идентичными (точно такой же мономер) или подобными (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[0122] 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.

[0123] В контексте настоящего 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».

[0124] 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 последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих аминокислотных положениях.

[0125] 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.

[0126] Подходящие программы из системы программного обеспечения 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.

[0127] Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[0128] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, 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.

[0129] В определенных аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) со второй аминокислотной последовательностью (или последовательностью нуклеиновой кислоты) рассчитывается как $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков (или нуклеотидных 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 со второй последовательностью будет выше, чем процент идентичности второй последовательности с первой последовательностью.

[0130] Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. 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.

[0131] В контексте настоящего 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 в себя агенты, такие как модуляторы ингибиторов контрольных точек, лиганды ингибиторов контрольных точек, цитокины, их производные или любую их комбинацию. Иммуномодулятор может также включать в себя агонист, антагонист, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, такой как миРНК, микроРНК, днкРНК, мРНК или ДНК или малую молекулу. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой иммуномодулятор.

[0132] В контексте настоящего 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 в себя, *например*, активацию или ингибирование Т-клетки, *например*, эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4+ клетки, CD8+ Т-клетки или Treg-клетки, или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, *например*, NK-клетки. Соответственно, иммунный ответ может включать в себя 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.

[0133] 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 в себя 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).

[0134] В контексте настоящего 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).

[0135] 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 в себя генетические слияния. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой иммуноконъюгат.

[0136] В контексте настоящего 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 необходимого препарата ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах настоящего изобретения выделение или очистка в контексте настоящего 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 около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,9%, по меньшей мере около

99,99%, по меньшей мере около 99,999%, по меньшей мере около 99,9999% или более чем около 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых аспектах препараты выделенной ВВ, например, экзосомы, по сути не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах препараты выделенной ВВ, *например*, экзосомы, на 100%, на по меньшей мере около 99%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 94%, на по меньшей мере около 93%, на по меньшей мере около 92%, на по меньшей мере около 91% или на по меньшей мере около 90% не содержат какого-либо контаминирующего биологического материала. Остаточные биологические продукты могут включать в себя 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 композиция ВВ, *например*, экзосомы, не содержит обнаруживаемых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только ВВ, *например*, экзосомы.

[0137] Термины «связанный», «слитый» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к первому фрагменту, *например*, первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенному ко второму фрагменту, *например*, второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, соответственно. Первый фрагмент может быть соединен напрямую или сопоставлен со вторым фрагментом, или, альтернативно, промежуточный фрагмент может ковалентно соединять первый фрагмент со вторым фрагментом. Термин «связанный» означает не только слияние первого фрагмента со вторым фрагментом на С-конце или N-конце, но также включает в себя вставку целого первого фрагмента (или второго фрагмента) в любые две точки, *например*, аминокислоты, во втором фрагменте (или первом фрагменте, соответственно). В одном аспекте первый фрагмент связан со вторым фрагментом посредством пептидной связи или линкера. Первый фрагмент может быть связан со вторым фрагментом посредством фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей), или нуклеотид или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей), или любой химический фрагмент (для полипептидных или полинуклеотидных цепей или любых химических молекул). Термин «связанный» также обозначен дефисом (-). В некоторых аспектах каркасный белок X на ВВ, *например*, экзосоме, может быть связан или слит с биологически активной молекулой посредством малеимидного фрагмента.

[0138] В контексте настоящего документа термин «ВВ со сконструированным

просветом» относится к ВВ, *например*, экзосоме, с поверхностью просвета мембраны или просветом ВВ, *например*, экзосомы, модифицированной по своему составу, так что поверхность просвета или просвет сконструированной ВВ, *например*, экзосомы, отличается от таковых ВВ, *например*, экзосомы, до модификации или встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы.

[0139] Конструирование может происходить непосредственно в просвете (т.е., пустоте внутри ВВ) или в мембране ВВ (*например*, экзосомы), в частности, на поверхности просвета ВВ, так что просвет и/или поверхность просвета ВВ, *например*, экзосомы, изменяется. Например, мембрана модифицируется по своему составу белка, липида, малой молекулы, углевода *и т.д.*, так что поверхность просвета ВВ, *например*, экзосомы, модифицируется. Аналогично можно модифицировать 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 естественным образом) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на поверхности просвета или в просвете ВВ, *например*, экзосомы, или может быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на внутреннем слое ВВ, *например*, экзосомы. В других аспектах ВВ со сконструированным просветом, *например* экзосома со сконструированным просветом, включает в себя 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 быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы.

[0140] В контексте настоящего документа термин «макромолекула» относится к нуклеиновым кислотам, белкам, липидам, углеводам, метаболитам или их комбинациям.

[0141] В контексте настоящего документа термин «макромолекула» относится к нуклеиновым кислотам, белкам, липидам, углеводам, метаболитам или их комбинациям.

[0142] 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 и экзосом со сконструированной поверхностью, описанных в настоящем документе). В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют поверхность просвета ВВ, *например*, экзосомы (*например*, ВВ и экзосомы со сконструированным просветом, описанные в настоящем документе).

[0143] В контексте настоящего документа термины «модифицированный белок» или «модификация белка» относятся к белку, имеющему по меньшей мере 15% идентичности с немутантной аминокислотной последовательностью белка. Модификация белка включает в себя фрагмент или вариант белка. Модификация белка может дополнительно включать в себя химическую или физическую модификацию фрагмента или варианта белка.

[0144] В контексте настоящего документа термины «модулировать», «модифицировать» и их грамматические варианты обычно относятся применительно 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.

[0145] В контексте настоящего документа термин «нановезикула» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от 20 нм до 250 нм (*например*, от 30 до 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 в себя, помимо прочего, 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 настоящем документе, по сути не содержит везикул, которые происходят из клеток путем прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных аспектах нановезикула содержит каркасный фрагмент, *например*, каркас X или каркас Y. Нановезикулы, сразу после получения из клетки-производителя, могут быть выделены из клетки-производителя на основании их размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0146] В контексте настоящего 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 в себя терапевтические агенты, такие как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как миРНК, дцДНК, днкРНК и миРНК), 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 настоящего документа термин «антиген» относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает у него иммунный ответ (клеточный или гуморальный). В некоторых аспектах молекулы полезной нагрузки ковалентно связаны с ВВ, *например*, экзосомой, посредством малеимидного фрагмента. В других аспектах полезная нагрузка содержит адъювант.

[0147] 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.

[0148] В контексте настоящего документа термин «фармацевтическая композиция»

относится к одному или нескольким соединениям, описанным в настоящем 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.

[0149] В контексте настоящего 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 в себя трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту («ДНК»), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту («РНК»). Он также включает в себя модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термин «полинуклеотид» включает в себя полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезокси-D-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), включая тРНК, рРНК, гРНК, миРНК и мРНК, сплайсированные или несплайсированные, любой другой тип полинуклеотида, который представляет собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие ненуклеотидные остовы, например, полиамид (*например*, пептидные нуклеиновые кислоты «ПНК») 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*, антисмысловой олигонуклеотид. В конкретных аспектах полинуклеотид содержит мРНК. В другом аспекте мРНК представляет собой синтетическую мРНК. В некоторых аспектах синтетическая мРНК 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, описанном в настоящем документе, могут быть заменены неприродным нуклеиновым основанием, *например*, 5-метоксиуридином). В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула представляет собой полинуклеотид.

[0150] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящем

документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Кроме того, указанные термины включают в себя аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими 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 в данной области 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, слитый белок или фермент.

[0151] Термин «полипептид» в контексте настоящего документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают в себя 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*, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[0152] Термины «предупреждать», «предупреждение» и их варианты в контексте настоящего 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.

[0153] В контексте настоящего 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 в себя, помимо прочего, клетку, которая, как известно, эффективно генерирует ВВ, *например*, экзосомы, *например*, клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (СНО), 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.

[0154] Термин «профилактический» в контексте настоящего 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.

[0155] Термин «профилактика» в контексте настоящего 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.

[0156] «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, описанные в настоящем документе, могут быть получены рекомбинантным путем с использованием способов, известных в данной области техники. В качестве альтернативы белки и пептиды, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы химическим путем. В некоторых аспектах настоящего изобретения каркасные белки X и/или Y, присутствующие в ВВ, *например*, экзосомах, получают 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.

[0157] В контексте настоящего документа термин «каркасный фрагмент» относится к молекуле, *например*, белку, такому как каркас X или каркас Y, который можно использовать для прикрепления полезной нагрузки, *например*, биологически активной молекулы, к ВВ, *например*, экзосоме, либо на поверхности просвета, либо на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В определенных аспектах каркасный фрагмент содержит синтетическую молекулу. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит неполипептидный фрагмент. В других аспектах каркасный фрагмент содержит, *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 каркас X. В некоторых аспектах каркасный фрагмент представляет собой каркас Y. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент содержит как каркас X, так и каркас Y.

[0158] В контексте настоящего документа термин «каркас X» относится к белкам ВВ, *например*, экзосомы, которые были идентифицированы на поверхности ВВ, *например*, экзосом. См., *например*, патент США № 10195290, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Неограничивающие примеры каркасных белков X включают в себя: 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»). В некоторых аспектах каркасный

белок X может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, который способен прикреплять другой фрагмент на внешней поверхности или на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркас X может прикреплять биологически активную молекулу к внешней поверхности или просвету ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах настоящего изобретения биологически активная молекула может быть ковалентно присоединена к каркасу X посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах биологически активная молекула может быть присоединена к каркасу X посредством малеимидного фрагмента на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают в себя: аминопептидазу N (CD13); неприлизин, также называемый металлоэндопептидаза (MME); представителя 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1); нейропилин-1 (NRP1); CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B.

[0159] В контексте настоящего документа термин «каркас Y» относится к белкам ВВ, *например*, экзосомы, которые были идентифицированы в просвете ВВ, *например*, экзосом. *См.*, *например*, международную заявку № PCT/US2018/061679, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры каркасных белков Y включают в себя: миристоилированный, богатый аланином субстрат киназы C (белок «MARCKS»); белок 1, подобный миристоилированному, богатому аланином субстрату киназы C (белок «MARCKSL1»); и кислоторастворимый белок 1 головного мозга (белок «BASP1»). В некоторых аспектах белок каркаса Y может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, который способен прикреплять фрагмент на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент к поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах настоящего изобретения фрагмент может быть ковалентно присоединен к каркасу Y. В некоторых аспектах фрагмент может быть присоединен к каркасу Y на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы.

[0160] В контексте настоящего 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.

[0161] В контексте настоящего 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.

[0162] В контексте настоящего 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.

[0163] Если не указано иное, ссылка на соединение, которое имеет один или несколько стереоцентров, означает каждый стереоизомер и все их комбинации стереоизомеров.

[0164] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и «хозяин» и их варианты используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, включая, помимо прочего, 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.

[0165] 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 0,001%, менее 0,01%, менее 0,05%, менее 0,1%, менее 0,2%, менее 0,3%, менее 0,4%, менее 0,5%, менее 0,6%, менее 0,7%, менее 0,8%, менее 0,9%, менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9% или менее 10% (масс./об.) макромолекул.

[0166] В контексте настоящего 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.

[0167] В контексте настоящего документа термин «экзосома со сконструированной поверхностью» (*например*, экзосома со сконструированным каркасом X) относится к экзосоме с мембраной или поверхностью экзосомы (наружной поверхностью или поверхностью просвета), модифицированной в своем составе, так что поверхность сконструированной экзосомы отличается от таковой экзосомы до модификации или встречающейся в природе экзосомы.

[0168] 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 естественным образом) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или может быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В других аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, обладает более высокой экспрессией (*например*, имеет большее количество) природного белка ВВ, *например*, экзосомы (*например*, каркаса X) или его фрагмента или варианта, которые могут быть экспонированы на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В конкретном аспекте ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, содержит модификацию одного или нескольких компонентов мембраны, *например*, белка, такого как каркас X, липид, малая молекула, углевод или их комбинация, при этом по меньшей мере один из компонентов ковалентно присоединен к биологически активной молекуле посредством малеимидного фрагмента.

[0169] В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество реагента или фармацевтического соединения, содержащего ВВ или экзосому по настоящему изобретению, которого достаточно для получения желаемого 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.

[0170] В контексте настоящего документа термины «лечить», «лечение» или «лечащий» относятся, *например*, к снижению степени тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности течения болезни; улучшению или устранению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; обеспечению благоприятных эффектов у субъекта с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или патологического состояния. Термин также включает в себя профилактику или предотвращение заболевания или состояния или его симптомов. В одном аспекте термин «лечение» или «лечащий» означает индуцирование иммунного ответа у субъекта против антигена.

[0171] В контексте настоящего документа термин «вариант» молекулы (*например*, функциональной молекулы, антигена или каркаса X и/или каркаса Y) относится к молекуле, которая имеет определенные структурные и функциональные идентичности с другой молекулой при сравнении с помощью способа, известного в данной области техники. Например, вариант белка может содержать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или реаранжировку в другом белке.

[0172] В некоторых аспектах вариант каркаса X или его производное включает в себя вариант каркаса X, имеющий по меньшей мере около 70% идентичности по отношению к полноразмерному зрелому PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белкам-переносчикам АТФ или фрагменту (*например*, функциональному фрагменту) PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белков-переносчиков АТФ.

[0173] В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента каркасного белка X, описанного в настоящем 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.

[0174] В некоторых аспектах вариант каркаса Y или его производного включает в себя вариант, имеющий по меньшей мере 70% идентичности по отношению к MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагменту MARCKS, MARCKSL1 или BASP1.

[0175] В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента каркасного белка Y или его производного сохраняет способность специфически нацеливаться на поверхность

просвета ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых вариантах каркас Y включает в себя одну или более мутаций, *например*, консервативные аминокислотные замены.

[0176] Встречающиеся в природе варианты называются «аллельными вариантами» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего определенный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут отличаться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в настоящее изобретение. Альтернативно, не встречающиеся в природе варианты можно получить при помощи методик мутагенеза или прямого синтеза.

[0177] Используя известные методы белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК, могут быть созданы варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или более аминокислот могут быть удалены 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 настоящий 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. Подобным образом, гамма-интерферон проявлял до десяти раз более высокую активность после удаления 8–10 аминокислотных остатков из карбоксиконца этого белка. (Публикация Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.)

[0178] Более того, имеется достаточно доказательств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, в работе Gayle и сотрудников (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенной в настоящий 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 выполняли 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. В каждой возможной аминокислотной позиции исследовали множество мутаций. Исследователи обнаружили, что «[большая] часть молекулы может быть изменена с небольшим влиянием на что-либо из [связывания или биологической активности]». (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.

[0179] Как указано выше, варианты или производные включают в себя, *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.

[0180] Модификации, присутствующие в вариантах и производных, включают в себя, *например*, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (публикация Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование.

[0181] В некоторых аспектах каркас X и/или каркас Y могут быть модифицированы 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 каркас X и/или каркас Y, липид или гликан) 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) можно модифицировать с получением производного, содержащего по меньшей мере один малеимидный фрагмент.

II. Конъюгированные ВВ (*например*, экзосомы) по изобретению

[0182] Внеклеточные везикулы (ВВ) обычно имеют диаметр от 20 до 1000 нм; *например*, экзосомы, которые представляют собой малые внеклеточные везикулы, обычно имеют диаметр 100–200 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)).

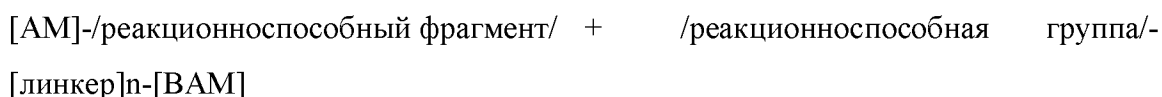
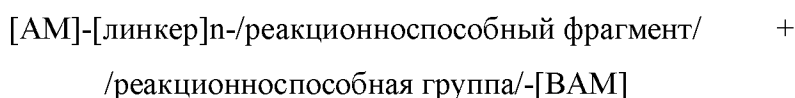
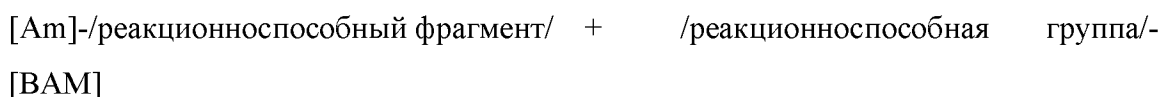
[0183] В отличие от антител, ВВ (*например*, экзосомы) могут вмещать большое количество молекул, прикрепленных к их поверхности, от тысяч до десятков тысяч молекул на ВВ (*например*, экзосому). Конъюгаты ВВ (*например*, экзосома)-лекарственное средство, таким образом, представляют собой платформу для 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.

[0184] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены «модифицированные биологически активные молекулы» (MBAM), *например*, ASO, содержащие «биологически активную молекулу» (BAM), *например*, ASO, модифицированную путем связывания, *например*, ковалентного, одного или более якорных фрагментов с BAM, *например*, ASO, прямо или опосредовано, *например*, посредством одной или более линкерных комбинаций. Модифицированная BAM, описанная в настоящем документе, может содержать «якорный фрагмент» (AM) и необязательно один или более линкеров («линкерная комбинация»), которые соединяют AM с BAM, как схематически изображено ниже



где n равно целому числу от 0 до 10.

[0185] BAM может быть присоединена к якорному фрагменту или линкерной комбинации посредством реакции между «реакционноспособной группой» (РГ; *например*, амин, тиол, гидроксид, карбоновая кислота или азид) с «реакционноспособным фрагментом» (РФ; *например*, малеимид, сукцинат, NHS). Предполагается несколько потенциальных путей синтеза, *например*:



/реакционноспособная группа/-[линкер]n-[BAM]

[0186] Якорный фрагмент может быть вставлен в липидный бислой ВВ, например, экзосомы, позволяя загружать экзосому ВAM, например, ASO. В настоящее время основным препятствием для коммерциализации экзосом в качестве средств доставки полярных ВAM, например, ASO, является крайне неэффективная загрузка. Это препятствие можно преодолеть путем модификации ВAM, например, ASO, прежде чем загружать их в экзосомы. Таким образом, как описано в настоящем документе, модификация ВAM, например, ASO, способствует их загрузке в экзосомы.

[0187] Способы загрузки экзосом модифицированными ВAM, например, ASO, приведенные в настоящем документе, значительно повышают эффективность загрузки по сравнению с эффективностью загрузки, ранее описанной для введения немодифицированных ВAM в экзосомы, например, путем электропорации или катионной липидной трансфекции.

[0188] В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ВAM, например, ASO, в по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9 или по меньшей мере около 10 раз по сравнению с нативной (немодифицированной) ВAM, например, соответствующим немодифицированным ASO. В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ВAM, например, ASO, на по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9 или по меньшей мере около 10 порядков величины по сравнению с нативной (немодифицированной) ВAM, например, соответствующим немодифицированным ASO.

[0189] В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ВAM, например, ASO, на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 125%, по меньшей мере около 150%, по меньшей мере около 175%, по меньшей мере около 200%, по меньшей мере около 250%, по меньшей мере около 300%, по меньшей мере около 350%, по меньшей мере около 400%, по меньшей мере около 450%, по меньшей мере около 500%, по меньшей мере около 600%, по меньшей мере около 700%, по меньшей мере около 800%, по меньшей мере около 900% или по меньшей мере около 1000% по сравнению с нативной

(немодифицированной) ВАР, например, соответствующим немодифицированным АСО. Повышения гидрофобности можно оценить с помощью любого подходящего способа. Например, гидрофобность можно определить путем измерения процента растворимости в органическом растворителе, таком как октанол, по сравнению с растворимостью в водном растворителе, таком как вода.

[0190] В некоторых аспектах якорный фрагмент может быть химически конъюгирован с ВАР, например, АСО, для усиления ее гидрофобного характера. В иллюстративных аспектах якорный фрагмент представляет собой стерин (например, холестерин), GМ1, липид, витамин, малую молекулу, пептид или их комбинацию. В некоторых аспектах фрагмент представляет собой липид. В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой стерин, например, холестерин. Дополнительные фрагменты включают в себя, например, фосфолипиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или витамины (например, витамин D или витамин E).

[0191] В некоторых аспектах якорный фрагмент конъюгирован на концах ВАР, например, АСО, прямо или посредством одного или более линкеров (т. е. «терминальная модификация»). В других аспектах якорный фрагмент конъюгирован с другими частями ВАР, например, АСО.

[0192] В некоторых аспектах АСО содержит последовательность последовательных нуклеотидов, имеющую длину от около 10 до около 30 нуклеотидов, например, 10–20, 14–20, 16–20 или 15–25 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 20 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 18 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 19 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 17 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 16 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 15 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 14 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 13 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 12 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 11 нуклеотидов. В определенных аспектах длина АСО составляет 10 нуклеотидов.

[0193] В некоторых аспектах АСО содержит последовательность последовательных нуклеотидов, имеющую длину от около 10 до около 50 нуклеотидов, например, от около 10 до около 45, от около 10 до около 40, от около 10 до около 35 или от около 10 до около 30. В определенных аспектах длина АСО составляет 21 нуклеотид. В определенных аспектах длина АСО составляет 22 нуклеотида. В определенных аспектах длина АСО составляет 23 нуклеотида. В определенных аспектах длина АСО составляет 24 нуклеотида. В определенных аспектах длина АСО составляет 25 нуклеотидов. В определенных аспектах

длина ASO составляет 26 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 27 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 28 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 29 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 30 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 31 нуклеотид. В определенных аспектах длина ASO составляет 32 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 33 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 34 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 35 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 36 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 37 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 38 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 39 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 40 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 41 нуклеотид. В определенных аспектах длина ASO составляет 42 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 43 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 44 нуклеотида. В определенных аспектах длина ASO составляет 45 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 46 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 47 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 48 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 49 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 50 нуклеотидов.

[0194] В некоторых аспектах модифицированная ВАРМ, например, ASO, может включать в себя обнаруживаемую метку. Примеры меток включают в себя флуоресцентные метки и/или радиоактивные метки. В некоторых аспектах, в которых модифицированные ВАРМ, например, ASO, являются флуоресцентно мечеными, обнаруживаемая метка может представлять собой, например, Cu^3 . Добавление обнаруживаемой метки к модифицированным ВАРМ, например, ASO, можно использовать как способ мечения экзосом и после их биораспределения. В других аспектах обнаруживаемую метку можно присоединить к экзосомам непосредственно, например, путем мечения липида экзосомы и/или пептида экзосомы.

[0195] Различные компоненты модифицированной ВАРМ (т. е. якорные фрагменты, линкеры и линкерные комбинации, а также ВАРМ, такие как ASO) могут быть связаны амидной, сложноэфирной, эфирной, тиоэфирной, дисульфидной, фосфорамидатной, фосфотриэфирной, фосфородитионатной, метилфосфонатной, фосфодиэфирной или фосфоротионатной связями или, альтернативно, любой другой связью.

[0196] В некоторых аспектах различные компоненты модифицированной ВАРМ могут быть связаны посредством бифункциональных линкеров (т. е. линкеров, содержащих

две функциональные группы), таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, N-4-малеимид-масляная кислота, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, иодацетоксисукцинимид, N-(4-малеимидбутилокси)сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбоксипентил]иминодиуксусная кислота, N-(5-аминопентил)-иминодиуксусная кислота и т. п.

П.А. Якорные фрагменты

[0197] Подходящие якорные фрагменты, способные прикреплять ВАР к поверхности ВВ, например, экзосомы, включают в себя, например, стерин (например, холестерин), липиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или жирорастворимые витамины, как подробно описано ниже.

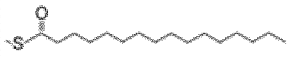
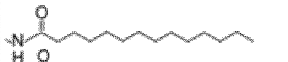
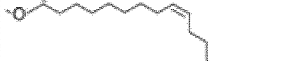
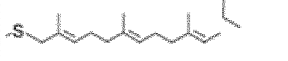
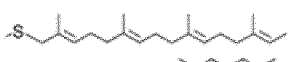
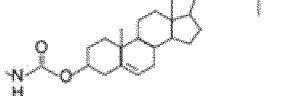
[0198] В некоторых аспектах якорный фрагмент может представлять собой липид. Липидный якорный фрагмент может представлять собой любой липид, известный в данной области техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В некоторых аспектах липид представляет собой жирную кислоту, фосфатид, фосфолипид (например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин) или их аналог (например, фосфатидилхолин, лецитин, фосфатидилэтаноламин, цефалин или фосфатидилсерин или их аналог или часть, например, их частично гидролизованную часть).

[0199] Как правило, якорные фрагменты являются химически присоединенными. Однако якорный фрагмент может быть присоединен к ВАР ферментативно. В некоторых аспектах возможно присоединить якорный фрагмент к ВАР путем модификации условий культивирования клеток. 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 сообщается, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи.

[0200] Якорный фрагмент может быть конъюгирован с ВАР прямо или опосредовано посредством линкерной комбинации в любом химически возможном месте, например, на 5'- и/или 3'-конце нуклеотидной последовательности, например, ASO. В одном аспекте якорный фрагмент конъюгирован только на 3'-конце ВАР. В одном аспекте якорный фрагмент конъюгирован только на 5'-конце нуклеотидной последовательности, например, ASO. В одном аспекте якорный фрагмент конъюгирован в месте, которое не является 3'-концом или 5'-концом нуклеотидной последовательности, например, ASO.

[0201] Некоторые типы мембранных якорей, которые можно использовать для

практического применения настоящего изобретения, представлены в следующей таблице:

Модификация	Модифицирующая группа
S-пальмитоилирование	
N-пальмитоилирование	
N-миристилоилирование	
O-ацилирование	
Фарнесилирование	
геранилгеранилирование	
Холестерол	

[0202] В некоторых аспектах якорный фрагмент по настоящему изобретению может содержать два или более типов якорных фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, в некоторых аспектах якорный фрагмент может содержать два липида, например, фосфолипид и жирную кислоту, или два фосфолипида, 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 6 до 80).

[0203] В некоторых аспектах комбинация якорных фрагментов, например, комбинация липидов (например, жирных кислот) имеет ECN 6–80, 8–80, 10–80, 12–80, 14–80, 16–80, 18–80, 20–80, 22–80, 24–80, 26–80, 28–80, 30–80, 4–76, 6–76, 8–76, 10–76, 12–76, 14–76, 16–76, 18–76, 20–76, 22–76, 24–76, 26–76, 28–76, 30–76, 6–72, 8–72, 10–72, 12–72, 14–72, 16–72, 18–72, 20–72, 22–72, 24–72, 26–72, 28–72, 30–72, 6–68, 8–68, 10–68, 12–68, 14–68, 16–68, 18–68, 20–68, 22–68, 24–68, 26–68, 28–68, 30–68, 6–64, 8–64, 10–64, 12–64, 14–64, 16–64, 18–64, 20–64, 22–64, 24–64, 26–64, 28–64, 30–64, 6–60, 8–60, 10–60, 12–56, 14–56, 16–56, 18–56, 20–56, 22–56, 24–56, 26–56, 28–56, 30–56, 6–52, 8–52, 10–52, 12–52, 14–52, 16–52, 18–52, 20–52, 22–52, 24–52, 26–52, 28–52, 30–52, 6–48, 8–48, 10–48, 12–48, 14–48, 16–48, 18–48, 20–48, 22–48, 24–48, 26–48, 28–48, 30–48, 6–44, 8–44, 10–44, 12–44, 14–44, 16–44, 18–44, 20–44, 22–44, 24–44, 26–44, 28–44, 30–44, 6–40, 8–40, 10–40, 12–40, 14–40, 16–40, 18–40, 20–40, 22–40, 24–40, 26–40, 28–40, 30–40, 6–36, 8–36, 10–36, 12–36, 14–36, 16–36, 18–36, 20–36, 22–36, 24–36, 26–36, 28–36, 30–36, 6–32, 8–32, 10–32, 12–32, 14–32, 16–32, 18–32, 20–32, 22–32, 24–32, 26–32, 28–32 или 30–32.

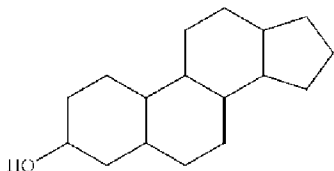
II.A.1 Холестерин и другие стерины

[0204] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стерин, стероид,

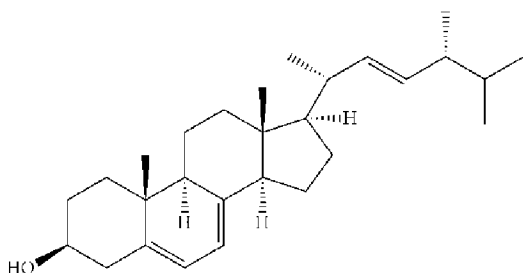
гопаноид, гидроксистероид, секостероид или их аналог с липофильными свойствами. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стерин, такой как фитостерин, микостерин или зоостерин. Иллюстративные зоостерины включают в себя холестерин и 24S-гидроксистерин; иллюстративные фитостерины включают в себя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

[0205] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стероид. В некоторых аспектах стероид выбран из дигидротестостерона, уваола, гецигенина, диосгенина, прогестерона или кортизола.

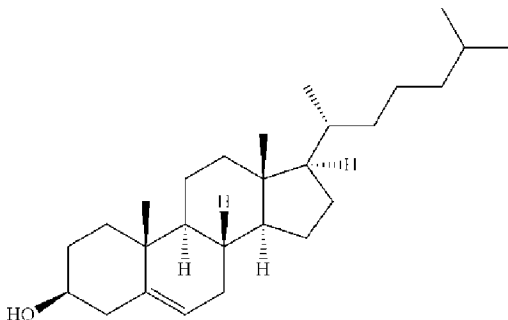
[0206] Например, стерин можно конъюгировать с ВАР непосредственно или посредством линкерной комбинации в доступной группе —ОН стерина. Иллюстративные стерин имеют общий скелет, показанный ниже:



[0207] В качестве дополнительно примера: эргостерин имеет следующую структуру:



[0208] Холестерин имеет следующую структуру:



[0209] Соответственно, в некоторых аспектах свободная группа —ОН стерина или стероида используется для конъюгирования ASO непосредственно или посредством линкерной комбинации со стеринном (например, холестеринном) или стероидом.

II.A.2. Жирные кислоты

[0210] В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой 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.

[0211] 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.

[0212] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит две жирные кислоты, каждая из которых независимо выбрана из жирной кислоты, имеющей цепь с любым из вышеуказанных диапазонов или чисел 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 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 атомов

углерода.

[0213] Подходящие жирные кислоты включают в себя 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 32 атомов углерода.

[0214] Примеры применимых насыщенных жирных кислот с прямой цепью включают в себя 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, арахиновая 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.

[0215] Примеры подходящих насыщенных разветвленных жирных кислот включают в себя 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-децилпентадекановую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту и кислоту Fine Oхocol 1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.). Подходящие насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью с нечетным числом атомов углерода включают в себя 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.

[0216] Примеры подходящих ненасыщенных жирных кислот включают в себя 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-гексадекатетраеновую 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.

[0217] Примеры подходящих гидроксигирных кислот включают в себя α -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксимиристиновую кислоту, α -гидроксипальмитиновую кислоту, α -гидроксистеариновую кислоту, ω -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксиарахиновую кислоту, 9-гидроксид-октадеценовую кислоту, рицинолевую кислоту, α -гидроксигегеновую кислоту, 9-гидроксид-транс-10,12-октадекадиеновую кислоту, камоленовую кислоту, ипуроловую кислоту, 9,10-дигидроксистеариновую кислоту, 12-гидроксистеариновую кислоту и т.п.

[0218] Примеры подходящих поликарбоновых кислот включают в себя 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.

[0219] 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, арахидиновой кислоты, гениэйкозановой кислоты, бегеновой кислоты, трикозановой кислоты, лигноцеридиновой кислоты, пентакозановой кислоты, церотиновой кислоты, гептакозановой кислоты, монтановой кислоты, нонакозановой кислоты, мелиссиновой кислоты, гентриаконтановой кислоты, лацериновой кислоты, псилластеариновой кислоты, геддовой кислоты, церопластовой кислоты, гексатриаконтановой кислоты, гептатриаконтановой кислоты или октатриаконтановой кислоты.

[0220] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из α -линоленовой кислоты, стеаридиновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты,

докозагексаеновой кислоты, линолевой кислоты, гамма-линолевой кислоты, дигомо-гамма-линолевой кислоты, арахидоновой кислоты, докозатетраеновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, вакценовой 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 кислоты или другой моновенасыщенной или полиненасыщенной жирной кислоты.

[0221] 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 нагруженных 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.

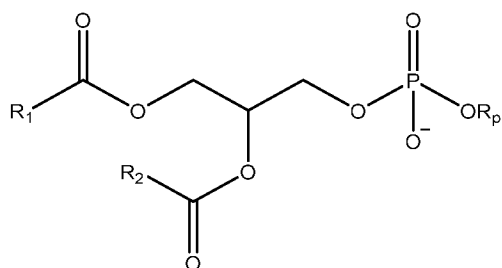
[0222] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновой кислоты, α -линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозатриеновой кислоты, эйкозатетраеновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты (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 в себя 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.

[0223] 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 около пяти или менее атомов углерода (например, масляная кислота). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой SCFA. Жирные кислоты со средней длиной цепи (MCFA) включают в себя жирные кислоты с цепями из около 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 в себя 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 в себя жирные кислоты с цепями из 22 или более атомов углерода, например, 22–60, 22–50 или 22–40 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой VLCFA.

II.A.3. Фосфолипиды

[0224] В некоторых аспектах якорный 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.

[0225] Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из

неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизифосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0226] 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.

[0227] 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.

[0228] Фосфолипиды, используемые в качестве якорных фрагментов в настоящем изобретении, могут быть природными или неприродными фосфолипидами. Также предусмотрены 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 катализируемому медью циклоприсоединению при воздействии азида.

[0229] Фосфолипиды включают в себя, помимо прочего, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты. Примеры фосфолипидов, которые могут быть использованы в якорных фрагментах, описанных в настоящем документе, включают в себя 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-олеил-фосфатидилсерин, 1-олеил-2-пальмитоил-фосфатидилсерин и диерукоилфосфатидилсерин); фосфатидные кислоты (например, дилауроилфосфатидная кислота, димиристоилфосфатидная кислота, дипальмитоилфосфатидная кислота, дистеароилфосфатидная кислота, диолеоилфосфатидная кислота, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидная кислота, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидная кислота и диерукоилфосфатидная кислота) и фосфатидилинозитолы (например, дилауроилфосфатидилинозитол, димиристоилфосфатидилинозитол, дипальмитоилфосфатидилинозитол, дистеароилфосфатидилинозитол, диолеоилфосфатидилинозитол, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилинозитол, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилинозитол и диерукоилфосфатидилинозитол).

[0230] Фосфолипиды могут быть симметричного или асимметричного типа. В контексте настоящего документа термин «симметричный фосфолипид» включает в себя глицерофосфолипиды, имеющие совпадающие фрагменты жирных кислот, и сфинголипиды, в которых переменный фрагмент жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержат сопоставимое количество атомов углерода. В контексте настоящего документа термин «асимметричный фосфолипид» включает в себя лизолипиды, 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 переменный фрагмент жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержат разное количество атомов углерода (например, переменный фрагмент жирной кислоты содержит по меньшей мере на два атома углерода больше, чем углеводородная цепь, или по меньшей мере на два атома углерода меньше, чем углеводородная цепь).

[0231] В некоторых аспектах якорный 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-диоктаноил-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-диундеканоил-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-димиристолоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ9-цис) PC), 1,2-димиристелаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ9-транс) PC), 1,2-дипальмитолоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ9-цис) PC), 1,2-дипальмителаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ9-транс) PC), 1,2-дипетроселеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ6-цис) PC); 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ9-цис) PC, DOPC), 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ9-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-диэйкозеноил-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, DHAPC), 1,2-динервноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (24:1 (цис) PC), 1,2-дигексаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (06:0 PE), 1,2-диоктаноил-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-дипальмитолоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:1 PE), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ9-цис) PE, DOPE), 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ9-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-

фосфозтаноламина (20:4 PE, DAPE), 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (22:6 PE, DHAPE), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:0 диэфира PC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевой соли (DOPG) и любой их комбинации.

[0232] В некоторых аспектах якорный 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.

[0233] В некоторых аспектах якорный 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-фосфозтаноламина (16:0-18:1 PE, POPE), 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (16:0-18:2 PE), 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (16:0-20:4 PE), 1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (16:0-22:6 PE), 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (18:0-18:1 PE), 1-стеароил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (18:0-18:2 PE), 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (18:0-20:4 PE), 1-стеароил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламина (18:0-22:6 PE), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (OChemsPC) и любой их комбинации.

[0234] Для обеспечения более заметной устойчивости к нуклеазам, эффективности клеточного поглощения и более заметного эффекта РНК-интерференции фосфатидилэтаноламины могут быть использованы в качестве якорных фрагментов, например, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин и диолеоилфосфатидилэтаноламин.

[0235] Сайт связывания липида (например, фосфолипида) и линкерной комбинации или ВАР, например, ASO, можно подходящим образом выбрать в соответствии с типами липида и линкера или ВАР. Любое положение, отличное от гидрофобных групп липида, может быть связано с линкером или ВАР посредством химической связи. Например, при использовании фосфатидилэтаноламина связь может быть образована путем образования амидной связи и т.д. между аминогруппой фосфатидилэтаноламина и линкером или ВАР. При использовании фосфатидилглицерина связь может быть образована путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка глицерина и линкером или ВАР. 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 ВАР. При использовании фосфатидной кислоты связь может быть образована путем образования фосфоэфирной связи и т.д. между фосфатным остатком и линкером или ВАР. При использовании фосфатидилинозитола связь может быть образована путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка инозитола и линкером или ВАР.

II.A.4. Лизолипиды (например, лизофосфолипиды)

[0236] В некоторых аспектах якорный 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.

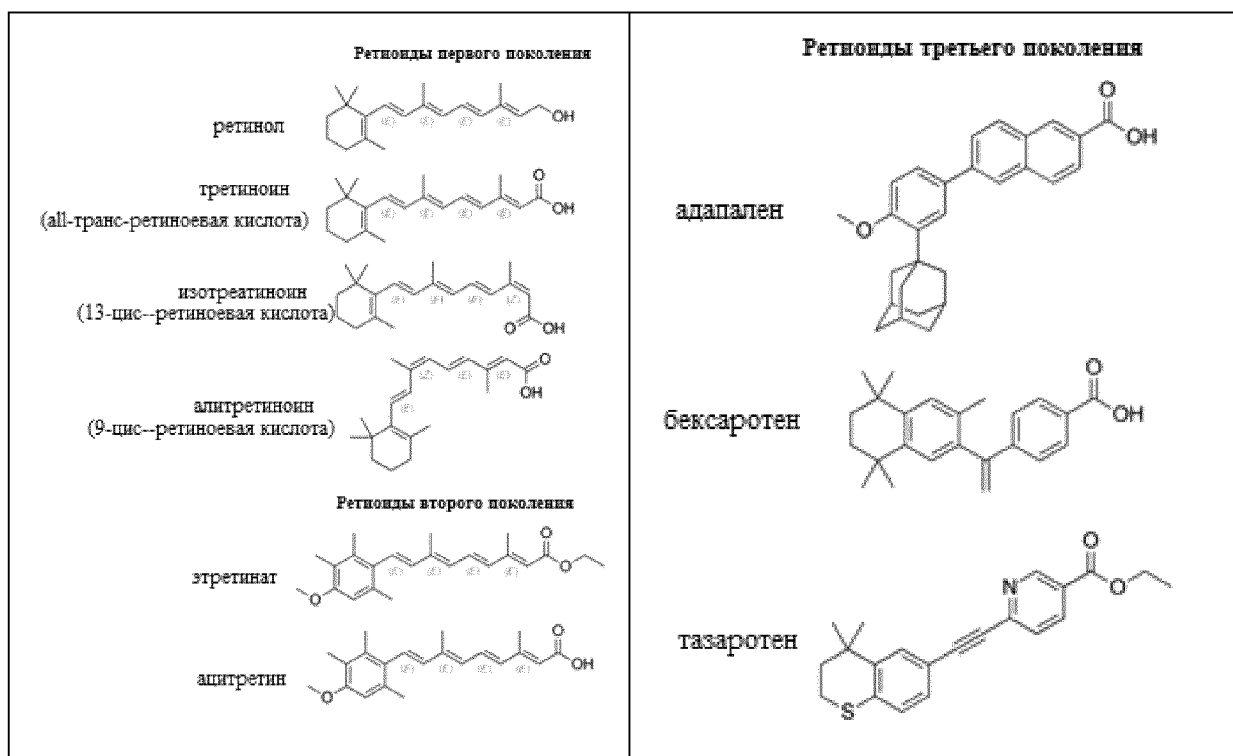
[0237] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит любой из фосфолипидов, описанных выше, в которых одна или обе ацильные цепи были удалены путем гидролиза, и, следовательно, полученный лизофосфолипид содержит одну ацильную цепь жирной кислоты или не содержит ее.

[0238] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол или лизофосфатидилсерин.

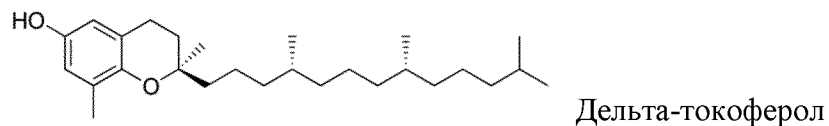
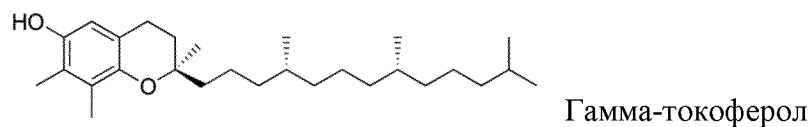
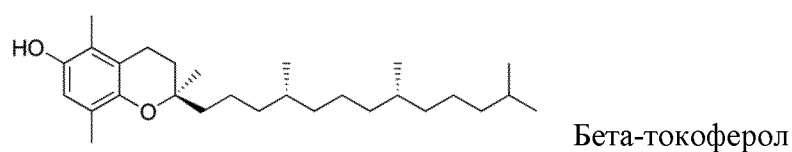
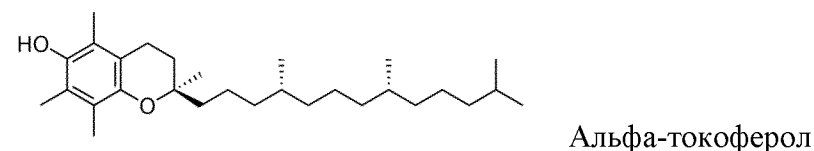
[0239] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит лизолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из 1-гексаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолина (06:0 лизо PC), 1-гептаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолина (07:0 лизо PC), 1-октаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолина (08:0 лизо 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.A.5 Витамины

[0240] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит липофильный витамин, например, фолиевую кислоту, витамин А, витамин Е или витамин К. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин А. Витамин А представляет собой группу ненасыщенных пищевых органических соединений, которая включает в себя ретинол, ретиналь, ретиноевую кислоту и несколько каротиноидов провитамина А (в первую очередь, бета-каротин). В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит ретинол. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит ретиноид. Ретиноиды представляют собой класс химических соединений, которые являются витамином А или химически связаны с ним. В некоторых аспектах якорный 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.

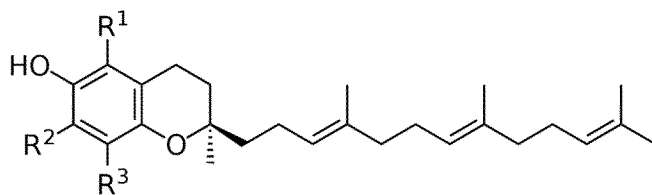


[0241] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин Е. Токоферолы представляют собой класс метилированных фенолов, многие из которых обладают активностью витамина Е. Таким образом, в некоторых аспектах якорный фрагмент содержит альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол или их комбинацию.



[0242] 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 якорный 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;

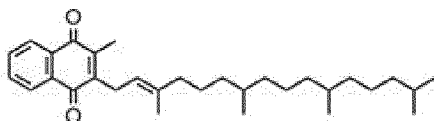
гамма(γ)-Токотриенол: R1 = H, R2 = Me, R3 = Me;

дельта(δ)-Токотриенол: R1 = H, R2 = H, R3 = Me.

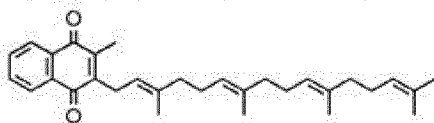
[0243] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин К. Химически семейство витаминов К включает в себя производные 2-метил-1,4-нафтохинона (3-). Витамин К включает в себя два натуральных витамера: витамин К₁ и витамин К₂. В структуре витамина К₁ (также известного как фитонадион, филлохинон 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.

[0244] Соответственно, в некоторых аспектах якорный 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.

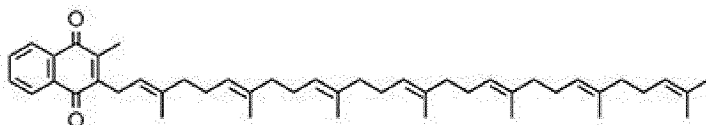
K1



МК-4



МК-7



П.В. Линкерные комбинации

[0245] В некоторых аспектах ВАР связана с гидрофобным мембранным якорным фрагментом, описанным в настоящем документе, посредством линкерной комбинации, которая может содержать любую комбинацию расщепляемых и/или нерасщепляемых линкеров. Основной функцией линкерной комбинации является обеспечение оптимального расстояния между якорным фрагментом или фрагментами и ВАР-мишенью. Например, в случае АСО линкерная комбинация должна уменьшать стерические затруднения и размещать АСО таким образом, чтобы он мог взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой, например, мРНК или микроРНК.

[0246] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы. Таким образом, в некоторых аспектах линкерная комбинация, описанная в настоящем 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»). В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит спейсер. В некоторых аспектах спейсер представляет собой ПЭГ.

[0247] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 или более различных линкеров, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах линкеры в линкерной комбинации могут быть связаны сложноэфирной связью (например, фосфодиэфиром или сложным эфиром фосфоротиоата).

[0248] В некоторых аспектах линкер представляет собой прямую связь между якорным фрагментом и ВАР, например, АSO.

II.B.1 Нерасщепляемые линкеры

[0249] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит «нерасщепляемый линкер». Нерасщепляемые линкеры представляют собой любой химический фрагмент, способный связывать два или более компонентов модифицированной биологически активной молекулы по настоящему изобретению (например, биологически активную молекулу и якорный фрагмент; биологически активную молекулу и расщепляемый линкер; якорный фрагмент и расщепляемый линкер) стабильным ковалентным образом и который не попадает в 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.

[0250] Кроме того, термин нерасщепляемый относится к способности химической связи в линкере или примыкающем к линкеру участке противостоять расщеплению, индуцированному кислотой, агентом, расщепляющим фотолabile 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 другого линкера, например, саморасщепляющегося линкера.

[0251] В некоторых аспектах линкерная комбинация 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.

[0252] 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, фосфодиэфир или сложный эфир фосфоротиоата) или другую связь.

II.B.1.a. Этиленгликоли (HEG, ТЭГ, ПЭГ)

[0253] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит нерасщепляемый

линкер, причем 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.

[0254] В некоторых аспектах линкер ПЭГ представляет собой линкер на основе олигоэтиленгликоля, например, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, тетраэтиленгликоля (ТЭГ), пентаэтиленгликоля или гексаэтиленгликоля (HEG).

[0255] 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. 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. В некоторых конкретных аспектах n имеет значение от 3 до 200, от 3 до 20, от 10 до 30 или от 9 до 45. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой разветвленный ПЭГ. Разветвленные ПЭГ содержат от трех до десяти цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра.

[0256] 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.

[0257] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой звездчатый ПЭГ. Звездчатые ПЭГ содержат от 10 до 100 цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой гребенчатый ПЭГ. Гребенчатые ПЭГ имеют несколько цепей ПЭГ, обычно привитых к остову полимера.

[0258] 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.

[0259] 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.

[0260] В некоторых аспектах линкерная комбинация по настоящему изобретению может содержать несколько линкеров на основе ПЭГ, например, расщепляемый линкер, фланкированный линкерами на основе ПЭГ, HEG или ТЭГ. В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит (HEG)_n и/или (ТЭГ)_n, причем 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 фосфоротиоата или их комбинации.

II.B.1.b. Глицерин и полиглицерины (PG)

[0261] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит нерасщепляемый линкер, содержащий глицериновую единицу или полиглицерин (PG), описываемые формулой ((R₃—O—(CH₂—CHОН—CH₂O)_n—), где R₃ 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.

[0262] В некоторых аспектах линкер на основе PG представляет собой линкер на основе диглицерина, триглицерина, тетраглицерина (TG), пентаглицерина или гексаглицерина (HG). 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. 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.

[0263] 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, цитируемых в указанной публикации.

[0264] 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.

[0265] 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.

[0266] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит (глицерин) n и/или (HG) n и/или (TG) n , причем 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 комбинации.

II.B.1.c. Аليفатические (алкильные) линкеры

[0267] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит по меньшей мере один алифатический (алкильный) линкер, например, пропил, бутил, гексил или C2–C12 алкил, такой как C2–C10 алкил или C2–C6 алкил.

[0268] В некоторых аспектах линкерная комбинация 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, алкениларилалкил, алкенилреилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил или алкенилгетероциклилалкинил.

[0269] Необязательно эти компоненты являются замещенными. Заместители включают в себя спирт, алкокси (такой как метокси, этокси и пропокси), алкил с прямой или разветвленной цепью (такой как C1–C12 алкил), амин, аминокалкил (такой как аминок 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, сульфонилогалогенид, имидатный сложный эфир, изоцианат, изотиоцианат, галогенформиат, 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.

[0270] 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 десяти 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 в себя двух- и многовалентные радикалы. Например, термин «алкил» включает в себя «алкилен», где это уместно, *например*, когда формула указывает, что алкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца. Примеры алкильных радикалов включают в себя, помимо прочего, 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.

[0271] Термин «алкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную (бирадикальную) алкильную группу, в которой алкил определен в настоящем документе. Примером «алкилена» является, помимо прочего, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. 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.

[0272] 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 в себя 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.

[0273] 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 в себя проп-1-инил, проп-2-инил (*т.е.* пропаргил), этинил и 3-бутинил.

[0274] 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.

[0275] Термин «гетероалкил» сам 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, выбранного, *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(-ы) азота необязательно кватернизован(-ы). Гетероатом(-ы) помещен(-ы) в любое внутреннее положение гетероалкильной группы. Примеры гетероалкильных групп включают в себя, помимо прочего, -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.

[0276] 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 в себя «гетероалкилен», где это уместно, *например*, когда формула указывает, что гетероалкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца.

[0277] 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 в себя, помимо прочего, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, циклогептил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Термин «циклоалкил» также включает в себя мостиковые, полициклические (*например*, бициклические) структуры, такие как норборнил, адамантил и бицикло[2.2.1]гептил. «Циклоалкильная» группа может быть слита с по меньшей мере одним (*например*, от 1 до 3) другим кольцом, выбранным из арильного (*например*, фенильного), гетероарильного (*например*, пиридинильного) и неароматического (*например*, карбоциклического или гетероциклического) колец. Когда «циклоалкильная» группа включает в себя слитое арильное, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, тогда «циклоалкильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством карбоциклического кольца.

[0278] 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(-ы) азота необязательно кватернизован(-ы) (*например*, от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы), или слитую кольцевую систему из 4–8 членных колец, 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 техники. Примеры гетероциклоалкильных групп включают в себя слитое фенильное кольцо. Когда «гетероциклическая» группа включает в себя слитое 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.

[0279] Типичные гетероциклоалкильные или гетероциклические группы по настоящему изобретению включают в себя 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-диоксид, 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.

[0280] Под «арилом» подразумевается 5-, 6- или 7-членная ароматическая карбоциклическая группа, имеющая одно кольцо (*например*, фенил), или слитая 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 заместителями, описанными в настоящем документе). В одном примере арильная группа содержит от 6 до 10 атомов углерода. Неограничивающие примеры арильных групп включают в себя фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, хиолин, инданил, инденил, дигидронафтил, флуоренил, тетралинил,

бензо[d][1,3]диоксолил или 6,7,8,9-тетрагидро-5Н-бензо[а]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.

[0281] 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 настоящем документе. Иллюстративные «арилалкильные» или «аралкильные» группы включают в себя бензил, фенетил, пиридилметил и т.п.

[0282] Под «арилокси» подразумевается группа -О-арил, где арил является таким, как определено в настоящем документе. В одном примере арильная часть арилоксигруппы представляет собой фенил или нафтил. Арильная часть арилоксигруппы в одном аспекте представляет собой фенил.

[0283] 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, например, 1–3 гетероатома), выбранный из N, O, S, Si и B (*например*, N, O и S), где атомы азота и серы необязательно окислены, а атом(-ы) азота необязательно кватернизован(-ы). «Гетероарильная» группа может представлять собой одно кольцо или быть слитой с другими арильными, гетероарильными, циклоалкильными или гетероциклоалкильными кольцами (*например*, от 1 до 3 других колец). Когда «гетероарильная» группа содержит слитое 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.

[0284] 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 в себя 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, изобензотетрагидротииенил, изобензотиенил, бензоксазолил, пиридопиридил, бензотетрагидрофуранил, бензотетрагидротииенил, 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, тиadiaзолил N-оксид, триазолил N-оксид, тетразолил N-оксид, бензотиопиранил S-оксид, бензотиопиранил S,S-диоксид. Иллюстративные гетероарильные группы включают в себя имидазолил, пиразолил, тиadiaзолил, триазолил, изоксазолил, изотиазолил, имидазолил, тиазолил, оксадиазолил и пиридил. Другие иллюстративные гетероарильные группы включают в себя 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.

[0285] Примеры алифатических линкеров включают в себя 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).

[0286] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит $(\text{C}_3)_n$, $(\text{C}_4)_n$, $(\text{C}_5)_n$, $(\text{C}_6)_n$, $(\text{C}_7)_n$ или $(\text{C}_8)_n$, 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.2. Расщепляемые линкеры

[0287] В некоторых аспектах различные компоненты ASO, описанные в настоящем документе, могут являться линкером, который представляет 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 настоящего 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, pH, присутствием активных форм кислорода или определенными длинами волн света.

[0288] В некоторых аспектах термин «расщепляемый» в контексте настоящего 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.

[0289] В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой динуклеотидный или тринуклеотидный линкер, дисульфид, имин, тиокеталь, дипептид val-cit или любую их комбинацию.

[0290] В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

II.B.2.a. Редокс-расщепляемые линкеры

[0291] В некоторых аспектах линкерная комбинация включает в себя 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.2.b. Линкеры, расщепляемые активными формами кислорода (ROS)

[0292] В некоторых аспектах линкерная комбинация может содержать расщепляемый линкер, который может расщепляться активными формами кислорода (ROS), такими как супероксид (Of) или пероксид водорода (H₂O₂), 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

II.B.2.c. pH-зависимые расщепляемые линкеры

[0293] В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер», содержащий расщепляемую кислотой связывающую группу, которая представляет собой связывающую группу, которая селективно расщепляется в кислых условиях (pH<7).

[0294] В качестве неограничивающего примера расщепляемая кислотой связывающая группа отщепляется в кислой среде, например, около 6,0, 5,5, 5,0 или меньше. В некоторых аспектах pH составляет около 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, варьируясь от около 7,1 до 7,3. Эндосомы также имеют кислое значение pH в диапазоне от 5,5 до 6,0, а лизосомы – около 5,0 при еще более кислом значении pH. Соответственно, pH-зависимые расщепляемые линкеры иногда в данной области техники называют эндосомно лабильными линкерами.

[0295] Расщепляемая кислотой группа может иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O

или -OC(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 в себя, помимо прочего, амин, имин, сложный аминоэфир, бензойный имин, диортоэфир, полифосфоэфир, 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.

[0296] В некоторых аспектах линкер содержит гидразоновую связь, неустойчивую к низкому 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 (2007) *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.

[0297] В определенных аспектах линкер содержит связь, неустойчивую к низкому pH, выбранную из следующего: кетали, которые являются неустойчивыми в кислой среде (например, при pH менее 7, более чем около 4) с образованием диола и кетона; ацетали, которые являются неустойчивыми в кислой среде (например, при pH менее 7, более чем около 4) с образованием диола и альдегида; имины или иминии, которые являются неустойчивыми в кислой среде (например, при pH менее 7, более чем около 4) с образованием амина и альдегида или кетона; связи кремний-кислород-углерод, которые являются неустойчивыми 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); сложные ортоэфиры; гидразоны; активированные производные карбоновой кислоты (например, сложные эфиры, амиды), предназначенные для кислотно-катализируемого гидролиза) или виниловые эфиры.

[0298] Дополнительные примеры можно найти в патентах США №№ 9790494B2 и 8137695B2, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

II.B.2.d. Ферментативные расщепляемые линкеры

[0299] В некоторых аспектах линкерная комбинация может содержать линкер,

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

II.B.2.e. Линкеры, расщепляемые протеазой

[0300] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит 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., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) и Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). 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.

[0301] В некоторых аспектах расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления для протеазы, *например*, неприлизина (CALLA или CD10), тиметолигопептидазы (TOP), лейкотриеновой гидролазы A4, эндотелин-конвертирующих ферментов, протеазы ste24, нейролизина, митохондриальной промежуточной пептидазы, интерстициальных коллагеназ, коллагеназ, стромелизинов, эластазы макрофагов, матрилизина, желатиназы, мепринов, проколлагеновых С-эндопептидаз, проколлагеновых N-эндопептидаз, металлопротеиназ ADAM и ADAMT, миелиноассоциированных металлопротеиназ, энамелизина, фактор некроза опухоли α -конвертирующего фермента, инсулизина, нардилизина, митохондриальной процессинговой пептидазы, магнолизина, дактилизин-подобных металлопротеаз, 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, пептидглицаназы, 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, гликозилфосфатидилинозитолпротеинтрансферазы, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0302] 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 в себя, помимо прочего, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, пентапептиды и гексапептиды.

[0303] 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 себя, 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, опухолеассоциированной протеазой, катепсином B, C и D или протеазой плазмينا.

[0304] Аминокислоты также включают в себя 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 в данной области техники. Примеры дипептидов включают в себя, помимо прочего, валин-аланин, валин-цитруллин, фенилаланин-лизин, N-метил-валин-цитруллин, циклогексилаланин-лизин и бета-аланин-лизин. Примеры трипептидов включают в себя, помимо прочего, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).

II.B.2.f. Линкеры, расщепляемые эстеразой

[0305] 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 связывающих групп на основе сложных эфиров включают в себя, помимо прочего, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемая сложным эфиром связывающая группа имеет общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$.

II.B.2.g. Линкеры, расщепляемые фосфатазой

[0306] В некоторых аспектах линкерная комбинация может включать в себя расщепляемую связывающую группу на основе фосфата, расщепляемую агентом, который разрушает или гидролизует фосфатные группы. Примером агента, расщепляющего внутриклеточные фосфатные группы, является фермент, такой как внутриклеточная фосфатаза. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-SP(S)(OR_k)-O-$, $-OP(O)(R_k)-O-$, $-OP(S)(R_k)-O-$, $-SP(O)(R_k)-O-$, $-SP(S)(R_k)-O-$, $-SP(O)(R_k)-S-$ или $-OP(S)(R_k)-S-$. В различных аспектах R_k представляет собой любое из следующего: NH_2 , BH_3 , CH_3 , C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{1-6} алкокси и C_{6-10} арил-окси. 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.2.h. Фотоактивированные расщепляемые линкеры

[0307] В некоторых аспектах линкерная комбинация включает в себя фотоактивированный расщепляемый линкер, например, нитробензильный линкер или линкер, содержащий нитробензильную реакционноспособную группу.

II.B.2.i. Саморасщепляющийся линкер

[0308] В некоторых аспектах линкерная комбинация включает в себя саморасщепляющийся линкер. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер в ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,4-элиминированию после ферментативного расщепления линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер в ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,6-элиминированию после ферментативного расщепления линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер представляет собой, например, производное пара-аминобензила (pAB), такое как пара-аминобензилкарбамат (pABC), пара-аминобензиловый эфир (PABE), пара-аминобензилкарбонат или их комбинацию. В определенных аспектах саморасщепляющийся линкер 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, галогеналкила, C₁-C₈ алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната. В других аспектах по меньшей мере один C 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, галогеналкила, C₁-C₈ алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната.

[0309] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер содержит аминокбензилкарбаматную группу (*например*, пара-аминобензилкарбамат), аминокбензилэфирную группу или аминокбензилкарбонатную группу. В одном аспекте саморасщепляющийся линкер представляет собой пара-аминобензилкарбамат (pABC). pABC является наиболее эффективным и наиболее распространенным соединительным звеном для саморасщепляющейся сайт-специфической активации пролекарства (см.,

например, Carl *et al.* J. Med. Chem. 24:479-480 (1981); WO 1981/001145; Rautio *et al.*, Nature Rev. Drug Disc. 7:255-270 (2008); Simplicio *et al.*, Molecules 13:519-547 (2008)).

[0310] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер соединяет биологически активную молекулу (*например*, ASO) с расщепляемым протеазой субстратом (*например*, Val-Cit). В конкретных аспектах карбаматная группа саморасщепляющегося линкера pABC соединена с аминогруппой биологически активной молекулы (*например*, ASO), а аминогруппа саморасщепляющегося линкера pABC соединена с расщепляемым протеазой субстратом.

[0311] 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 настоящего документа символ «R_x» (*например*, R₁, R₂, R₃, R₄) представляет собой общее сокращение, обозначающее группу заместителей, как описано в настоящем документе. Группы заместителей могут улучшать способность пара-аминокбензильной группы к саморасщеплению. (Hay *et al.*, J. Chem Soc., Perkin Trans. 1:2759-2770 (1999); см. также Sykes *et al.* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:1601-1608 (2000)).

[0312] Саморасщепление может происходить, *например*, посредством 1,4-элиминирования, 1,6-элиминирования (*например*, pABC), 1,8-элиминирования (*например*, пара-аминоциннамилловый спирт), □-элиминирования, циклизации-элиминирования (*например*, сложный эфир 4-аминобутанола и этилендиамина), циклизации/лактонизации, циклизации/лактолизации и *т.д.* См., *например*, Singh *et al.* Curr. Med. Chem. 15:1802-1826 (2008); Greenwald *et al.* J. Med. Chem. 43:475-487 (2000).

[0313] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер может содержать, *например*, циннамильную, нафтильную или бифенильную группы (см., *например*, Blencowe *et al.* Polym. Chem. 2:773-790 (2011)). В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер содержит гетероциклическое кольцо (см., *например*, патенты США №№ 7375078; 7754681). Многочисленные гомоароматические группы (см., *например*, Carl *et al.* J. Med. Chem. 24:479 (1981); Senter *et al.* J. Org. Chem. 55:2975 (1990); Taylor *et al.* J. Org. Chem. 43:1197 (1978); Andrianomenjanahary *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1903 (1992)), и гетероароматические группы на основе кумарина (см., *например*, Weinstein *et al.* Chem. Commun. 46:553 (2010)), фурана, тиафена, тиазола, оксазола, изоксазола, пиррола, пиразола (см., *например*, Hay *et al.* J. Med. Chem. 46:5533 (2003)), пиридина (см., *например*, Perry-Feigenbaum *et al.* Org. Biomol. Chem. 7:4825 (2009)), имидазона (см., *например*, Nailor *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1267 (1999); Hay and Denny, Tetrahedron Lett. 38:8425 (1997)) и триазола (см.,

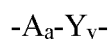
например, Bertrand and Gesson, J. Org. Chem. 72:3596 (2007)), которые являются саморасщепляющимися как в водных, так и в физиологических условиях, известны в данной области техники. См. также патенты США №№ 7691962; 7091186; патентные публикации США №№ US2006/0269480; US2010/0092496; US2010/0145036; US2003/0130189; US2005/0256030)

[0314] В некоторых аспектах линкерная комбинация, описанная в настоящем документе, содержит более одного саморасщепляющегося линкера в tandemе, например, две или более единиц pABC. См., например, de Groot *et al.* J. Org. Chem. 66:8815-8830 (2001). В некоторых аспектах линкерная комбинация, описанная в настоящем документе, может содержать саморасщепляющийся линкер (например, пара-аминобензиловый спирт или гемитиоаминальное производное пара-карбоксибензальдегида или глиоксиловой кислоты), связанный с флуорогенным зондом (см., например, Meyer *et al.* Org. Biomol. Chem. 8:1777-1780 (2010)).

[0315] 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-».

[0316] Группы заместителей в саморасщепляющемся линкере, например, заместители R₁ и/или R₂ в пара-аминобензильном саморасщепляющемся линкере, как обсуждалось выше, могут включать в себя, например, алкил, алкилен, алкенил, алкинил, алкокси, алкиламино, алкилтио, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, арилалкил, арилокси, гетероарил и *т.д.* Когда соединение по настоящему изобретению содержит более одного заместителя, тогда каждый из заместителей выбран независимо.

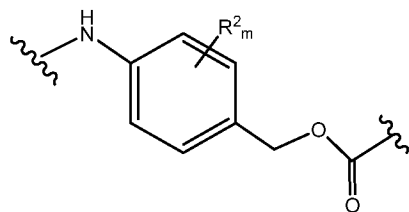
[0317] В некоторых конкретных аспектах саморасщепляющийся линкер присоединен к расщепляющемуся пептидному линкеру, имеющему следующую формулу, комбинация имеет следующую формулу:



где каждый -A- независимо представляет собой аминокислотную единицу, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; -Y- представляет собой саморасщепляющийся спейсер, а у равно 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.

[0318] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер $-Y_y-$ имеет следующую формулу:



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. В некоторых аспектах m равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах m равно 0.

[0319] В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

II.B.3. Реакционноспособные фрагменты (РФ)

[0320] ASO по настоящему изобретению получают либо путем химического синтеза, либо путем химической реакции их компонентов. Например, в некоторых аспектах якорный фрагмент, содержащий реакционноспособную группу (например, малеимид), может вступать в реакцию с ВАМ, содержащей реагирующую с малеимидом группу, с получением модифицированной ВАМ по настоящему изобретению, где якорный фрагмент может вставляться в липидный бислой мембраны экзосомы, тем самым присоединяя ВАМ к поверхности экзосомы.

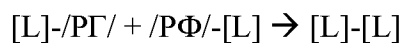
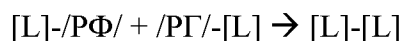
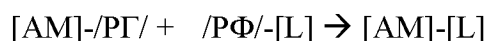
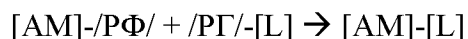
[0321] Любой компонент или группа компонентов модифицированной ВАМ по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере РГ и/или РФ, которые обеспечат присоединение компонентов посредством одной реакции или серии реакций, с получением модифицированной ВАМ по настоящему изобретению. Примеры схем синтеза для получения модифицированных ВАМ включают в себя:





где [AM] представляет собой якорный фрагмент, [BAM] представляет собой биологически активную молекулу, [L] представляет собой линкер или линкерную комбинацию, /PФ/ представляет собой реакционноспособный фрагмент, а /PG/ представляет собой реакционноспособную группу. В любом представленном схематическом представлении BAM может быть присоединена, например, посредством своего 5'-конца или 3'-конца.

[0322] Примеры схем синтеза для получения промежуточных соединений при синтезе BAM включают в себя:



где [AM] представляет собой якорный фрагмент, [BAM] представляет собой биологически активную молекулу, [L] представляет собой линкер или линкерную комбинацию, /PФ/ представляет собой реакционноспособный фрагмент, а /PG/ представляет собой реакционноспособную группу. В любом представленном схематическом представлении BAM может быть присоединена, например, посредством своего 5'-конца или 3'-конца.

[0323] В некоторых аспектах реакционноспособная группа «/PG/» может представлять собой, например, аминогруппу, тиольную группу, гидроксильную группу, группу карбоновой кислоты или азидную группу. Конкретные реакционноспособные фрагменты «/PФ/», которые могут вступать в реакцию с этими реакционноспособными группами, более подробно описаны ниже.



[0324] Любой якорный фрагмент, линкер, линкерная комбинация или BAM, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с реакционноспособным фрагментом, например, реакционноспособным аминфрагментом (например, сложный эфир NHS, пара-нитрофенол, изотиоцианат, изоцианат или альдегид), реакционноспособным тиольным фрагментом (например, акрилат, малеимид или пиридилдисульфид), реакционноспособным гидроксифрагментом (например, изотиоцианат или изоцианат), реакционноспособным фрагментом карбоновой кислоты (например, эпоксид) или реакционноспособным азидным фрагментом (например, алкин).

[0325] Примеры реакционноспособных фрагментов, которые можно использовать для ковалентного связывания двух компонентов, описанных в настоящем документе

(например, якорного фрагмента и ВАМ, или якорного фрагмента и линкера, или якорного фрагмента и линкера, или двух линкеров, или линкера и ВАМ, или двух якорных фрагментов), включают в себя, например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, N-4-малеимид-масляную кислоту, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, иодацетоксисукцинимид, N-(4-малеимидбутирилокси)сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбоксипентил]иминодиуксусную кислоту, N-(5-аминопентил)иминодиуксусную кислоту и 1'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит). Также можно использовать бифункциональные линкеры (линкеры, содержащие две функциональные группы).

[0326] В некоторых аспектах якорный фрагмент, линкер или ВАМ может содержать концевую оксиаминогруппу, например, —ONH_2 , гидразиногруппу, —NHNH_2 , меркаптогруппу (т. е. SH или тиол) или олефин (например, CH=CH_2). В некоторых аспектах якорный фрагмент, линкер или ВАМ может содержать электрофильный фрагмент, например, в концевом положении, например, альдегид, алкилгалогенид, мезилат, тозилат, нозилат или брозилат, или активированный сложный эфир карбоновой кислоты, например, сложный эфир NHS, фосфорамидит или пентафторфениловый сложный эфир. В некоторых аспектах ковалентная связь может быть образована путем сочетания нуклеофильной группы лиганда, например, гидроксильной, тиольной или аминогруппы, с электрофильной группой Настоящее изобретение подходит для различных реакционноспособных групп и реакционноспособных фрагментов, включая, помимо прочего, известные в данной области техники.

[0327] Термин «защитная группа» в контексте настоящего документа относится к лабильному химическому фрагменту, который, как известно в данной области техники, защищает реакционноспособные группы, включая, помимо прочего, гидроксильную, амино- и тиольную группы, от нежелательных реакций в ходе процедур синтеза. Защитные группы, как правило, используют селективно и/или ортогонально для защиты сайтов в ходе реакций в других реакционноспособных сайтах и могут затем быть удалены, чтобы оставить незащищенную группу как есть, или быть доступными для последующих реакций. Защитные группы, известные в данной области техники, в целом описаны в Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999).

[0328] Кроме того, различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке с получением желаемых соединений. Синтетические химические превращения и методологии для защитных групп (введение защитной группы и снятие защитной группы), пригодные при синтезе соединений, описанных в настоящем документе, известны в данной области техники и включают в себя,

например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), а также в их последующих изданиях.

[0329] Твердофазный синтез, известный в данной области техники, может быть использован дополнительно или альтернативно. Подходящие твердофазные методики, включая методики автоматизированного синтеза, описаны в F. Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991) и Toy, P.H.; Lam, Y (ed.), *Solid-Phase Organic synthesis, concepts, Strategies, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (2012).

[0330] В некоторых аспектах реакционноспособная группа может альтернативно вступать в реакцию с более чем одним из реакционноспособных фрагментов, описанных ниже.

II.B.3.a. Реакционноспособные аминфрагменты

[0331] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный аминфрагмент. В контексте настоящего документа термин «реакционноспособный аминфрагмент» относится к химическим группам, которые могут вступать в реакцию с реакционноспособной группой, имеющей аминфрагмент, например, первичные амины. Примерами реакционноспособных аминфрагментов являются сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (сложные эфиры NHS), пара-нитрофенол, изотиоцианат, изоцианат или альдегид. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые могут вступать в реакцию с первичными аминами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, линкерной комбинации или ВАР по настоящему изобретению.

[0332] В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой сложный эфир NHS. Как правило, реакционноспособный фрагмент в виде сложного эфира NHS может вступать в реакцию с первичным амином реакционноспособной группы с получением стабильной амидной связи и N-гидроксисукцинимиды (NHS).

[0333] В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой пара-нитрофеноловую группу. Как правило, пара-нитрофеноловый реакционноспособный фрагмент представляет собой активированный карбамат, который вступает в реакцию с первичным амином реакционноспособной группы с получением

стабильного карбаматного фрагмента и пара-нитрофенола.

[0334] В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой изотиоцианат. Как правило, изотиоцианат вступает в реакцию с первичным амином реакционноспособной группы с получением стабильного фрагмента тиомочевины.

[0335] В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой изоцианат. Как правило, изоцианат вступает в реакцию с первичным амином реакционноспособной группы с получением стабильного фрагмента мочевины.

[0336] В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой альдегид. Как правило, альдегиды вступают в реакцию с первичными аминами с образованием оснований Шиффа, которые можно дополнительно восстанавливать с образованием ковалентной связи посредством восстановительного аминирования.

II.B.3.b. Реакционноспособные тиольные фрагменты

[0337] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный тиольный фрагмент. В контексте настоящего документа термин «реакционноспособный тиольный фрагмент» относится к химическим группам, которые могут вступать в реакцию с реакционноспособной группой, имеющей тиольный фрагмент (или меркаптогруппу). Примерами реакционноспособных тиольных фрагментов являются акрилаты, малеимиды и пиридилдисульфиды. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые могут вступать в реакцию с тиолами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный тиольный фрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, линкерной комбинации или ВАМ по настоящему изобретению.

[0338] В некоторых аспектах реакционноспособный тиольный фрагмент представляет собой акрилат. Как правило, акрилаты вступают в реакцию с тиолами у β -атома углерода с карбонилем акрилата с образованием стабильной сульфидной связи. В некоторых аспектах реакционноспособный тиольный фрагмент представляет собой малеимид. Как правило, малеимиды вступают в реакцию с тиолами у любого из β -атомов углерода с карбонилами с образованием стабильной сульфидной связи. В некоторых аспектах реакционноспособный тиольный фрагмент представляет собой пиридилдисульфид. Как правило, пиридилдисульфиды вступают в реакцию с тиолами у β -атома серы с пиридилом с образованием стабильной дисульфидной связи и пиридин-2-тиона.

II.B.3.c. Реакционноспособные гидроксифрагменты

[0339] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный гидроксильный фрагмент. В контексте настоящего документа термин «реакционноспособный гидроксильный фрагмент» относится к химической группе, которая может вступать в реакцию с реакционноспособной группой, имеющей гидроксильный фрагмент. Примерами реакционноспособных гидроксильных фрагментов являются изотиоцианаты и изоцианаты. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые могут вступать в реакцию гидроксильными фрагментами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный гидроксильный фрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, линкерной комбинации или ВАМ по настоящему изобретению.

[0340] В некоторых аспектах реакционноспособный гидроксильный фрагмент представляет собой изотиоцианат. Как правило, изотиоцианат вступает в реакцию с гидроксилом реакционноспособной группы с получением стабильного карбамотиоатного фрагмента. В некоторых аспектах реакционноспособный аминфрагмент представляет собой изоцианат. Как правило, изоцианат вступает в реакцию с гидроксилом реакционноспособной группы с получением стабильного карбаматного фрагмента.

II.B.3.d. Реакционноспособные фрагменты карбоновой кислоты

[0341] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный фрагмент карбоновой кислоты. В контексте настоящего документа термин «реакционноспособный фрагмент карбоновой кислоты» относится к химическим группам, которые могут вступать в реакцию с реакционноспособной группой, имеющей фрагмент карбоновой кислоты. Примером реакционноспособных фрагментов карбоновой кислоты является эпоксид. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые вступают в реакцию с фрагментами карбоновой кислоты, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент карбоновой кислоты может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, линкерной комбинации или ВАМ по настоящему изобретению.

[0342] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент карбоновой кислоты представляет собой эпоксид. Как правило, эпоксид вступает в реакцию с карбоновой кислотой реакционноспособной группы у любого из атомов углерода эпоксида с образованием 2-гидроксиэтилацетатного фрагмента.

II.B.3.e. Реакционноспособные азидные фрагменты

[0343] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный азидный фрагмент. В контексте настоящего документа термин «реакционноспособный азидный фрагмент» относится к химическим группам, которые могут вступать в реакцию с реакционноспособной группой, имеющей азидный фрагмент. Примером реакционноспособных азидных фрагментов является алкин. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые вступают в реакцию с азидными фрагментами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент карбоновой кислоты может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, линкерной комбинации или ВАР по настоящему изобретению.

[0344] В некоторых аспектах реакционноспособный азидный фрагмент представляет собой алкин. Как правило, алкин вступает в реакцию с азидом реакционноспособной группы посредством реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения, также называемой «клик-химией», с образованием 1,2,3-триазольного фрагмента.

II.B.4. Конкретные примеры и топологии

[0345] В конкретных аспектах настоящего изобретения линкерная комбинация состоит из линкера формулы

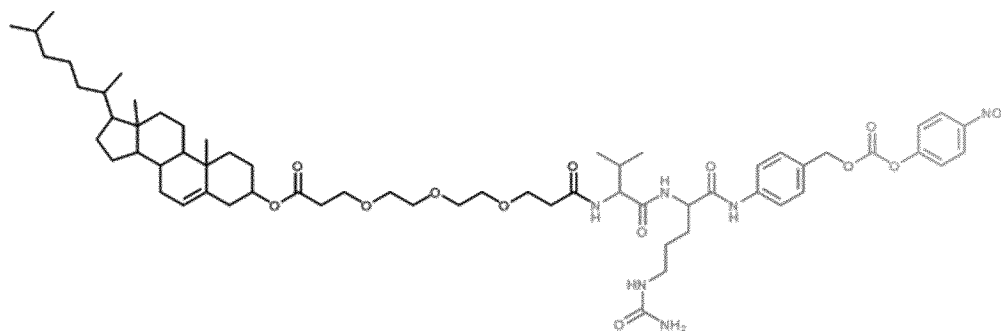
[Алкильный линкер]_m-[ПЭГ1]_n-[ПЭГ2]_o

где m, n и o равны 0 или 1, и по меньшей мере один из m, n или o не равен нулю. Примерами линкерных комбинаций в соответствии с такой формулой являются С6-ТЭГ-НЕГ, С6-НЕГ, С6-ТЭГ, С6, ТЭГ-НЕГ, ТЭГ, С8-ТЭГ-НЕГ, С8-НЕГ, С8-ТЭГ и С8.

[0346] В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит нерасщепляемый линкер (например, ТЭГ или НЕГ) в комбинации с одним или более расщепляемых линкеров, например, ферментативно расщепляемым линкером и саморасщепляющимся линкером.

[0347] В конкретном аспекте линкерная комбинация содержит линкерную комбинацию ТЭГ (нерасщепляемый линкер)-Val-Cit(расщепляемый линкер)-pAB(саморасщепляющийся линкер), как показано ниже

[Холестерин]-[ТЭГ]-[Val-Cit]-[pAB]



[0348] Конкретные комбинации якорных фрагментов и линкерных комбинаций показаны в таблицах ниже.

ТАБЛИЦА 1.

Якорный фрагмент	Линкерная комбинация		
	1^{ый} линкер	2^{ой} линкер	3^{ий} линкер
Холестерин	C6	ТЭГ	HEG
Холестерин	C6	HEG	Нет
Холестерин	C6	ТЭГ	Нет
Холестерин	C6	Нет	Нет
Холестерин	ТЭГ	HEG	Нет
Холестерин	ТЭГ	Нет	Нет
Токоферол	C8	ТЭГ	HEG
Токоферол	C8	HEG	Нет
Токоферол	C8	ТЭГ	Нет
Токоферол	C8	Нет	Нет
Токоферол	ТЭГ	HEG	Нет
Токоферол	HEG	Нет	Нет
Токоферол	ТЭГ	Нет	Нет
Токоферол	Нет	Нет	Нет
Пальмитат	C6	ТЭГ	HEG
Пальмитат	C6	HEG	Нет

Пальмитат	C6	ТЭГ	Нет
Пальмитат	C6	Нет	Нет
Холестерин	ТЭГ	Глицерин	HEG

ТАБЛИЦА 2.

Линкерная комбинация		
Линкер 1	Расщепляемый линкер 2	Линкер 3
C6	Дисульфид Имин Тиокеталь Три/динуклеотид Val-Cit	C6
Отсутствует		Отсутствует
ТЭГ		ТЭГ
HEG		HEG
ТЭГ-HEG		ТЭГ-HEG

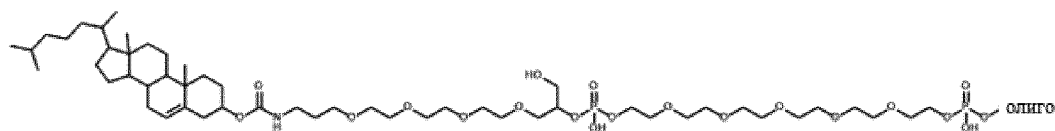
[0349] В некоторых аспектах линкерная комбинация имеет общую структуру [AM]-[Линкер1]-[Линкер2]-[BAM], где якорный фрагмент [AM] выбран из холестерина, пальмитата и токоферола, первый линкер [Линкер1] представляет собой гидрофобный линкер, а второй линкер [Линкер2] представляет собой гидрофильный линкер. В других аспектах линкерная комбинация имеет общую структуру [AM]-[Линкер1]-[Линкер2]-[BAM], где якорный фрагмент [AM] выбран из холестерина, пальмитата и токоферола, первый линкер [Линкер1] представляет собой гидрофильный линкер, и второй линкер [Линкер2] представляет собой гидрофильный линкер. В других аспектах линкерная комбинация имеет общую структуру [AM]-[Линкер1]-[Линкер2]-[ASO], где якорный фрагмент [AM] выбран из холестерина, пальмитата и токоферола, первый линкер [Линкер1] выбран из линкера C6, линкера C8, линкера ТЭГ и линкера HEG, а второй линкер [Линкер2] представляет собой гидрофильный линкер, выбранный из ТЭГ и HEG.

[0350] В некоторых аспектах линкерная комбинация имеет общую структуру [AM]-[Линкер1]-[Линкер2]-[Линкер3]-[ASO], где якорный фрагмент [AM] представляет собой липид (например, фосфолипид), первый линкер [Линкер1] выбран из группы, состоящей из HEG, ТЭГ, ТЭГ-HEG и C6 или отсутствует, второй линкер [Линкер2] выбран из группы, состоящей из дисульфида, имина, тиокетала, три/динуклеотида и Val-Cit, а третий линкер

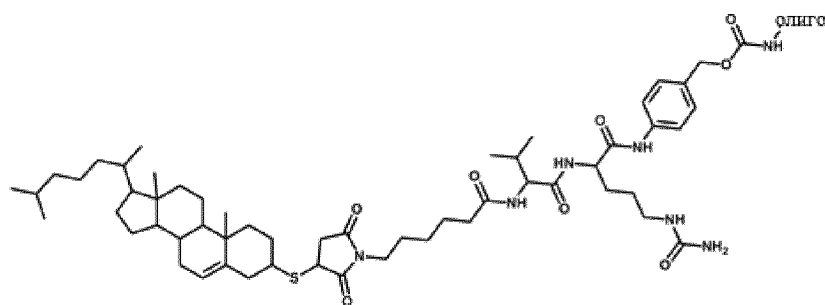
[Линкер3] выбран из группы, состоящей из HEG, ТЭГ, ТЭГ-HEG и C6 или отсутствует.

[0351] Конкретные линкерные комбинации по настоящему изобретению приведены в качестве примера ниже

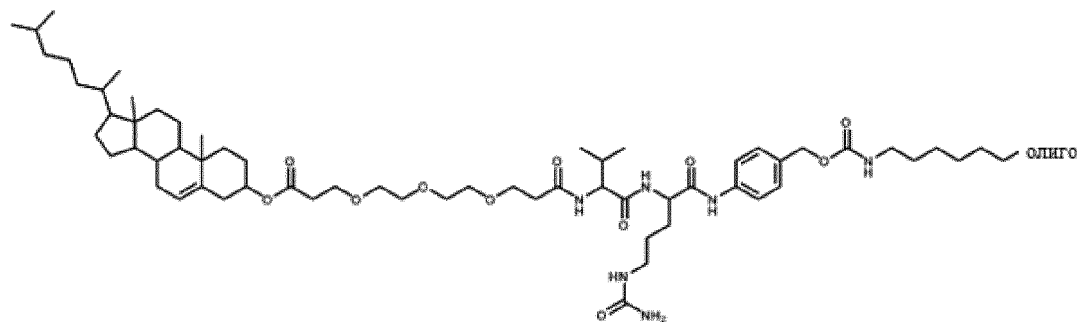
[Холестерин]-[ТЭГ]-[HEG]-[BAM]



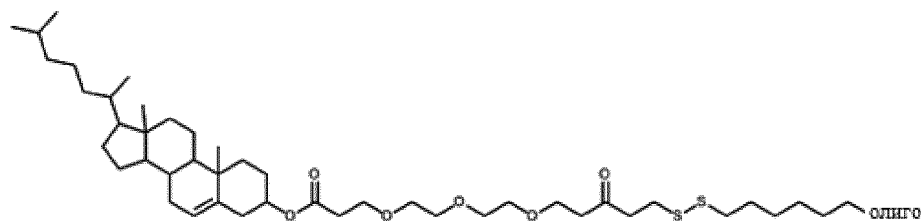
[Холестерин]-[SMal]-[Val-Cit]-[pAB]-[BAM]



[Холестерин]-[ТЭГ]-[Val-Cit]-[C6]-[BAM]



[Холестерин]-[ТЭГ]-[SS]-[C6]-[BAM]

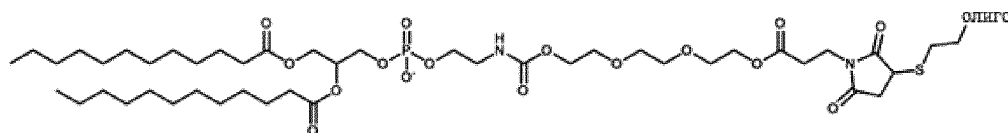


где [Холестерин] представляет собой холеsterиновый якорный фрагмент, [ТЭГ] представляет собой нерасщепляемый линкер ТЭГ, [HEG] представляет собой

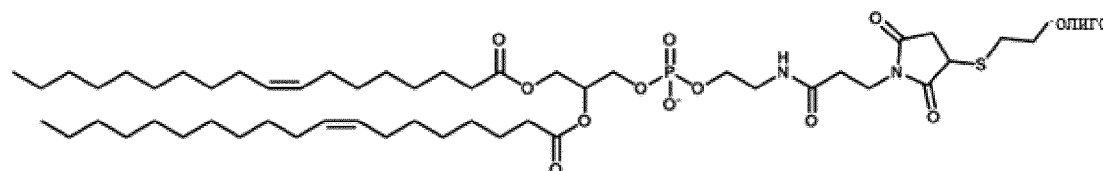
нерасщепляемый линкер HEG, [SS] представляет собой дисульфидный редокс-расщепляемый линкер, [C6] представляет собой алкильный нерасщепляемый линкер, [SMal] представляет собой S-малеимид, [Val-Cit] представляет собой расщепляемый линкер валин-цитруллин, [pAB] представляет собой саморасщепляющийся линкер pAB. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению имеет структуру в соответствии с иллюстративными структурами, представленными выше, в которых один или более компонентов были замещены компонентом в том же классе, что и представленные в примере. Например, якорный фрагмент [холестерин] может быть замещен другим якорным фрагментом, описанным в настоящем документе, [ТЭГ] может быть замещен другим полимерным нерасщепляемым линкером, описанным в настоящем документе (например, HEG, ПЭГ, PG), [Val-Cit] может быть замещен другим расщепляемым пептидазой линкером, или [pAB] может быть замещен другим саморасщепляющимся линкером.

[0352] Дополнительные конкретные линкерные комбинации по настоящему изобретению приведены в качестве примера ниже:

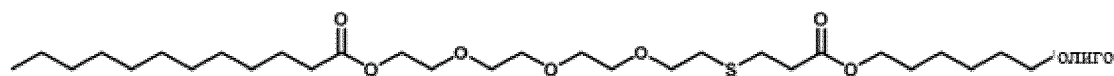
[Насыщенный фосфолипид; этаноламин; DLPE]-[ТЭГ]-[BAM]



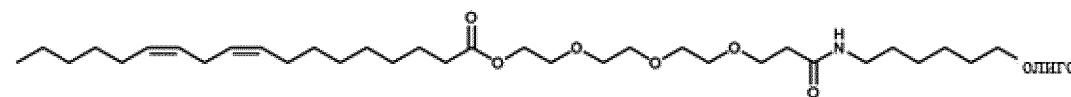
[Ненасыщенный фосфолипид; этаноламин; DOPE]-[BAM]



[Насыщенная жирная кислота; лаурат]-[ТЭГ]-[C6]-[BAM]



[Ненасыщенная жирная кислота; линолеат]-[ТЭГ]-[C6]-[BAM]



[Стеарат]-[ТЭГ]-[HEG]-[BAM]



II.C. Биологически активная молекула

[0353] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанная в настоящем документе, способна доставлять полезную нагрузку (биологически активную молекулу,

присоединенную к ВВ, *например*, экзосоме, посредством якорного 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 присоединены к ВВ (*например*, экзосоме) посредством малеимидного фрагмента, включают в себя агенты, такие как нуклеотиды (*например*, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (*например*, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как микроРНК, дцДНК, днкРНК или миРНК), 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 некоторых аспектах полезная нагрузка находится в просвете ВВ (*например*, экзосомы). 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, присоединенную, *например*, к внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы) посредством якорного фрагмента.

[0354] В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка, ВАР) не встречается в природе в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах полезная нагрузка (ВАР) не встречается в природе. В некоторых аспектах ВВ, содержащие ВАР, не встречаются в природе.

[0355] В некоторых аспектах полезная нагрузка нацелена на опухолевый антиген. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают в себя: альфа-фетопроtein (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, лиганд 1 белка программируемой гибели (PD-L1), лиганд 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, ФНО-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд или их комбинацию.

[0356] В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах малая молекула представляет собой химерное соединение, нацеленное на протеолиз (PROTAC).

[0357] 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

[0358] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению содержит один или несколько агонистов STING, ковалентно связанных с ВВ (*например*, экзосомой) посредством якорного фрагмента. В некоторых аспектах агонист STING содержит циклический нуклеотидный агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING.

[0359] 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 любые их аналоги, как известно, стимулируют или усиливают иммунный или воспалительный ответ у пациента. CDN могут иметь связи 2'2', 2'3', 2'5', 3'3' или 3'5', связывающие циклические динуклеотиды, или любую их комбинацию.

[0360] Циклические пуриновые динуклеотиды можно модифицировать стандартными методиками органической химии для получения аналогов пуриновых динуклеотидов. Подходящие пуриновые динуклеотиды включают в себя, помимо прочего, аденин, гуанин, инозин, гипоксантин, ксантин, изогуанин или любой другой подходящий пуриновый динуклеотид, известный в данной области техники. Циклические динуклеотиды могут быть модифицированными аналогами. Можно использовать любую подходящую модификацию, известную в данной области техники, включая, помимо прочего, модификации фосфоротиоата, бифосфоротиоата, фторината и дифторината.

[0361] Также можно использовать нециклические динуклеотидные агонисты, такие как 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA), или любой другой нециклический динуклеотидный агонист, известный в данной области техники.

[0362] 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 в данной области техники.

[0363] В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой ADC. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой 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 или РАТ505), антагонист рецептора лизофосфатидной кислоты (*например*, ВМС-986020), антагонист STING (*например*, СL656) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой фузогенный пептид.

[0364] В некоторых аспектах биологически активная молекула содержит антисмысловой олигонуклеотид (ASO). В некоторых аспектах ASO нацелен на различные гены (транскрипты), экспрессируемые *in vivo*. В некоторых аспектах биологически активная молекула по настоящему изобретению содержит морфолиновые остовные структуры, описанные в патенте США № 5034506, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах биологически активная молекула по настоящему изобретению содержит фосфордиамидатные морфолиновые олигомеры (РМО), в которых фрагмент дезоксирибозы заменен морфолиновым кольцом, а заряженная фосфодиэфирная межузьединичная связь заменена незаряженной фосфородиамидатной связью, как описано у Summerton, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997, 7:63-70. Таким образом, в некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, фосфордиамидатный морфолиновый олигомер (РМО) или конъюгированный с пептидами фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО).

[0365] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена на макрофаги. В других аспектах биологически активная молекула 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.

[0366] 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 в себя сложный регуляторный путь в ответ на множество различных сигналов из окружающей среды. Разнообразие фенотипов макрофагов еще предстоит полностью охарактеризовать *in vivo*.

[0367] 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).

[0368] В некоторых аспектах биологически активная молекула 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, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0369] В некоторых аспектах биологически активная молекула 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, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0370] В некоторых аспектах биологически активная молекула 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, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0371] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена на белок или транскрипт AHR1 (антагонист AHR1). В других аспектах антагонист AHR1

представляет собой малую молекулу.

[0372] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена на miR146a (антагомир miR146a). В некоторых аспектах антагомир miR146a представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO связывается с miR146a-5p (ugagaасигааииссаuggguu) (SEQ ID NO:54). В некоторых аспектах ASO связывается с miR146a-3p (ссисигаааиисагиусиисаg) (SEQ ID NO:55).

[0373] В некоторых аспектах биологически активная молекула имитирует miR155 (миметик miR155). В некоторых аспектах миметик miR155 представляет собой РНК или ДНК. В некоторых аспектах миметик miR155 содержит нуклеотидную последовательность miR155-5p (ииааугсиааисгугаиagggu) (SEQ ID NO:56). В некоторых аспектах миметик miR155 содержит нуклеотидную последовательность miR155-3p (сиссиасаииаиасииаааса) (SEQ ID NO:57).

[0374] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена на белок или транскрипт IRF-4 (антагонист IRF-4). В некоторых аспектах антагонист IRF4 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0375] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена на белок или транскрипт PPAR γ (антагонист PPAR γ). В некоторых аспектах антагонист PPAR γ представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В других аспектах антагонист PPAR γ представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах ASO нацелен на транскрипт, например, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0376] В некоторых аспектах биологически активная молекула нацелена 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, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0377] В некоторых аспектах биологически активная молекула представляет собой агонист 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0378] В некоторых аспектах биологически активная молекула 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, мРНК, 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

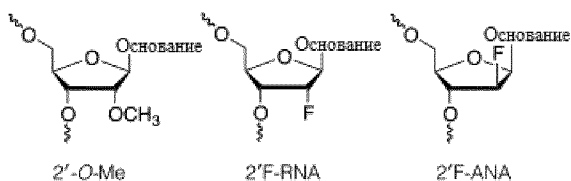
[0379] В некоторых аспектах ASO представляет собой гэтамер, миксмер или тоталмер. ASO по изобретению может содержать один или более нуклеозидов, которые содержат фрагмент модифицированного сахара, *т.е.* модификация фрагмента сахара по сравнению с фрагментом сахара рибозы в ДНК и РНК. Были получены многочисленные нуклеозиды с модификацией сахарного фрагмента рибозы, прежде всего с целью улучшения определенных свойств олигонуклеотидов, таких как аффинность и/или устойчивость к нуклеазам.

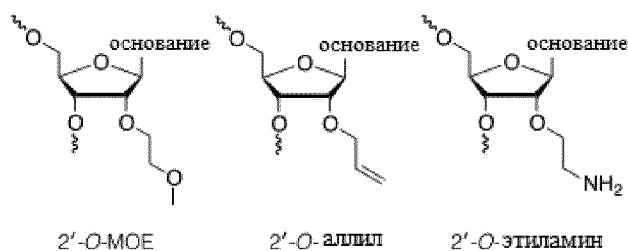
[0380] Такие модификации включают в себя те, в которых модифицируется структура кольца рибозы, *например*, путем замены на гексозное кольцо (HNA) или бициклическое кольцо, которое обычно имеет бирадикальный мостик между атомами углерода C2' и C4' на рибозном кольце (LNA), или несвязанное кольцо рибозы, в котором обычно отсутствует связь между атомами углерода C2' и C3' (*например*, UNA). Другие

нуклеозиды, модифицированные сахаром, включают в себя, например, нуклеиновые кислоты бициклогексозы (WO2011/017521) или трициклические нуклеиновые кислоты (WO2013/154798). Модифицированные нуклеозиды также включают в себя нуклеозиды, в которых сахарный фрагмент заменен несакхарным фрагментом, например, в случае пептидных нуклеиновых кислот (PNA) или морфолинонуклеиновых кислот.

[0381] Модификации сахара также включают в себя 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 в себя 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.

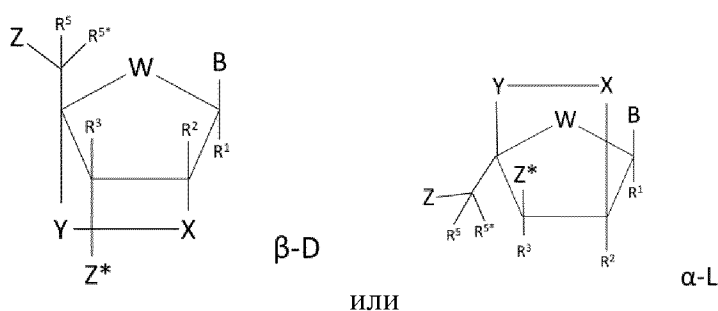
[0382] Нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром представляет собой нуклеозид, который имеет заместитель, отличный от Н или –ОН, в положении 2' (2'-замещенный нуклеозид) или содержит 2'-связанный бирадикал, и включает в себя 2'-замещенные нуклеозиды и LNA (2'-4'-бисрадикальные мостиковые) нуклеозиды. Например, 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'-фтор-ДНК, арабинуклеиновые кислоты (ANA) и 2'-фтор-ANA-нуклеозид. Дополнительные примеры см., например, в 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'-замещенных модифицированных нуклеозидов.





[0383] Нуклеозиды LNA представляют собой модифицированные нуклеозиды, которые содержат линкерную группу (называемую бирадикалом или мостиком) между C2' и C4' сахарного кольца рибозы нуклеозида (*т. е.*, 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.

[0384] 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. В некоторых аспектах модифицированный нуклеозид или нуклеозиды LNA ASO по настоящему изобретению имеют общую структуру формулы I или II:



Формула I

Формула 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;

R^1 , R^2 , R^3 , R^5 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 настоящем документе.

II.C.1. ASO, нацеленный на NLRP3

[0385] NLRP3 (*NLRP3*) также известен как пириновый домен семейства NLR, содержащий 3. Если не указано иное, термин «NLRP3» в контексте настоящего документа может относиться к NLRP3 одного или нескольких видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей). Синонимы NLRP3/NLRP3 известны и включают в себя *NLRP3*; *C1orf7*; *CIAS1*; *NALP3*; *PYPAF1*; нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, богатый лейцином повтор и пириновый домен, содержащий 3; холододовый 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; холододовый 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.

[0386] Последовательность транскрипта пре-мРНК *NLRP3* человека (SEQ ID NO: 1) соответствует обратной комплементарной последовательности остатков 247416156–247449108 хромосомы 1q44. Последовательность мРНК *NLRP3* (номер доступа в GenBank NM_001079821.2) указана в SEQ ID NO: 3, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 3 показан как «u» в мРНК. Последовательность белка NLRP3 человека можно найти под общедоступными номерами: Q96P20, (каноническая последовательность, SEQ ID NO: 2), Q96P20-2 (SEQ ID NO: 4), Q96P20-3 (SEQ ID NO: 5), Q96P20-4 (SEQ ID NO: 6), Q96P20-5 (SEQ ID NO: 7) и Q96P20-6 (SEQ ID NO: 8), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0387] Известны природные варианты генного продукта *NLRP3* человека. Например, природные варианты белка NLRP3 человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: D21H, I174T, V200M, R262L, 4262P, R262W, L266H, D305G, D305N, L307P, Q308K, F311S, T350M, A354V, L355P, E356D, H360R, T407P, T438I,

T438N, A441T, A441V, R490K, F525C, F525L, G571R, Y572C, F575S, E629G, L634F, M664T, Q705K, Y861C и R920Q и любой их комбинации. Дополнительные варианты белка NLRP3 человека, возникающие в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники. Изоформа 1 NLRP3 (идентификатор: Q96P20-2 в UniProt) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим образом: делеция остатков 721–777 и 836–892 по сравнению с SEQ ID NO: 3. Последовательность изоформы 3 NLRP3 (идентификатор: Q96P20-3) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим образом: делеция остатков 720–1036 по сравнению с SEQ ID NO: 3. Последовательность изоформы 4 NLRP3 (идентификатор: Q96P20-4) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим образом: делеция остатков 721–777 по сравнению с SEQ ID NO: 3. Последовательность изоформы 5 NLRP3 (идентификатор: Q96P20-5) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим образом: делеция остатков 836–892 по сравнению с SEQ ID NO: 3. Последовательность изоформы 6 NLRP3 (идентификатор: Q96P20-6) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим образом: делеция остатков 776–796 по сравнению с SEQ ID NO: 3. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка NLRP3.

[0388] Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты ASO является пре-мРНК *NLRP3*. SEQ ID NO: 1 представляет геномную последовательность *NLRP3* человека (*т. е.* обратную комплементарную последовательность нуклеотидов 247416156–247449108 хромосомы 1q44). SEQ ID NO: 1 идентична последовательности пре-мРНК *NLRP3*, за исключением того, что нуклеотид «т» в SEQ ID NO: 1 показан как «и» в пре-мРНК. В определенных аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон кодирующих белок NLRP3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзонов кодирующих белок NLRP3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок NLRP3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность

белка NLRP3 человека, кодируемая пре-мРНК *NLRP3*, показана как SEQ ID NO: 3. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок NLRP3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0389] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *NLRP3*, *например*, SEQ ID NO: 1. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *NLRP3*, *например*, SEQ ID NO: 1. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *NLRP3*, *например*, SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *NLRP3* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 1, где ASO имеет дизайн формулы: 5' A-B-C 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0390] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка NLRP3 (*например*, изоформу 1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка NLRP3. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 и изоформу 2, изоформу 3 и изоформу 4 и изоформу 5 и изоформу 6) белка NLRP3.

[0391] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 101–200 (*т. е.*, последовательностей на ФИГ. 1A), *например*, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, *например*, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1A).

[0392] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–200 или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно

содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *NLRP3*.

[0393] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 200.

[0394] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 102. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 104. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 105. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 106. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 108. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную

[illegible]

[illegible]

в SEQ ID NO: 182. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 183. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 184. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 185. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 186. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 187. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 188. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 189. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 190. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 191. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 192. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 193. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 194. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 195. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 197. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 198. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 199. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 200.

[0395] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 101–200. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–200 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–200 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *NLRP3*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или

содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–200, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *NLRP3*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–200 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *NLRP3*.

[0396] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *NLRP3*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *NLRP3*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *NLRP3*.

II.C.2. ASO, нацеленный на STAT6

[0397] STAT6 (*STAT6*) также известен как передатчик сигнала и активатор транскрипции 6. Синонимы STAT6/*STAT6* известны и включают в себя 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. Если не указано иное, термин «STAT6» в контексте настоящего документа может относиться к STAT6 одного или нескольких видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0398] Последовательность транскрипта пре-мРНК *STAT6* человека (SEQ ID NO: 11) соответствует обратной комплементарной последовательности остатков 57111413-57095404, комплемент, хромосомы 12q13.3. Последовательность мРНК *STAT6* (номер доступа в GenBank NM_001178078.1) указана в SEQ ID NO: 13, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 13 показан как «u» в мРНК. Последовательность белка STAT6 человека можно найти под общедоступными номерами: P42226-1, (каноническая последовательность, SEQ ID NO: 12), P42226-2 (SEQ ID NO: 14) и P42226-3 (SEQ ID NO: 15), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0399] Известны природные варианты генного продукта *STAT6* человека. Например, природные варианты белка STAT6 человека могут содержать одну или более

аминокислотных замен, выбранных из: M118R, D419N и любой их комбинации. Дополнительные варианты белка STAT6 человека, возникающие в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники. Изоформа 2 STAT6 (идентификатор: P42226-2 в UniProt) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 13) следующим образом: делеция остатков 1–174 и замена ¹⁷⁵PSE₁₇₇ на ¹⁷⁵MEQ₁₇₇ по сравнению с SEQ ID NO: 13. Последовательность изоформы 3 STAT6 (идентификатор: P42226-3) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 13) следующим образом: делеция остатков 1–110 по сравнению с SEQ ID NO: 13. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка STAT6.

[0400] Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты ASO является пре-мРНК *STAT6*. SEQ ID NO: 11 представляет геномную последовательность *STAT6* человека (*т. е.* обратную комплементарную последовательность нуклеотидов 57111413-57095404, комплемент, хромосомы 12q13.3). SEQ ID NO: 11 идентична последовательности пре-мРНК *STAT6*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 11 показан как «u» в пре-мРНК. В определенных аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон кодирующих белок STAT6 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзона кодирующих белок STAT6 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок STAT6 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность белка STAT6 человека, кодируемая пре-мРНК *STAT6*, показана как SEQ ID NO: 13. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок STAT6 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0401] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 11. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзона транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 11. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется

с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *STAT6* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 11, где ASO имеет дизайн формулы: 5' А-В-С 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0402] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка *STAT6* (*например*, изоформу 1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка *STAT6*. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 и изоформу 2, изоформу 1 и изоформу 3 или изоформу 2 и изоформу 3) белка *STAT6*.

[0403] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 601–703 (*т. е.*, последовательностей на ФИГ. 1В), *например*, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, *например*, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1В).

[0404] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–703 или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *STAT6*.

[0405] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 601 (*например*, ASO-*STAT6*-1053). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 602 (*например*, ASO-*STAT6*-1359). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 603 (*например*, ASO-*STAT6*-1890). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 604 (*например*, ASO-*STAT6*-1892). В некоторых аспектах ASO

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[0406] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на

по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 601–703. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–703 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–703 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *STAT6*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–703, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *STAT6*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–703 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *STAT6*.

[0407] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *STAT6*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *STAT6*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *STAT6*.

II.C.3. ASO, нацеленный на CEBP/β

[0408] Если не указано иное, термин «CEBP/β» в контексте настоящего документа может относиться к CEBP/β одного или нескольких видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0409] CEBP/β (*CEBP/β*) также известен как ССАТ/энхансер-связывающий белок бета. Синонимы CEBP/β/*CEBP/β* известны и включают в себя С/EBP бета; белок-активатор

печени; LAP; обогащенный в печени ингибиторный белок; LIP; ядерный фактор NF-IL6; фактор транскрипции 5; TCF-5; *CEBPB*; *CEBPb*; *CEBPβ*; *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.

[0410] Последовательность транскрипта пре-мРНК *CEBP/β* человека (SEQ ID NO: 21) соответствует обратной комплементарной последовательности остатков 50190583-50192690 хромосомы 20q13.13. Последовательность мРНК *CEBP/β* (номер доступа в GenBank NM_001285878.1) указана в SEQ ID NO: 23, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 23 показан как «u» в мРНК. Последовательность белка *CEBP/β* человека можно найти под общедоступными номерами: P17676, (каноническая последовательность, SEQ ID NO: 22), P17676-2 (SEQ ID NO: 24) и P17676-3 (SEQ ID NO: 25), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0411] Известны природные варианты генного продукта *CEBP/β* человека. Например, природные варианты белка *CEBP/β* человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: A241P, A253G, G195S и любой их комбинации. Дополнительные варианты белка *CEBP/β* человека, возникающие в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники. Изоформа 2 *CEBP/β* (идентификатор: P17676-2 в UniProt) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 23) следующим образом: делеция остатков 1–23 по сравнению с SEQ ID NO: 23. Последовательность изоформы 3 *CEBP/β* (идентификатор: P17676-3) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 23) следующим образом: делеция остатков 1–198 по сравнению с SEQ ID NO: 23. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка.

[0412] Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты ASO является пре-мРНК *CEBP/β*. SEQ ID NO: 21 представляет геномную последовательность *CEBP/β* человека (*m. e.* обратную комплементарную последовательность нуклеотидов 50190583-50192690 хромосомы 20q13.13). SEQ ID NO: 21 идентична последовательности пре-мРНК *CEBP/β*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 21 показан как «u» в пре-мРНК. В определенных аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон кодирующих белок *CEBP/β* нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзонов кодирующих белок *CEBP/β* нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из

них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок CEBP/β нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность белка CEBP/β человека, кодируемая пре-мРНК *CEBP/β*, показана как SEQ ID NO: 23. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок CEBP/β нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0413] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *CEBP/β*, *например*, SEQ ID NO: 21. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *CEBP/β*, *например*, SEQ ID NO: 21. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *CEBP/β*, *например*, SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *CEBP/β* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 21, где ASO имеет дизайн формулы: 5' A-B-C 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0414] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка CEBP/β (*например*, изоформу 1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка CEBP/β. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 и изоформу 2, изоформу 1 и изоформу 3 или изоформу 2 и изоформу 3) белка CEBP/β.

[0415] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 704–806 (*т. е.*, последовательностей на ФИГ. 1С), например, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, например, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых

аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1С).

[0416] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–806 или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *CEBP/β*.

[0417] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 704 (*например*, ASO-CEBPb-540). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 705 (*например*, ASO-CEBPb-565). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 706 (*например*, ASO-CEBPb-569). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 707 (*например*, ASO-CEBPb-648). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 708 (*например*, ASO-CEBPb-816). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 709 (*например*, ASO-CEBPb-817). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 710 (*например*, ASO-CEBPb-818). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 711 (*например*, ASO-CEBPb-819). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 712 (*например*, ASO-CEBPb-820). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 713 (*например*, ASO-CEBPb-851). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 714 (*например*, ASO-CEBPb-853). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 715 (*например*, ASO-CEBPb-856). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 716 (*например*, ASO-CEBPb-858). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 717 (*например*, ASO-CEBPb-987). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 718 (*например*, ASO-CEBPb-1056). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 719 (*например*, ASO-CEBPb-1064). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 720 (*например*, ASO-CEBPb-1065). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 721 (*например*, ASO-CEBPb-1066). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

приведенную в SEQ ID NO: 797 (например, ASO-CEBPb-647). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 798 (например, ASO-CEBPb-851). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 799 (например, ASO-CEBPb-1266). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 800 (например, ASO-CEBPb-1268). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 801 (например, ASO-CEBPb-1270). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 802 (например, ASO-CEBPb-646). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 803 (например, ASO-CEBPb-1060). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 804 (например, ASO-CEBPb-1263). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 805 (например, ASO-CEBPb-1269). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 806 (например, ASO-CEBPb-1271).

[0418] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 704–806. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–806 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–806 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *CEBPb*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–806, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *CEBPb*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–806 или области из по меньшей мере

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *CEBPb*.

[0419] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *CEBPb*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *CEBPb*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *CEBPb*.

II.C.4. ASO, нацеленный на STAT3

[0420] 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). Было обнаружено, что высокие уровни активированного STAT3 коррелируют с плохим прогнозом у пациентов-людей с раком молочной железы с точки зрения метастатического прогрессирования (Ranger et al. 2009). Таким образом, STAT3 представляет собой перспективную цель для предотвращения и лечения ER-положительного и ER-отрицательного рака молочной железы, а также других видов рака, таких как рак поджелудочной железы, рак головы/шеи, рак предстательной железы и рак легкого. Однако текущие стратегии ингибирования активности STAT3 посредством блокирования пептидов, блокады транслокации, нарушения димеризации или модулирования активности фосфатазы недостаточно ингибировали активность STAT3 в раковых клетках. В нормальных условиях активация STAT3 является временной и строго регулируемой. При клеточной стимуляции лигандами, такими как факторы роста или цитокины, STAT3 становится фосфорилированным на критическом тирозиновом остатке (Tyr705) и, следовательно, индуцирует димеризацию STAT3 посредством двух взаимодействий фосфотирозин (pTyr)-Src-гомология 2 (SH2). Димеры STAT3 затем транслоцируются в ядро и связываются со специфическими элементами ответа ДНК в промоторах целевых генов, тем самым активируя транскрипцию. Связь aberrантной активации STAT3 со многими видами злокачественных новообразований и солидных опухолей человека сделало STAT3 привлекательной молекулярной мишенью для разработки новых противораковых терапевтических средств.

[0421] Было обнаружено, что STAT3 часто является конститутивно активированным в опухолевых клетках и способствует прогрессированию опухоли путем модуляции

целевых генов, таких как антиапоптозные гены Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, и выживания наряду с генами, управляющими развитием клеточного цикла c-Myc и cyclin-D1. Аберрантная активация STAT3 часто наблюдается почти при всех злокачественных новообразованиях крови и солидных опухолях, включая лимфому и лейкоз, рак молочной железы, предстательной железы, легкого, головы и шеи, головного мозга и толстой кишки, что сделало STAT3 привлекательной мишенью для разработки противораковых средств. Специфичность активации STAT обусловлена специфическими цитокинами, т. е. каждый STAT реагирует на небольшое количество специфических цитокинов. Было также обнаружено, что другие отличные от цитокинов сигнальные молекулы, такие как факторы роста, активируют STAT. Связывание этих факторов с рецептором клеточной поверхности, связанным с протеинтирозинкиназой, также приводит к фосфорилированию STAT. В частности, было обнаружено, что STAT3 реагирует на интерлейкин-6 (IL-6), а также на эпидермальный фактор роста (EGF) (Darnell, Jr., J. E., et al., Science, 1994, 264, 1415-1421). Существуют данные, свидетельствующие о том, что STAT3 может регулироваться с помощью пути MAPK. ERK2 индуцирует фосфорилирование серина, а также связывается со STAT3 (Jain, N., et al., Oncogene, 1998, 17, 3157-3167). STAT3 экспрессируется в большинстве типов клеток, а также участвует в индуцировании экспрессии генов, участвующих в ответе на повреждение ткани и воспаление. Аберрантная экспрессия или конститутивная экспрессия STAT3 связана с рядом патологических процессов. Было обнаружено, что STAT3 является конститутивно активным в опухолевых клетках миеломы, как в культивируемых клетках, так и в моноклеарных клетках костного мозга, полученных от пациентов с множественной миеломой. Эти клетки являются устойчивыми к Fas-опосредованному апоптозу и экспрессируют высокие уровни Bcl-xL. Домен SH2 STAT3 необходим для стимулирования димеризации. Одним из ограничений нацеливания на димеризацию белка является целесообразность нацеливания на поверхность димера, что является проблематичным вследствие планарности большой площади поверхности.

[0422] Передатчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3) известен в данной области техники под различными названиями. Эти названия включают в себя: ДНК-связывающий белок APRF и фактор острофазного ответа. мПНК, кодирующую STAT3 человека, можно найти под номером доступа GenBank NM_003150.3, и она представлена последовательностью (SEQ ID NO: 43).

[0423] Известны природные варианты генного продукта *STAT3* человека. Например, природные варианты белка STAT3 человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: R382L, R382Q ИЛИ R382W и любой их комбинации. Дополнительные варианты белка STAT3 человека, возникающие в результате

альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники, например: R382W, F384L, F384S, T389I, N395Y, R423Q, N425Y, H437Y, Del-463, S611N, F621V, T622I, V637L, V637M, Del-644, Y657C, P330S, K392R, N646K, K658N, Del-701 или T716M. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка STAT3.

[0424] SEQ ID NO: 41 идентична последовательности пре-мРНК *STAT3*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 41 показан как «u» в пре-мРНК. В определенных аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзона кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность белка STAT3 человека, кодируемая пре-мРНК *STAT3*, показана как SEQ ID NO: 42. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0425] В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность белка STAT3 человека, кодируемая пре-мРНК *STAT3*, показана как SEQ ID NO: 43. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок STAT3 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0426] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в

пределах интронов транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *STAT3* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43, где ASO имеет дизайн формулы: 5' A-B-C 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0427] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка *STAT3* (*например*, изоформу 1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка *STAT3*. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 (UniProt ID: P40763-1) и изоформу 2 (UniProt ID: P40763-2), изоформу 2 и изоформу 3 (UniProt ID: P40763-3)) белка *STAT3*.

[0428] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *STAT3*, *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *STAT3* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43, где ASO имеет дизайн формулы: 5' A-B-C 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0429] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизируется со множеством целевых областей в пределах транскрипта *STAT3* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 41). В некоторых аспектах ASO гибридизируется с двумя различными целевыми областями в пределах транскрипта *STAT3*. В некоторых аспектах ASO гибридизируется с тремя различными целевыми областями в пределах транскрипта *STAT3*. Последовательности примерных ASO, которые гибридизируются со множеством целевых областей, а также сайты начала/конца различных целевых областей представлены на ФИГ. 1D. В некоторых аспектах ASO, которые гибридизируются со множеством областей в пределах транскрипта *STAT3* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 41), являются более эффективными (*например*, обладают более низкой EC50) при снижении экспрессии *STAT3* по сравнению с ASO,

которые гибридизируются с одной областью в пределах транскрипта *STAT3* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 41).

[0430] ASO по изобретению содержат последовательность последовательных нуклеотидов, которая соответствует комплементарной последовательности области транскрипта *STAT3*, *например*, нуклеотидную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 41.

[0431] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 889–988 (*т. е.*, последовательностей на ФИГ. 1D), *например*, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, *например*, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1D).

[0432] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–988 *STAT3* или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *STAT3*. Неограничивающие примеры ASO, нацеленных на ген *STAT3*, показаны на ФИГ. 1D.

[0433] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 889 (*например*, ASO-*STAT3*-2559). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 890 (*например*, ASO-*STAT3*-2556). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 891 (*например*, ASO-*STAT3*-2557). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 892 (*например*, ASO-*STAT3*-1046). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 893 (*например*, ASO-*STAT3*-351). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 894 (*например*, ASO-*STAT3*-450). В некоторых аспектах ASO содержит

[illegible]

[illegible]

[illegible]

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 970 (например, ASO-STAT3-1475). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 971 (например, ASO-STAT3-894). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 972 (например, ASO-STAT3-519). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 973 (например, ASO-STAT3-2553). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 974 (например, ASO-STAT3-2552). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 975 (например, ASO-STAT3-883). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 976 (например, ASO-STAT3-842). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 977 (например, ASO-STAT3-851). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 978 (например, ASO-STAT3-2265). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 979 (например, ASO-STAT3-520). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 980 (например, ASO-STAT3-985). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 981 (например, ASO-STAT3-524). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 982 (например, ASO-STAT3-1106). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 983 (например, ASO-STAT3-517). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 984 (например, ASO-STAT3-1721). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 985 (например, ASO-STAT3-1113). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 986 (например, ASO-STAT3-992). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 987 (например, ASO-STAT3-993). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 988 (например, ASO-STAT3-1104).

[0434] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 889–988. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:

889–988 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–988 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *STAT3*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–988, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *CEBP β* . В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–988 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *STAT3*.

[0435] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *STAT3*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *STAT3*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *STAT3*.

II.C.5. ASO, нацеленный на NRAS

[0436] *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). В частности, комбинация методик цейтраферной микроскопии и фотообесцвечивания показала, что в отсутствие пальмитоилирования меченный ЗФБ N-Ras претерпевает быстрый обмен между цитозолем и мембранами ER/Гольджи, а также что ЗФБ-N-Ras дикого типа возвращается в комплекс Гольджи посредством неvesicularного механизма. 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 заболевание, подобное острому миелоидному лейкозу (ОМЛ) или хроническому миеломоноцитарному лейкозу (ХММЛ).

[0437] Вирусный онкоген нейробластомы (*NRas*) известен в данной области техники под различными названиями. Такие названия включают в себя: NRas ГТФазы, белок N-ras часть 4, гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS (v-ras), гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS, трансформирующий белок N-Ras и гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS v-ras.

[0438] Ген NRAS обеспечивает инструкции для создания белка, называемого N-Ras, который участвует в основном в регуляции клеточного деления. Последовательность мРНК, кодирующую NRAS человека, можно найти под номером эталонной последовательности в NCBI NM_002524.5, и она представлена кодирующей последовательностью (SEQ ID NO: 53).

[0439] Известны природные варианты генного продукта *NRas* человека. Например, природные варианты белка NRas человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: G12D, G13D, T50I, G60E и любой их комбинации. Дополнительные варианты белка NRas человека, возникающие в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники, например: G13R, Q61K, Q61R и P34L. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка STAT3.

[0440] SEQ ID NO: 51 идентична последовательности пре-мРНК *NRas*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 51 показан как «u» в пре-мРНК. В определенных аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон кодирующих белок NRas нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзона кодирующих белок NRas нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок NRas нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Последовательность белка NRas человека, кодируемая пре-мРНК *NRas*, показана как SEQ ID NO: 52. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок NRas нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR

или и ту, и другую.

[0441] В определенных аспектах ASO по изобретению также способны снижать (*например*, уменьшать или удалять) экспрессию мРНК или белка *NRas*. В связи с этим ASO по изобретению может влиять на не прямое ингибирование белка *NRas* путем снижения уровней мРНК *NRas*, как правило, в клетке млекопитающего, такой как клетка человека, например, опухолевая клетка. В частности, настоящее изобретение направлено на ASO, которые нацелены на одну или более областей пре-мРНК *NRas* (*например*, области интронов, области экзонов и/или области соединения экзон-интрон). Если не указано иное, термин «*NRas*» в контексте настоящего документа может относиться к *NRas* одного или нескольких видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0442] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *NRAS*, *например*, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 53. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *NRAS*, *например*, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 53. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *NRAS*, *например*, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 53. В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *NRAS* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 53, где ASO имеет дизайн формулы: 5' A-B-C 3', как описано в другом месте настоящего документа.

[0443] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизируется со множеством целевых областей в пределах транскрипта *NRas* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 51). В некоторых аспектах ASO гибридизируется с двумя различными целевыми областями в пределах транскрипта *NRas*. В некоторых аспектах ASO гибридизируется с тремя различными целевыми областями в пределах транскрипта *NRas*. Последовательности примерных ASO, которые гибридизируются со множеством целевых областей, а также сайты начала/конца различных целевых областей представлены на ФИГ. 1Е. В некоторых аспектах ASO, которые гибридизируются со множеством областей в пределах транскрипта *NRas* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 51), являются более эффективными (*например*, обладают более низкой EC50) при снижении экспрессии *NRas* по сравнению с ASO, которые гибридизируются с одной областью в пределах транскрипта *NRas* (*например*, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 51).

[0444] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную

изоформу белка NRAS (*например*, изоформу 1, NCBI ID: NP_001229821.1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка NRas. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 и изоформу 2 (NCBI ID:NP_009089.4), изоформу 2 и изоформу 3 (NCBI ID: NP_001123995) и изоформу 3 и изоформу 4 (NCBI ID: NP_001229820.1)) белка NRas.

[0445] ASO по изобретению содержат последовательность последовательных нуклеотидов, которая соответствует комплементарной последовательности области транскрипта *NRas*, *например*, нуклеотидную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 51.

[0446] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 989–1088 (*т. е.*, последовательностей на ФИГ. 1E), *например*, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, *например*, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1E).

[0447] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–1088 NRas или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *NRas*. Неограничивающие примеры ASO, нацеленных на ген NRAS, можно найти на ФИГ. 1E.

[0448] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 989 (*например*, ASO-NRas-180). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 990 (*например*, ASO-NRas-181). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 991 (*например*, ASO-NRas-434). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 992 (*например*, ASO-NRas-617). В некоторых аспектах ASO

[illegible]

[illegible]

[illegible]

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1068 (например, ASO-NRas-1621). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1069 (например, ASO-NRas-1622). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1070 (например, ASO-NRas-1623). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1071 (например, ASO-NRas-1956). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1072 (например, ASO-NRas-1957). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1073 (например, ASO-NRas-1958). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1074 (например, ASO-NRas-1959). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1075 (например, ASO-NRas-1962). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1076 (например, ASO-NRas-1965). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1077 (например, ASO-NRas-2113). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1078 (например, ASO-NRas-2114). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1079 (например, ASO-NRas-2122). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1080 (например, ASO-NRas-2417). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1081 (например, ASO-NRas-2419). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1082 (например, ASO-NRas-2759). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1083 (например, ASO-NRas-2760). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1084 (например, ASO-NRas-2761). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1085 (например, ASO-NRas-2886). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1086 (например, ASO-NRas-3557). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1087 (например, ASO-NRas-4027). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1088 (например, ASO-NRas-4082).

[0449] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 989–1088. В

некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–1088 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–1088 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *NRas*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–1088, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *NRas*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–1088 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *NRas*.

[0450] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *NRas*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *NRas*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *NRas*.

II.C.6. ASO, нацеленный на KRAS

[0451] KRAS известен в данной области техники под различными названиями. Такие названия включают в себя: протоонкоген KRAS, ГТФаза; гомолог вирусного онкогена саркомы 2 крыс Кирстен V-Ki-Ras2; KRas ГТФазы; 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.

[0452] 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 обратной комплементарной последовательности остатков

25204789–25250936 NC_000012 (SEQ ID NO: 35). Геномная последовательность *KRAS G12D*, указанная в SEQ ID NO: 31, отличается от SEQ ID NO: 35 тем, что содержит замену гуанина на аденин в нуклеотидном положении 5587. Пример последовательности мПНК *KRAS G12D* указан в SEQ ID NO: 33, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 33 показан как «u» в мПНК. мПНК *KRAS G12D*, указанная в SEQ ID NO: 33, отличается от последовательности мПНК дикого типа (*например*, номер доступа GenBank NM_004985.5; SEQ ID NO: 37) тем, что содержит замену гуанина на аденин в нуклеотидном положении 225. Последовательность белка *KRAS* человека можно найти под общедоступными номерами: P01116 (каноническая последовательность), A8K8Z5, B0LPF9, P01118 и Q96D10, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0453] Существует две изоформы белка *KRAS* человека (P01116), возникающие в результате альтернативного сплайсинга. Изоформа 2A (номер доступа: P01116-1; SEQ ID NO: 38) представляет собой каноническую последовательность. Она также известна как K-Ras4A. Изоформа 2B (номер доступа: P01116-2; также известная как K-Ras4B; SEQ ID NO: 36) отличается от канонической последовательности следующим образом: (i) 151–153: RVE → GVD; и (ii) 165–189: QYRLKKISKEEKTGCVKIKKCIIM (SEQ ID NO:599) → KHKKEKMSKDGKSKKKKKSKTKCVIM (SEQ ID NO:600). В некоторых аспектах ASO, описанные в настоящем документе, могут снижать или ингибировать экспрессию изоформы 2A, изоформы 2B белка *KRAS* или и той, и другой.

[0454] Известны природные варианты генного продукта *KRAS* человека. Например, природные варианты белка *KRAS* человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: K5E, K5N, G10GG, G10V, G12A, G12C, G12F, G12I, G12L, G12R, G12S, G12V, G13C, G13D, G13E, G13R, G13V, V14I, L19F, T20M, Q22E, Q22H, Q22K, Q22R, Q25H, N26Y, F28L, E31K, D33E, P34L, P34Q, P34R, I36M, R41K, D57N, T58I, A59T, G60D, G60R, G60S, G60V, Q61A, Q61H, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, E63K, S65N, R68S, Y71H, T74A, L79I, R97I, Q99E, M111L, K117N, K117R, D119G, S122F, T144P, A146P, A146T, A146V, K147E, K147T, R149K, L159S, I163S, R164Q, I183N, I84M или любой их комбинации. Природные варианты, которые являются специфичными для изоформы 2B белка *KRAS*, содержат одну или более аминокислотных замен, выбранных из: V152G, D153V, F156I, F156L или их комбинаций. ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии одного или более вариантов белка *KRAS* (*например*, любых вариантов, известных в данной области техники). В некоторых аспектах мутант *KRAS* имеет аминокислотную замену G12D. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению нацелены на один или более мутантов *KRAS*. В

других аспектах мутант KRAS, на который нацелены ASO, представляет собой KRAS G12D (SEQ ID NO: 32). Примеры последовательностей для мРНК *KRAS G12D* и белка KRAS G12D указаны в SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 32.

[0455] В некоторых аспектах целевая последовательность нуклеиновой кислоты ASO, описанного в настоящем документе, содержит одну или более областей пре-мРНК *KRAS*. Например, SEQ ID NO: 31 (описана выше) идентична последовательности пре-мРНК *KRAS*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 31 показан как «u» в пре-мРНК. В контексте настоящего документа термин «целевая последовательность нуклеиновой кислоты» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной ASO, описанному в настоящем документе. В определенных аспектах целевая последовательность нуклеиновой кислоты содержит область экзона кодирующих белок KRAS нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах целевая последовательность нуклеиновой кислоты содержит интрон кодирующих белок KRAS нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В дополнительных аспектах целевая последовательность нуклеиновой кислоты содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок KRAS нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, *например*, при использовании для исследовательских или диагностических целей целевая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область кодирующих белок KRAS нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0456] Соответственно, в некоторых аспектах ASO, описанный в настоящем документе, гибридизируется с областью экзона транскрипта *KRAS*, *например*, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизируется с областью интронов транскрипта *KRAS*, *например*, SEQ ID NO: 31. В некоторых аспектах ASO гибридизируется с соединением экзон-интрон транскрипта *KRAS*, *например*, SEQ ID NO: 31. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизируется с областью в пределах транскрипта *KRAS* (*например*, интрона, экзона или соединения экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 31, где ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа.

[0457] В некоторых аспектах целевая нуклеиновая последовательность ASO, описанных в настоящем документе, представляет собой мРНК *KRAS*, *например*, SEQ ID NO: 33. Соответственно, в определенных аспектах ASO, описанный в настоящем документе, может гибридизироваться с одной или более областями мРНК *KRAS*. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению нацелены на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка *KRAS*. В определенных аспектах ASO, описанные в настоящем документе, могут быть нацелены на все изоформы белка *KRAS*, включая любые их варианты (*например*, описанные в настоящем документе). В некоторых аспектах белок *KRAS*, на который могут быть нацелены ASO по настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену G12D. Неограничивающие примеры ASO, нацеленных на транскрипт *KRAS*, показаны на ФИГ. 1F.

[0458] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–820. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 807 (*например*, ASO-KRAS-0004). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 808 (*например*, ASO-KRAS-0005). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 809 (*например*, ASO-KRAS-0006). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 810 (*например*, ASO-KRAS-0007). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 811 (*например*, ASO-KRAS-0008). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 812 (*например*, ASO-KRAS-0009). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 813 (*например*, ASO-KRAS-0010). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 814 (*например*, ASO-KRAS-0011). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 815 (*например*, ASO-KRAS-0012). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 816 (*например*, ASO-KRAS-0013). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 817 (*например*, ASO-KRAS-0014). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 818 (*например*, ASO-KRAS-0015). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 819 (*например*, ASO-KRAS-0016). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 820 (*например*, ASO-KRAS-0017). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 821–835. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 821 (*например*, ASO-KRAS-0018). В

[illegible]

[illegible]

некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 869 (*например*, ASO-KRAS-0066). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 870 (*например*, ASO-KRAS-0067). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 871 (*например*, ASO-KRAS-0068). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 872 (*например*, ASO-KRAS-0069). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 873 (*например*, ASO-KRAS-0070). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 874 (*например*, ASO-KRAS-0071). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 875 (*например*, ASO-KRAS-0072). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 876 (*например*, ASO-KRAS-0073). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 877 (*например*, ASO-KRAS-0074). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 878 (*например*, ASO-KRAS-0075). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 879 (*например*, ASO-KRAS-0076). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 880 (*например*, ASO-KRAS-0077). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 881 (*например*, ASO-KRAS-0078). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 882 (*например*, ASO-KRAS-0079). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 883 (*например*, ASO-KRAS-0080). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 884 (*например*, ASO-KRAS-0081). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 885 (*например*, ASO-KRAS-0082). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 886 (*например*, ASO-KRAS-0083). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 887 (*например*, ASO-KRAS-0084). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 888 (*например*, ASO-KRAS-0085).

[0459] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 807–888. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или

содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–888 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–888 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *KRAS*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–888, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *KRAS*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–888 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *KRAS*.

[0460] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *KRAS*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *KRAS*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *KRAS*.

II.C.7 ASO, нацеленный на Pmp22

[0461] Периферический миелиновый белок 22 (PMP22), также известный как специфичный белок блокировки роста 3 (GAS-3), кодируется геном PMP22. PMP22 представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 22 кДа, состоящий из 160 аминокислот, который экспрессируется главным образом в клетках Шванна периферической нервной системы. Клетки Шванна демонстрируют высокую экспрессию PMP22, причем он может составлять 2–5% от общего содержания белка в компактном миелине. Компактный миелин составляет основную часть миелиновой оболочки периферического нейрона, которая представляет собой защитный жировой слой, обеспечивающий электрическую изоляцию для аксона нейрона. Уровень экспрессии PMP22 является относительно низким в центральной нервной системе взрослых людей.

[0462] У людей ген PMP22 расположен на хромосоме 17p11.2 и занимает приблизительно 40 т. о. Ген содержит шесть экзонов, сохраняющихся как у людей, так и у

грызунов, два из которых представляют собой 5' нетранслируемые экзоны (1a и 1b) и приводят к двум различным транскриптам РНК с идентичными кодирующими последовательностями. Два транскрипта отличаются своими 5' нетранслируемыми областями и имеют свой собственный промотор, регулирующий экспрессию. Остальные экзоны (2–5) включают в себя кодирующую область гена *PMP22* и соединены вместе после посттранскрипционной модификации (т. е. альтернативного сплайсинга). Белок PMP22 характеризуется четырьмя трансмембранными доменами, двумя внеклеточными петлями (ECL1 и ECL2) и одной внутриклеточной петлей. Было предложено, что ECL1 опосредует гомофильное взаимодействие между двумя белками PMP22, тогда как было показано, что ECL2 опосредует гетерофильное взаимодействие между белком PMP22 и нулевым миелиновым белком (MPZ или MP0).

[0463] PMP22 играет важную роль в образовании и поддержании компактного миелина. Когда клетки Шванна вступают в контакт с аксоном нейрона, экспрессия PMP22 значительно повышается, тогда как PMP22 подавляется при дегенерации или перерезании аксонов. PMP22 продемонстрировал связь с замыкающим контактом 1 и окклюдинами — белками, которые участвуют в адгезии с другими клетками и внеклеточным матриксом, а также поддерживают функционирование миелина. Наряду с функцией клеточной адгезии PMP22 также активируется при пролиферации клеток Шванна, что свидетельствует о его роли в регуляции клеточного цикла. PMP22 обнаруживается в тканях, отличных от нервных, где его экспрессия, как было показано, служит в качестве функции специфического белка блокировки роста 3 (*gas-3*).

[0464] Неправильная дозировка гена PMP22 может вызвать аберрантный синтез белка и функционирование миелиновой оболочки. Поскольку компоненты миелина расположены стехиометрически, любая нерегулярная экспрессия компонентов может привести к дестабилизации миелина и невропатическим расстройствам. Изменения экспрессии гена PMP22 связаны с различными невропатиями, такими как болезнь Шарко–Мари–Тута 1А типа (ШМТ1А), синдром Дежерина–Сотта и наследственная невропатия со склонностью к параличам от сдавления (ННПС). Слишком большое количество PMP22 (например, вызванное дубликацией генов) приводит к развитию ШМТ1А. Дубликация гена PMP22 является наиболее распространенной генетической причиной ШМТ, где избыточная выработка PMP22 вызывает дефекты во множестве сигнальных путей и дисфункцию транскрипционных факторов, таких как KNOX20, SOX10 и EGR2.

[0465] Последовательность гена *PMP22* человека можно найти под общедоступным номером доступа NCBI RefSeq NM_000304. Альтернативные транскрипты мРНК RefSeq имеют номера доступа NM_001281455, NM-001281456, NM-153321 и NM_153322,

соответственно. Ген *PMP22* человека находится в хромосоме 17p12 в положении 15229777-15265326.

[0466] Последовательность транскрипта пре-мРНК *PMP22* человека (SEQ ID NO: 264) соответствует обратной комплементарной последовательности остатков 15229777-15265326 хромосомного положения 17p12. Последовательность мРНК *PMP22* (номер доступа GenBank NM_000304.4) указана в SEQ ID NO: 58. Последовательность белка *PMP22* человека можно найти под общедоступным номером доступа Uniprot Q01453 (каноническая последовательность, SEQ ID NO: 60). Потенциальные изоформы *PMP22* имеют номера доступа Uniprot A8MU75, J3KQW0, A0A2R8Y5L5, J3KT36 и J3QS08, соответственно. Общедоступное содержание записей в базе данных, соответствующее номерам доступа, описанным в настоящем документе, включено посредством ссылки во всей своей полноте.

[0467] Известны природные варианты генного продукта *PMP22* человека. Например, природные варианты белка *PMP22* человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из L16P, S22F, □25-26, D37V, V65F, S72L, S79C, G93R, L105R, G107V, T118N, L147R, H12Q, L16P, L19P, M69K, L71P, S72L, S72P, S72W, S76I, S79P, L80P, L80R, □84, G100E, G100R, L105R, C109R, S149R, G150C, G150D, R157W, S22F, V30M, A67T, S23T, W28R, A67P, □115-118 и любой их комбинации.

[0468] ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка *PMP22*.

[0469] Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты ASO является пре-мРНК *PMP22*. SEQ ID NO: 58 представляет геномную последовательность *PMP22* человека (*т. е.* обратную комплементарную последовательность нуклеотидов 15229777-15265326, комплемент, хромосомы 17p12). SEQ ID NO: 58 идентична последовательности пре-мРНК *PMP22*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 58 показан как «u» в пре-мРНК.

[0470] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность последовательных нуклеотидов, имеющую длину от 10 до 30 нуклеотидов, которая является комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–1828 транскрипта *PMP22*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 264 (полноразмерный транскрипт мРНК *PMP22*), или нуклеотидов 208–690 транскрипта *PMP22*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 59 (кодирующая последовательность *PMP22*).

[0471] В некоторых аспектах последовательность последовательных нуклеотидов является на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере

около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *PMP22*. В некоторых аспектах ASO способен снижать экспрессию белка *PMP22* в клетке человека (например, клетке Шванна), причем клетка человека экспрессирует белок *PMP22*.

[0472] В некоторых аспектах экспрессия белка *PMP22* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению с экспрессией белка *PMP22* в клетке человека, не подверженной воздействию ASO.

[0473] В некоторых аспектах ASO способен снижать уровень мРНК *PMP22* в клетке человека (например, иммунной клетке), причем клетка человека экспрессирует мРНК *PMP22*. В некоторых аспектах уровень мРНК *PMP22* снижен на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению с уровнем мРНК *PMP22* в клетке человека, которая не подвергается воздействию ASO.

[0474] В определенных аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит интрон кодирующих белок *PMP22* нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзонов кодирующих белок *PMP22* нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит соединение экзон-интрон кодирующих белок *PMP22* нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов и полученные из него нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании для исследовательских или диагностических целей целевая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученные из упомянутых выше нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. Кодирующая последовательность *PMP22* человека (CDS) показана как SEQ ID NO:59, а последовательность белка, кодируемая кодирующей последовательностью в пре-мРНК *PMP22*, показана как SEQ ID NO: 60. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота

содержит нетранслируемую область кодирующих белок PMP22 нуклеиновых кислот или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и ту, и другую.

[0475] В некоторых аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах интронов транскрипта *PMP22*, *например*, SEQ ID NO: 58. В определенных аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах экзонов транскрипта *PMP22*, *например*, SEQ ID NO: 58. В других аспектах ASO по изобретению гибридизируется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *PMP22*, *например*, SEQ ID NO: 58.

[0476] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность последовательных нуклеотидов (*например*, длиной от 10 до 30 нуклеотидов, *например*, длиной 20 нуклеотидов), комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *PMP22*, *например*, области, соответствующей SEQ ID NO: 264. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность последовательных нуклеотидов, которая гибридизируется с последовательностью нуклеиновой кислоты, или областью в пределах последовательности, транскрипта *PMP22* (целевая область), причем последовательность последовательных нуклеотидов комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) 5'-нетранслируемой области (UTR); (ii) кодирующей области или (iii) 3' UTR транскрипта *PMP22*. В некоторых аспектах последовательность последовательных нуклеотидов комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей (i) нуклеотиды 1–173 из SEQ ID NO: 58 (экзон 1); (ii) нуклеотиды 174–285 из SEQ ID NO: 58 (экзон 2); (iii) нуклеотиды 286–385 из SEQ ID NO: 58 (экзон 3); (iv) нуклеотиды 386–526 из SEQ ID NO: 58 (экзон 4); (v) 527–1828 из SEQ ID NO: 58 (экзон 5); (vi) 200–300 из SEQ ID NO: 58, (vii) нуклеотиды 200–400 из SEQ ID NO: 58; (viii) нуклеотиды 500–600 из SEQ ID NO: 58; (ix) нуклеотиды 600–700 из SEQ ID NO: 58; (x) нуклеотиды 600–800 из SEQ ID NO: 58; (xi) 1200–1300 из SEQ ID NO: 58; (xii) 400–600 из SEQ ID NO: 58; (xiii) нуклеотиды 800–1000 из SEQ ID NO: 58; (xiv) нуклеотиды 1000–1200 из SEQ ID NO: 58; (xv) нуклеотиды 1200–1400 из SEQ ID NO: 58; (xvi) нуклеотиды 1400–1600 из SEQ ID NO: 58 или (xvii) 1600–1800 из SEQ ID NO: 58.

[0477] В некоторых аспектах последовательность последовательных нуклеотидов комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотиды 152–168 (SEQ ID NO: 62), 225–244 (SEQ ID NO: 63), 227–246 (SEQ ID NO: 64), 235–254 (SEQ ID NO: 65), 265–284 (SEQ ID NO: 66), 271–290 (SEQ ID NO: 67), 380–399 (SEQ ID NO: 68), 383–402 (SEQ ID NO: 69), 385–404 (SEQ ID NO: 70), 418–437 (SEQ ID NO: 71), 479–498 (SEQ ID NO: 72), 583–602 (SEQ ID NO: 73), 671–690 (SEQ ID NO: 74), 672–691 (SEQ ID NO: 75), 673–692 (SEQ ID NO: 76), 674–693 (SEQ ID NO: 77), 675–691 (SEQ ID NO: 78), 676–691 (SEQ ID

NO:79), 678–693 (SEQ ID NO:80), 939–958 (SEQ ID NO:81), 940–959 (SEQ ID NO:82), 1127–1146 (SEQ ID NO:83), 1130–1149 (SEQ ID NO:84), 1293–1312 (SEQ ID NO:85), 1316–1335 (SEQ ID NO:86), 1317–1336 (SEQ ID NO:87), 1319–1338 (SEQ ID NO:88), 1365–1384 (SEQ ID NO:89), 1404–1423 (SEQ ID NO:90), 1604–1623 (SEQ ID NO:91), 1605–1624 (SEQ ID NO:92), 1611–1630 (SEQ ID NO:93), 1612–1631 (SEQ ID NO:94) или 1679–1688 (SEQ ID NO:263) из SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах последовательность последовательных нуклеотидов содержит последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотиды 152–168 (SEQ ID NO:62), 235–254 (SEQ ID NO:65), 385–404 (SEQ ID NO:70), 479–498 (SEQ ID NO:72), 672–691 (SEQ ID NO:75), 675–691 (SEQ ID NO:78), 939–958 (SEQ ID NO:81), 1130–1149 (SEQ ID NO:84), 1293–1312 (SEQ ID NO:85), 1365–1384 (SEQ ID NO:89), 1404–1423 (SEQ ID NO:90) или 1605–1624 (SEQ ID NO:92) из SEQ ID NO: 58.

[0478] В некоторых аспектах целевая область соответствует 16-мерной нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 208–223, 209–224, 210–225, 211–226, 212–227, 213–228, 214–229, 215–230, 216–231, 217–232, 218–233, 219–234, 220–235, 221–236, 222–237, 223–238, 224–239, 225–240, 226–241, 227–242, 228–243, 229–244, 230–245, 231–246, 232–247, 233–248, 234–249, 235–250, 236–251, 237–252, 238–253, 239–254, 240–255, 241–256, 242–257, 243–258, 244–259, 245–260, 246–261, 247–262, 248–263, 249–264, 250–265, 251–266, 252–267, 253–268, 254–269, 255–270, 256–271, 257–272, 258–273, 259–274, 260–275, 261–276, 262–277, 263–278, 264–279, 265–280, 266–281, 267–282, 268–283, 269–284, 270–285, 271–286, 272–287, 273–288, 274–289, 275–290, 276–291, 277–292, 278–293, 279–294, 280–295, 281–296, 282–297, 283–298, 284–299, 285–300, 286–301, 287–302, 288–303, 289–304, 290–305, 291–306, 292–307, 293–308, 294–309, 295–310, 296–311, 297–312, 298–313, 299–314, 300–315, 301–316, 302–317, 303–318, 304–319, 305–320, 306–321, 307–322, 308–323, 309–324, 310–325, 311–326, 312–327, 313–328, 314–329, 315–330, 316–331, 317–332, 318–333, 319–334, 320–335, 321–336, 322–337, 323–338, 324–339, 325–340, 326–341, 327–342, 328–343, 329–344, 330–345, 331–346, 332–347, 333–348, 334–349, 335–350, 336–351, 337–352, 338–353, 339–354, 340–355, 341–356, 342–357, 343–358, 344–359, 345–360, 346–361, 347–362, 348–363, 349–364, 350–365, 351–366, 352–367, 353–368, 354–369, 355–370, 356–371, 357–372, 358–373, 359–374, 360–375, 361–376, 362–377, 363–378, 364–379, 365–380, 366–381, 367–382, 368–383, 369–384, 370–385, 371–386, 372–387, 373–388, 374–389, 375–390, 376–391, 377–392, 378–393, 379–394, 380–395, 381–396, 382–397, 383–398, 384–399, 385–400, 386–401, 387–402, 388–403, 389–404, 390–405, 391–406, 392–407, 393–408, 394–409, 395–410, 396–411, 397–412, 398–413, 399–414, 400–415, 401–416, 402–417, 403–418, 404–419, 405–420, 406–421, 407–422, 408–423, 409–424,

410–425, 411–426, 412–427, 413–428, 414–429, 415–430, 416–431, 417–432, 418–433, 419–434, 420–435, 421–436, 422–437, 423–438, 424–439, 425–440, 426–441, 427–442, 428–443, 429–444, 430–445, 431–446, 432–447, 433–448, 434–449, 435–450, 436–451, 437–452, 438–453, 439–454, 440–455, 441–456, 442–457, 443–458, 444–459, 445–460, 446–461, 447–462, 448–463, 449–464, 450–465, 451–466, 452–467, 453–468, 454–469, 455–470, 456–471, 457–472, 458–473, 459–474, 460–475, 461–476, 462–477, 463–478, 464–479, 465–480, 466–481, 467–482, 468–483, 469–484, 470–485, 471–486, 472–487, 473–488, 474–489, 475–490, 476–491, 477–492, 478–493, 479–494, 480–495, 481–496, 482–497, 483–498, 484–499, 485–500, 486–501, 487–502, 488–503, 489–504, 490–505, 491–506, 492–507, 493–508, 494–509, 495–510, 496–511, 497–512, 498–513, 499–514, 500–515, 501–516, 502–517, 503–518, 504–519, 505–520, 506–521, 507–522, 508–523, 509–524, 510–525, 511–526, 512–527, 513–528, 514–529, 515–530, 516–531, 517–532, 518–533, 519–534, 520–535, 521–536, 522–537, 523–538, 524–539, 525–540, 526–541, 527–542, 528–543, 529–544, 530–545, 531–546, 532–547, 533–548, 534–549, 535–550, 536–551, 537–552, 538–553, 539–554, 540–555, 541–556, 542–557, 543–558, 544–559, 545–560, 546–561, 547–562, 548–563, 549–564, 550–565, 551–566, 552–567, 553–568, 554–569, 555–570, 556–571, 557–572, 558–573, 559–574, 560–575, 561–576, 562–577, 563–578, 564–579, 565–580, 566–581, 567–582, 568–583, 569–584, 570–585, 571–586, 572–587, 573–588, 574–589, 575–590, 576–591, 577–592, 578–593, 579–594, 580–595, 581–596, 582–597, 583–598, 584–599, 585–600, 586–601, 587–602, 588–603, 589–604, 590–605, 591–606, 592–607, 593–608, 594–609, 595–610, 596–611, 597–612, 598–613, 599–614, 600–615, 601–616, 602–617, 603–618, 604–619, 605–620, 606–621, 607–622, 608–623, 609–624, 610–625, 611–626, 612–627, 613–628, 614–629, 615–630, 616–631, 617–632, 618–633, 619–634, 620–635, 621–636, 622–637, 623–638, 624–639, 625–640, 626–641, 627–642, 628–643, 629–644, 630–645, 631–646, 632–647, 633–648, 634–649, 635–650, 636–651, 637–652, 638–653, 639–654, 640–655, 641–656, 642–657, 643–658, 644–659, 645–660, 646–661, 647–662, 648–663, 649–664, 650–665, 651–666, 652–667, 653–668, 654–669, 655–670, 656–671, 657–672, 658–673, 659–674, 660–675, 661–676, 662–677, 663–678, 664–679, 665–680, 666–681, 667–682, 668–683, 669–684, 670–685, 671–686, 672–687, 673–688, 674–689, 675–690 в SEQ ID NO: 58.

[0479] В некоторых аспектах целевая область соответствует 16-мерному нуклеотиду между положениями 208 и 690 в SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах целевая область соответствует 17-мерному нуклеотиду между положениями 208 и 690 в SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах целевая область соответствует 18-мерной нуклеотидной последовательности между положениями 208 и 690 в SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах целевая область соответствует 19-мерной нуклеотидной последовательности между

положениями 208 и 690 в SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах целевая область соответствует 20-мерной нуклеотидной последовательности между положениями 208 и 690 в SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах целевая область соответствует 16-мерной, 17-мерной, 18-мерной, 19-мерной или 20-мерной целевой области, описанной выше, ± 10 , ± 20 , ± 30 , ± 40 , ± 50 , ± 60 , ± 70 , ± 80 или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце.

[0480] В некоторых аспектах ASO не представляет собой ATCTTCAATCAACAGC (SEQ ID NO: 61).

[0481] В некоторых аспектах ASO представляет собой ATCTTCAATCAACAGC (SEQ ID NO: 61).

[0482] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизируется со множеством целевых областей в пределах транскрипта *PMP22* (например, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 58). В некоторых аспектах ASO гибридизируется с двумя различными целевыми областями в пределах транскрипта *PMP22*. В некоторых аспектах ASO гибридизируется с тремя различными целевыми областями в пределах транскрипта *PMP22*. В некоторых аспектах ASO, которые гибридизируются со множеством областей в пределах транскрипта *PMP22* (например, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 58), являются более эффективными (например, обладают более низкой EC₅₀) при снижении экспрессии *PMP22* по сравнению с ASO, которые гибридизируются с одной областью в пределах транскрипта *PMP22* (например, геномной последовательностью, SEQ ID NO: 58).

[0483] В некоторых аспектах ASO способен снижать (например, уменьшать или удалять) экспрессию мРНК или белка *PMP22* как у людей, так и у грызунов (например, мышей или крыс). В некоторых аспектах любой ASO, описанный в настоящем документе, является частью конъюгата, содержащего ASO, ковалентно связанный с по меньшей мере одним нуклеотидом или неполинуклеотидом.

[0484] ASO по изобретению содержат последовательность последовательных нуклеотидов, которая соответствует комплементарной последовательности области транскрипта *PMP22*, например, нуклеотидную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 58.

[0485] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по изобретению или последовательность последовательных нуклеотидов на по меньшей мере около 80% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 62–95 или 201–270 (т. е., антисмысловых последовательностей на ФИГ. 28 и 29), например, на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере

мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентична последовательности, по меньшей мере около 97% идентична последовательности, по меньшей мере около 98% идентична последовательности, по меньшей мере около 99% идентична последовательности, например, на около 100% идентична последовательности (гомологична). В некоторых аспектах ASO имеет дизайн, описанный в другом месте настоящего документа, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа (*m. e.*, антисмысловые последовательности на ФИГ. 28 и 29).

[0486] В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 или 201–270 PMP22 или области из по меньшей мере 10 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом PMP22. Неограничивающие примеры ASO, нацеленных на ген PMP22, показаны на ФИГ. 28 и 29.

[0487] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 77. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в

[illegible]

[illegible]

в SEQ ID NO: 260. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 261. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 262. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 263. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 264. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 265. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 266. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 267. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 268. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 269. В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 270.

[0488] В некоторых аспектах ASO содержит или состоит из последовательности, на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62–95 и 201–270. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *PMP22*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270 за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, причем замещенный ASO может связываться с транскриптом *PMP22*. В некоторых аспектах ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270 или области из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 их последовательных нуклеотидов, причем ASO (или его часть последовательных нуклеотидов) может необязательно содержать один, два, три или четыре

дополнительных 5' и/или 3' нуклеотида, комплементарных соответствующему транскрипту *PMP22*.

[0489] В некоторых аспектах связывание ASO, нацеленного на транскрипт *PMP22*, описанный в настоящем документе, с транскриптом мРНК, кодирующим *PMP22*, может снижать уровни экспрессии и/или уровни активности *PMP22*.

II.D. ВВ, например, экзосомы

[0490] ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению могут иметь диаметр от около 20 до около 300 нм. В определенных аспектах ВВ (*например*, экзосома) по настоящему изобретению имеет диаметр около 20–290 нм, 20–280 нм, 20–270 нм, 20–260 нм, 20–250 нм, 20–240 нм, 20–230 нм, 20–220 нм, 20–210 нм, 20–200 нм, 20–190 нм, 20–180 нм, 20–170 нм, 20–160 нм, 20–150 нм, 20–140 нм, 20–130 нм, 20–120 нм, 20–110 нм, 20–100 нм, 20–90 нм, 20–80 нм, 20–70 нм, 20–60 нм, 20–50 нм, 20–40 нм, 20–30 нм, 30–300 нм, 30–290 нм, 30–280 нм, 30–270 нм, 30–260 нм, 30–250 нм, 30–240 нм, 30–230 нм, 30–220 нм, 30–210 нм, 30–200 нм, 30–190 нм, 30–180 нм, 30–170 нм, 30–160 нм, 30–150 нм, 30–140 нм, 30–130 нм, 30–120 нм, 30–110 нм, 30–100 нм, 30–90 нм, 30–80 нм, 30–70 нм, 30–60 нм, 30–50 нм, 30–40 нм, 40–300 нм, 40–290 нм, 40–280 нм, 40–270 нм, 40–260 нм, 40–250 нм, 40–240 нм, 40–230 нм, 40–220 нм, 40–210 нм, 40–200 нм, 40–190 нм, 40–180 нм, 40–170 нм, 40–160 нм, 40–150 нм, 40–140 нм, 40–130 нм, 40–120 нм, 40–110 нм, 40–100 нм, 40–90 нм, 40–80 нм, 40–70 нм, 40–60 нм, 40–50 нм, 50–300 нм, 50–290 нм, 50–280 нм, 50–270 нм, 50–260 нм, 50–250 нм, 50–240 нм, 50–230 нм, 50–220 нм, 50–210 нм, 50–200 нм, 50–190 нм, 50–180 нм, 50–170 нм, 50–160 нм, 50–150 нм, 50–140 нм, 50–130 нм, 50–120 нм, 50–110 нм, 50–100 нм, 50–90 нм, 50–80 нм, 50–70 нм, 50–60 нм, 60–300 нм, 60–290 нм, 60–280 нм, 60–270 нм, 60–260 нм, 60–250 нм, 60–240 нм, 60–230 нм, 60–220 нм, 60–210 нм, 60–200 нм, 60–190 нм, 60–180 нм, 60–170 нм, 60–160 нм, 60–150 нм, 60–140 нм, 60–130 нм, 60–120 нм, 60–110 нм, 60–100 нм, 60–90 нм, 60–80 нм, 60–70 нм, 70–300 нм, 70–290 нм, 70–280 нм, 70–270 нм, 70–260 нм, 70–250 нм, 70–240 нм, 70–230 нм, 70–220 нм, 70–210 нм, 70–200 нм, 70–190 нм, 70–180 нм, 70–170 нм, 70–160 нм, 70–150 нм, 70–140 нм, 70–130 нм, 70–120 нм, 70–110 нм, 70–100 нм, 70–90 нм, 70–80 нм, 80–300 нм, 80–290 нм, 80–280 нм, 80–270 нм, 80–260 нм, 80–250 нм, 80–240 нм, 80–230 нм, 80–220 нм, 80–210 нм, 80–200 нм, 80–190 нм, 80–180 нм, 80–170 нм, 80–160 нм, 80–150 нм, 80–140 нм, 80–130 нм, 80–120 нм, 80–110 нм, 80–100 нм, 80–90 нм, 90–300 нм, 90–290 нм, 90–280 нм, 90–270 нм, 90–260 нм, 90–250 нм, 90–240 нм, 90–230 нм, 90–220 нм, 90–210 нм, 90–200 нм, 90–190 нм, 90–180 нм, 90–170 нм, 90–160 нм, 90–150 нм, 90–140 нм, 90–130 нм, 90–120 нм, 90–110 нм, 90–100 нм, 100–300 нм, 110–290 нм, 120–280 нм, 130–270 нм, 140–260 нм, 150–250 нм, 160–240 нм, 170–230 нм, 180–220 нм или 190–

210 нм. Размер ВВ (*например*, экзосомы), описанной в настоящем документе, можно измерить в соответствии со способами, известными в данной области техники.

[0491] ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению содержат билипидную мембрану («мембрану экзосомы» или «мембрану ВВ»), содержащую внутреннюю поверхность (поверхность просвета) и внешнюю поверхность. Внутренняя поверхность обращена к внутреннему кору ВВ (*например*, экзосомы), т.е. к просвету ВВ.

[0492] Мембрана ВВ или экзосомы содержит липиды и жирные кислоты. Примеры липидов включают в себя фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стеринны, холестеринны и фосфатидилсеринны. Мембрана ВВ или 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.

[0493] В некоторых аспектах состав внешней мембраны составляет около 70–90% холинфосфолипидов, около 0–15% кислых фосфолипидов и около 5–30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутренней мембраны составляет около 15–40% холинфосфолипидов, около 10–50% кислых фосфолипидов и около 30–60% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах мембрана ВВ или 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.D.1. Каркасные фрагменты

[0494] В некоторых аспектах биологически активная молекула присоединена к поверхности или просвету ВВ (*например*, экзосомы) посредством малеимидного фрагмента. В некоторых аспектах биологически активная молекула присоединена к каркасному фрагменту (*например*, каркасу X) на внешней поверхности или на поверхности просвета ВВ (*например*, экзосомы) посредством малеимидного фрагмента.

[0495] В определенных аспектах один или несколько фрагментов вводят 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 (Paparpetrou *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).

[0496] 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.

[0497] 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, каркас X и/или каркас Y, дегликозилирован. В некоторых аспектах каркасный фрагмент, каркас X и/или каркас Y, сильно гликозилирован, например, больше, чем природный каркас X и/или каркас Y при том же условии.

II.D.1.a. Каркас X

[0498] 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 ВВ (например, экзосом) со сконструированной поверхностью, 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 настоящем документе. В других аспектах каркасные фрагменты не связаны с малеимидным фрагментом.

[0499] Каркасные фрагменты могут быть сконструированы синтетически или рекомбинантно, например, для экспрессии в виде слитого белка, например, слитого белка каркаса X с другим фрагментом. Например, слитый белок может содержать каркасный

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

[0500] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) со сконструированной поверхностью (*например*, каркасом X), описанные в настоящем документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ (*например*, экзосомами), известными в данной области техники. Например, ВВ со сконструированной поверхностью (*например*, каркасом X) содержат модифицированные белки, более высокообогащенные на их внешней поверхности или поверхности просвета ВВ (*например*, экзосомы), чем встречающиеся в природе ВВ (*например*, экзосомы) или ВВ (*например*, экзосомы), получаемые с использованием обычных белков ВВ (*например*, экзосом). Более того, ВВ (*например*, экзосомы) со сконструированной поверхностью (*например*, каркасом X) по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению со встречающимися в природе ВВ (*например*, экзосомами) или ВВ (*например*, экзосомами), полученными с использованием обычных белков ВВ (*например*, экзосом).

[0501] В некоторых аспектах каркас X содержит негативный 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) показана ниже.

Полипептид PTGFRN (SEQ ID NO: 301)

MGRLASRPLLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNVSDYDGPSEQNFDWS

FSSLGSSFVELASTWEVGFPALYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYK
CSTPSTDATVQGNVEDTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPPFELRCTAASASPLH
THLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTVGS DAYRLSVSR
ALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNVSV AEGKEL
DLTCNITTD RADDVRPEVTWSFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDAR
SYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGV TWLEPDYQV
YLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVM
DGDWTLKYGERSKQRAQDGDGFIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNY YCVVSAWTKQRN
NSWVKSKDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIKSPRYS
VLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEK VQEDEFYRM
YQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVI
RGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRD
WKSDLSLERSVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSP TGSWQKEAEIHSKPVFIT
VKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQETRERRRLMSMEM
D

[0502] Полипептид PTGFRN содержит сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 25 из SEQ ID NO: 301), внеклеточный домен (аминокислоты с 26 по 832 из SEQ ID NO: 301), трансмембранный домен (аминокислоты с 833 по 853 из SEQ ID NO: 301) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 854 по 879 из SEQ ID NO: 301). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 301 без сигнального пептида, т. е. аминокислот с 26 по 879 из SEQ ID NO: 301. В некоторых аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в контексте настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в контексте настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN и (i) по меньшей мере пять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140, по меньшей мере 150 аминокислот на N-конце трансмембранного домена, (ii) по меньшей мере пять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 аминокислот на C-конце трансмембранного домена или как (i), так и (ii).

[0503] В некоторых аспектах фрагменты полипептида PTGFRN лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0504] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность,

на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам 26–879 в SEQ ID NO: 301. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 302, фрагменту полипептида PTGFRN. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302, 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 каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302 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: 302.

[0505] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам 26–879 в SEQ ID NO: 301, аминокислотам 833–853 в SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302 или SEQ ID NO: 301. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность аминокислот 26–879 из SEQ ID NO: 301, аминокислот 833–853 из SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302 или SEQ ID NO: 301, 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 каркас X содержит аминокислотную последовательность аминокислот с 26 по 879 из SEQ ID NO: 301, аминокислот с 833 по 853

из SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302 или SEQ ID NO: 301, 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 с 26 по 879 из SEQ ID NO: 1, аминокислот с 833 по 853 из SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302 или SEQ ID NO: 301.

[0506] В некоторых аспектах каркас X содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NOS: 301 (белок PTGFRN), 302 (аминокислоты 687–878 полноразмерного PTGFRN), 303 (белок BSG), 304 (белок IGSF8), 305 (белок ITGB1), 306 (белок ITGA4), 307 (белок SLC3A2), или ее функционального фрагмента.

[0507] В других аспектах 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, причем каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 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, белок ATP2B1, белок ATP2B2, белок ATP2B3, белок ATP2B4 или белок IGSF2 лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0508] 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-переносчики АТФ: ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2 и ATP2B4), CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B.

[0509] В некоторых аспектах каркас X содержит базигин (белок BSG, SEQ ID NO: 303). 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 в базе данных Uniprot белка BSG человека: P35613. Сигнальный пептид белка BSG представляет собой аминокислоты с 1 по 21. Аминокислоты 138–323 представляют собой внеклеточный домен, аминокислоты с 324 по 344 представляют собой трансмембранный домен, а аминокислоты с 345 по 385 представляют собой цитоплазматический домен.

[0510] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам с 22 по 385 белка BSG человека. В некоторых аспектах фрагменты полипептида базигина лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV, *например*, аминокислот с 221 по 315 белка BSG человека.

[0511] В некоторых аспектах каркас X содержит представителя суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IgSF8 или белок IGSF8; SEQ ID NO: 304), 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 в базе данных Uniprot Q969P0. Белок IGSF8 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты 1–27 белка IGSF8 человека), внеклеточный домен (аминокислоты 28–579 белка IGSF8 человека), трансмембранный домен (аминокислоты 580–600 белка IGSF8 человека) и цитоплазматический домен (аминокислоты 601–613 белка IGSF8 человека).

[0512] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам с 28 по 613 белка IGSF8 человека. В некоторых аспектах белок IGSF8 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность белка IGSF8 человека, 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 каркас X содержит аминокислотную последовательность белка IGSF8 человека 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.

[0513] В некоторых аспектах каркас X по настоящему изобретению содержит представителя суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IgSF3 или белок IGSF3; SEQ ID NO: 309), который также известен как белок 3, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-3). Белок IGSF3 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты 1–19 белка IGSF3), внеклеточный домен (аминокислоты 20–1124 белка IGSF3), трансмембранный домен (аминокислоты 1125–1145 белка IGSF3) и цитоплазматический домен (аминокислоты 1146–1194 белка IGSF3).

[0514] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам с 28 по 613 белка IGSF3. В некоторых аспектах белок IGSF3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0515] В некоторых аспектах каркас X по настоящему изобретению содержит интегрин-бета-1 (белок ITGB1; SEQ ID NO: 305), также известный как бета-субъединица рецептора фибронектина, гликопротеин IIa (GPIIa), бета-субъединица VLA-4 или CD29. Белок ITGB1 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты 1–20 белка ITGB1 человека), внеклеточный домен (аминокислоты 21–728 белка ITGB1 человека), трансмембранный домен (аминокислоты 729–751 белка ITGB1 человека) и цитоплазматический домен (аминокислоты 752–798 белка ITGB1 человека).

[0516] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам с 21 по 798 белка ITGB1 человека. В некоторых аспектах белок ITGB1 лишен одного или нескольких

функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0517] В других аспектах каркас X содержит белок ITGA4 (SEQ ID NO: 306), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку ITGB1 человека без сигнального пептида (аминокислоты с 1 по 33 белка ITGB1 человека). В некоторых аспектах белок ITGA4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0518] В других аспектах каркас X содержит белок SLC3A2 (SEQ ID NO: 307), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку SLC3A2 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок SLC3A2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0519] В других аспектах каркас X содержит белок ATP1A1 (SEQ ID NO: 310), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку ATP1A1 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A1 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0520] В других аспектах каркас X содержит белок ATP1A2 (SEQ ID NO: 311), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку ATP1A2 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP1A2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0521] В других аспектах каркас X содержит белок ATP1A3 (SEQ ID NO: 312), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку АТР1А3 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0522] В других аспектах каркас X содержит белок АТР1А4 (SEQ ID NO: 313), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку АТР1А4 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0523] В других аспектах каркас X содержит белок АТР1В3 (SEQ ID NO: 314), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку АТР1А5 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А5 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0524] В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В1 (SEQ ID NO: 315), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку АТР2В1 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В1 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0525] В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В2 (SEQ ID NO: 316), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере

около 99% или около 100% идентична белку ATP2B2 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP2B2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0526] В других аспектах каркас X содержит белок ATP2B3 (SEQ ID NO: 317), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку ATP2B3 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP2B3 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0527] В других аспектах каркас X содержит белок ATP2B4 (SEQ ID NO: 318), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку ATP2B4 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок ATP2B4 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0528] В других аспектах каркас X содержит белок IGSF2 (SEQ ID NO: 308), который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична белку IGSF2 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок IGSF2 лишен одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0529] Неограничивающие примеры других каркасных белков X можно найти в патенте США № US10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который полностью включен посредством ссылки.

[0530] В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с C-конца

нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца и с C-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствует один или более функциональных или структурных доменов нативного белка.

[0531] В некоторых аспектах каркасные фрагменты, *например*, каркас X, *например*, белок PTGFRN связаны с одним или более 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.

[0532] В некоторых аспектах каркас X можно использовать для связывания любого фрагмента с поверхностью просвета и внешней 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 поверхности просвета в дополнение к внешней поверхности ВВ (*например*, экзосомы). Следовательно, в определенных аспектах каркас X можно использовать для двойных целей.

[0533] В других аспектах ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению содержат большее количество каркасных белков X по сравнению со встречающимися в природе ВВ (*например*, экзосомами). В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению содержат в по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 50 раз, по меньшей мере около 60 раз, по меньшей мере около 70 раз, по меньшей мере около 80 раз, по меньшей мере около 90 раз, по меньшей мере около 100 раз, по меньшей мере около 110 раз, по меньшей мере около 120 раз, по меньшей мере около 130 раз, по меньшей мере около 140 раз, по меньшей мере около 150 раз, по меньшей мере около 160 раз, по меньшей мере около 170 раз, по меньшей мере около 180 раз, по меньшей мере около 190 раз, по меньшей мере около 200 раз, по меньшей мере около 210 раз, по меньшей мере около 220 раз, по меньшей мере около 230 раз, по меньшей мере около 240 раз, по меньшей мере около 250 раз, по меньшей мере около 260 раз, по меньшей мере около 270 раз большее количество каркаса X (*например*, полипептида PTGFRN) по сравнению со встречающейся в природе ВВ (*например*, экзосомой).

[illegible]

около 8000, около 9000.

[0534] В некоторых аспектах каркас X представляет собой или содержит фрагмент белка PTGFRN из SEQ ID NO: 319, 320, 321, 322, 323 или 324; фрагмент белка BSG из SEQ ID NO: 326, 327 или 328; или фрагмент белка IGSF8 из SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333. В некоторых аспектах каркас X представляет собой или содержит белок PTGFRN без его сигнального пептида, т. е. белок PTGFRN или его фрагмент без его 21 N-концевой аминокислоты (MGRLASRPLLLALLSLALCRG; SEQ ID NO: 325). В некоторых аспектах каркас X представляет собой или содержит белок BSG без его сигнального пептида, т. е. белок BSG или его фрагмент без его 18 N-концевых аминокислот (MAAALFVLLGFALLGTHG; SEQ ID NO: 329). В некоторых аспектах каркас X представляет собой или содержит белок IGSF8 без его сигнального пептида, т. е. белок IGSF8 или его фрагмент без его 27 N-концевых аминокислот (MGALRPTLLPPSLPLLLLLMLGMGCWA; SEQ ID NO: 334).

[0535] Каркасные белки X и их фрагменты приведены в перечне последовательностей.

II.D.1.b. Каркас Y

[0536] 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 поверхности просвета ВВ (*например*, экзосомы) будет иметь содержание белка, липидов или гликанов, отличное от такового у встречающихся в природе ВВ (*например*, экзосом).

[0537] 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 часть каркасного фрагмента, который изменяет состав или содержимое поверхности просвета экзосомы. Различные модификации или фрагменты белка ВВ (*например*, экзосомы), которые могут экспрессироваться на поверхности просвета ВВ (*например*, экзосомы), могут быть использованы для аспектов настоящего изобретения.

[0538] В некоторых аспектах белки ВВ (*например*, экзосомы), которые могут изменять поверхность просвета ВВ (*например*, экзосомы), включают в себя, помимо прочего, белок MARCKS, белок MARCKSL1, белок BASP1 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах 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 ниже. В изомере, полученном в результате альтернативного сплайсинга, отсутствуют аминокислоты с 88 по 141 из белка BASP1 SEQ ID NO: 403.

Белок BASP1 (SEQ ID NO: 403)

MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAATEEEGTPKESEPQAAAEPAAEAKGKEK
PDQDAEGKAEKEGEKDAAAAKEEAPKAEPEKTEGAAEAKAEPKAPQEQAAPGPAA
GGEAPKAAEAAAAPAESAAPAAGEEPSKEEGEPKKTEAPAAPAAQETKSDGAPASDSKP
GSSEAAPSSKETPAATEAPSSTPKAQGPAASAEPPKPVEAPAANSQDTVTVKE

[0539] В последовательности зрелого белка BASP1 отсутствует первый Met из SEQ ID NO: 403, и, таким образом, он содержит аминокислоты со 2 по 227 из SEQ ID NO: 403.

[0540] В некоторых аспектах каркас Y, используемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную аминокислотам 2–227 из SEQ ID NO: 403. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 403. В других аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 403, 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 каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 403 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: 403.

[0541] В определенных аспектах белковая последовательность любой из SEQ ID NO: 1–109, описанных в PCT/US2018/061679, достаточна для того, чтобы быть каркасом Y для настоящего изобретения (*например*, каркасный фрагмент, связанный с линкером).

[0542] В определенных аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит пептид с последовательностью MGXKLSKKK или GXKLSKKK, где X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 404). 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 настоящем 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.

[0543] В других аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную любой из последовательностей, описанных в US 10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г.

[0544] Экзосомы со сконструированным каркасом Y, описанные в настоящем документе, могут быть получены из клетки, трансформированной любой последовательностью, представленной в PCT/US2018/061679 (SEQ ID NO: 4–109).

[0545] В других аспектах ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению содержат большее количество каркасных белков Y по сравнению со встречающимися в природе ВВ (*например*, экзосомами). В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению содержат в по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 50 раз, по меньшей мере около 60 раз, по меньшей мере около 70 раз, по меньшей мере около 80 раз, по меньшей мере около 90 раз, по меньшей мере около 100 раз, по меньшей мере около 110 раз, по меньшей мере около 120 раз, по меньшей мере около 130 раз, по меньшей мере около 140 раз, по меньшей мере около 150 раз, по меньшей мере около 160 раз, по меньшей мере около 170 раз, по меньшей мере около 180 раз, по меньшей мере около 190 раз, по меньшей мере около 200 раз, по меньшей мере около 210 раз, по меньшей мере около 220 раз, по меньшей мере около 230 раз, по меньшей мере около 240 раз, по меньшей мере около 250 раз, по меньшей мере около 260 раз, по меньшей мере около 270 раз большее количество каркаса Y (*например*, полипептида BASP-1) по сравнению со встречающейся в природе ВВ (*например*, экзосомой). Количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 1000, по меньшей мере около 1100, по меньшей мере около 1200, по меньшей мере около 1300, по меньшей мере около 1400, по меньшей мере около 1500, по меньшей мере около 1600, по меньшей мере около 1700, по меньшей мере около 1800, по меньшей мере около 1900, по меньшей мере около 2000, по меньшей мере около 2100, по меньшей мере около 2200, по меньшей мере около 2300, по меньшей мере около 2400, по меньшей мере около 2500, по меньшей мере около 2600, по меньшей мере около 2700, по меньшей мере около 2800, по меньшей мере около 2900, по меньшей мере около 3000, по меньшей мере около 4000, по меньшей мере около 5000, по меньшей мере около 6000, по меньшей мере около 7000, по меньшей мере около 8000, по меньшей мере около 9000 или по меньшей мере около 10000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от около 100 до около 100000, от около 200 до около 9000, от около 300 до около 9000, от около 400 до около 9000, от около 500 до около 9000, от около 600 до около 8000, от около 800 до около 8000, от около 900 до около 8000, от около 1000 до около 8000, от около 1100 до около 8000, от около 1200 до около 8000, от около 1300 до около 8000, от около 1400 до около 8000, от около 1500 до около 8000, от

около 1600 до около 8000, от около 1700 до около 8000, от около 1800 до около 8000, от около 1900 до около 8000, от около 2000 до около 8000, от около 2100 до около 8000, от около 2200 до около 8000, от около 2300 до около 8000, от около 2400 до около 8000, от около 2500 до около 8000, от около 2600, от около 2700 до около 8000, от около 2800 до около 8000, от около 2900 до около 8000, от около 3000 до около 8000, от около 4000 до около 8000, от около 5000 до около 8000, от около 6000 до около 8000, от около 7000 до около 8000, от около 8000, от около 7000 до около 9000 или от около 6000 до около 10000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от около 5000 до около 8000, *например*, около 5000, около 6000, около 7000 или около 8000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от около 6000 до около 8000, *например*, около 6000, около 7000 или около 8000. В некоторых аспектах количество каркаса Y, *например*, полипептида BASP-1, на BB (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению составляет от около 4000 до около 9000, *например*, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000.

[0546] В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен» (ED), при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета BB, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах 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 поверхностью просвета BB, *например*, экзосомы. В контексте настоящего документа термин «связанный с» относится к взаимодействию между каркасным белком по настоящему изобретению с поверхностью просвета BB, *например*, экзосомы, которое не включает в себя ковалентное связывание с компонентом мембраны. *Например*, каркасы, применимые для настоящего изобретения, могут быть связаны с поверхностью просвета BB, *например*, посредством липидного якоря (*например*, миристиновой кислоты) и/или многоосновного домена, который электростатически взаимодействует с отрицательно заряженной головкой фосфолипидов мембраны. В других аспектах каркас Y содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND связан с поверхностью просвета BB и ED связан с поверхностью просвета BB посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере две, 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.

[0547] В других аспектах каркас Y содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND связан с поверхностью просвета BB и ED связан с поверхностью просвета BB 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.

[0548] В некоторых аспектах ND связан с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством липидирования, например, посредством миристоилирования. В некоторых аспектах ND имеет Gly на N-конце. В некоторых аспектах N-концевой Gly является миристоилированным.

[0549] В некоторых аспектах ED связан с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых аспектах ED связан с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатическое взаимодействие.

[0550] 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 является целым числом от 1 до 10.

[0551] 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.

[0552] В некоторых аспектах ED содержит K, KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), R, RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406) 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 при этом X6 представляет собой основную

аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислота X6 выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg и His. В некоторых аспектах аминокислота X5 выбрана из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах аминокислота X2 выбрана из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах X4 выбрана из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met.

[0553] В некоторых аспектах 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.

[0554] В некоторых аспектах ND 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.

[0555] В некоторых аспектах аминокислота X3 выбрана из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0556] В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (например, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к неполипептиду, например, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкеров могут быть связаны в тандеме. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предотвращают/уменьшают стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более участков, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены 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.

[0557] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95 или по меньшей мере около 100 аминокислот.

[0558] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$, где n является любым целым числом от 1 до 100, а m является любым целым числом от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$, где x является целым числом от 1 до 4, y равно 0 или 1, а z является целым числом от 1 до 50. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность G_n , где n может являться целым числом от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$, где n является целым числом от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$, где n является целым числом от 1 до 100.

[0559] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, т.е. не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер включает в себя пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не слит 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).

[0560] 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

встречающуюся в природе полипептидную последовательность.

[0561] В некоторых аспектах 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; а 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.

[0562] В некоторых аспектах аминокислота X2 выбрана 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 аминокислота X5 выбрана 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.

[0563] В некоторых аспектах ED в каркасном белке содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410) или любую их комбинацию.

[0564] В некоторых аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414) или (v) любой из комбинации.

[0565] В некоторых аспектах ND в каркасе Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 415), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 416), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 417), (iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 418) и (v) любой из комбинации; а ED в каркасном белке содержит (i) K, KK, KKK, KKKG (SEQ ID NO: 419), KKKGY (SEQ ID NO: 420), KKKGYN (SEQ ID NO: 421),

KKKGYNV (SEQ ID NO: 422), KKKGYNVN (SEQ ID NO: 423), KKKGYS (SEQ ID NO: 424), KKKGYG (SEQ ID NO: 425), KKKGYGG (SEQ ID NO: 426), KKKGS (SEQ ID NO: 427), KKKGSG (SEQ ID NO: 428), KKKGSGS (SEQ ID NO: 429), KKKS (SEQ ID NO: 430), KKKS (SEQ ID NO: 431), KKKS (SEQ ID NO: 432), KKKS (SEQ ID NO: 433), KKKS (SEQ ID NO: 434), KKKS (SEQ ID NO: 435), KKKS (SEQ ID NO: 436), KRFSFKKS (SEQ ID NO: 437).

[0566] 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: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414) или (v) любой их комбинации.

[0567] В некоторых аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

[0568] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркаса Y, применимая для настоящего изобретения, состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

[0569] В некоторых аспектах длина каркаса Y составляет по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 31, по меньшей мере около 32, по меньшей мере около 33, по меньшей мере около 34, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 36, по меньшей мере около 37, по меньшей мере около 38, по меньшей мере около 39, по меньшей мере около 39, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 41, по меньшей мере около 42, по меньшей мере около

43, по меньшей мере около 44, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 46, по меньшей мере около 47, по меньшей мере около 48, по меньшей мере около 49, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 115, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 135, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 145, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 155, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 165, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 175, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 185, по меньшей мере около 190, по меньшей мере около 195, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 205, по меньшей мере около 210, по меньшей мере около 215, по меньшей мере около 220, по меньшей мере около 225, по меньшей мере около 230, по меньшей мере около 235, по меньшей мере около 240, по меньшей мере около 245, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 255, по меньшей мере около 260, по меньшей мере около 265, по меньшей мере около 270, по меньшей мере около 275, по меньшей мере около 280, по меньшей мере около 285, по меньшей мере около 290, по меньшей мере около 295, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 305, по меньшей мере около 310, по меньшей мере около 315, по меньшей мере около 320, по меньшей мере около 325, по меньшей мере около 330, по меньшей мере около 335, по меньшей мере около 340, по меньшей мере около 345 или по меньшей мере около 350 аминокислот.

[0570] В некоторых аспектах длина каркаса Y составляет от около 5 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190, от около 190 до около 200, от около 200 до около 210, от около 210 до около 220, от около 220 до около 230, от около 230 до около 240, от около 240 до около 250, от около 250 до около 260, от около 260 до около 270, от около 270 до около 280, от около 280 до около 290, от около 290 до около 300, от около 300 до около 310, от около 310 до около 320, от около 320 до около 330, от около 330 до около 340 или от около 340 до около 250 аминокислот.

[0571] В некоторых аспектах каркас Y содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID

NO: 446), (ii) GAKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKSKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKSKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKSKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKSKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKSKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

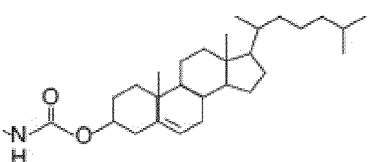
[0572] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркаса Y, применимого для настоящего изобретения, состоит из (i) GGKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKSKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKSKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKSKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKSKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKSKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 465).

[0573] Неограничивающие примеры каркаса Y, применимого для настоящего изобретения, перечислены ниже. В некоторых аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 457–567. В некоторых аспектах каркас Y состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 457–567.

[0574] В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркас Y содержит липидированную аминокислоту, *например*, миристоилированную аминокислоту, на N-конце каркасного белка, который функционирует как липидный якорь. 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.

[0575] В других аспектах липидный якорь может представлять собой любой липидный якорь, известный в данной области техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозиты. 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 миристант,

как сообщается, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи. Мембранные якоря, известные в данной области техники, представлены в следующей таблице:

Модификация	Модифицирующая группа
S-пальмитоилирование	
N-пальмитоилирование	
N-миристилоилирование	
O-ацелирование	
Фарнесилирование	
Геранилгеранилирование	
Холестерол	

III. Способы изготовления

[0576] 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 в себя связывание биологически активной молекулы с ВВ (*например*, экзосомой) посредством малеимидного фрагмента, как описано выше.

[0577] Помимо аминокреакционноспособных 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 в 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.

[0578] 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 сложный эфир NHS, который содержит малеимидную группу и сложный эфир NHS, сложный эфир NHS можно использовать для мечения первичных аминов (-NH₂) белков, аминомодифицированных олигонуклеотидов и других аминокислотсодержащих молекул. Малеимидная группа будет реагировать с тиоловой группой с образованием ковалентной связи, что делает возможным соединение биомолекулы с тиолом.

[0579] 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.

[0580] 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.

[0581] Избыток малеимида можно погасить в конце реакции путем добавления свободных тиолов. ЭДТА может быть включена в буфер для сочетания для хелатирования блуждающих двухвалентных металлов, которые в противном случае способствуют окислению сульфгидрилов (нереакционноспособных).

[0582] В одном аспекте связывание включает в себя обработку ВВ (*например*, экзосомы) восстанавливающим агентом. Подходящие восстанавливающие агенты включают в себя, *например*, ТСЕР (трис(2-карбок시에тил)фосфин), ДТТ (дитиотреитол), ВМЕ (2-меркаптоэтанол), тиолирующий агент и любую их комбинацию. Тиолирующий агент может содержать, *например*, реагент Траута (2-иминотиолан).

[0583] После обработки восстанавливающим агентом реакция связывания дополнительно включает в себя 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 более линкеров или спейсеров расположены между малеимидным фрагментом и биологически активной молекулой.

[0584] В некоторых аспектах ВВ, описанные в настоящем документе (*например*, экзосомы), могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro* или взятой из жидкости организма субъекта. Когда экзосомы получают из клеточной культуры *in vitro*, могут быть использованы различные клетки-продуценты, *например*, клетки НЕК293, клетки СНО и МСК. В определенных аспектах клетка-продуцент представляет собой клетки НЕК293. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, макрофагом, В-клеткой, тучной клеткой, нейтрофилом, клеткой Бровича—Купфера, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

[0585] Клетки 293 эмбриональной почки человека, также часто называемые НЕК 293, НЕК-293, клетки 293 или менее точно клетки НЕК, представляют собой специфическую линию клеток, первоначально полученную из клеток эмбриональной почки человека, выращенных в культуре тканей.

[0586] Клетки НЕК 293 были получены в 1973 г. путем трансфекции культур нормальных клеток эмбриональной почки человека с помощью урезанной ДНК аденовируса 5 в лаборатории Алекса ван дер Эба в г. Лейден, Нидерланды. Клетки

культивировали и трансфицировали аденовирусом. Последующий анализ показал, что трансформация была вызвана путем вставки ~4,5 тысяч оснований из левого плеча вирусного генома, который был включен в человеческую хромосому 19.

[0587] Во всестороннем исследовании геномов и транскриптом НЕК 293 и пяти производных линий клеток сравнили транскриптому НЕК 293 с транскриптомой почки, надпочечника, гипофиза и тканей центральной нервной системы человека. Профиль НЕК 293 наиболее близко напоминал профиль клеток надпочечников, которые обладают многими нейрональными свойствами.

[0588] Клетки НЕК 293 имеют комплексный кариотип, демонстрирующий две или более копий каждой хромосомы и модальное число хромосом 64. Они описаны как гипотриплоид, содержащий в три раза меньшее количество хромосом гаплоидной гаметы человека. Хромосомные аномалии включают в себя всего три копии X-хромосомы и четыре копии хромосомы 17 и хромосомы 22.

[0589] Варианты клеток НЕК293, пригодные для получения ВВ, включают в себя, помимо прочего, НЕК 293F, НЕК 293FT и НЕК 293T.

IV. Терапевтические виды применения

[0590] В настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение субъекту композиции, содержащей ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению. В настоящем изобретении также предложены способы предупреждения или облегчения симптомов заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение субъекту композиции, содержащей ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению. Также предложены способы диагностики заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение субъекту композиции, содержащей ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению.

[0591] В одном аспекте заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное заболевание, нейродегенеративное нарушение, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ.

[0592] В настоящем изобретении также предложены способы предупреждения и/или лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение субъекту ВВ (*например*, экзосомы), описанной в настоящем документе. В определенных аспектах заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью способов по настоящему изобретению, включает в себя 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 индуцирования иммунного ответа. В других аспектах ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению используются для вакцинации субъекта.

[0593] 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-клетки) в микроокружение опухоли. В определенных аспектах рак включает в себя рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичек, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак 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.

[0594] В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой реакцию «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 в себя: 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.

[0595] 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 с помощью настоящего изобретения, включают в себя, помимо прочего, человеческий гамма-вирус герпеса 4 (вирус Эпштейна-Барр), вирус гриппа А, вирус гриппа В, цитомегаловирус, золотистый стафилококк, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, ВИЧ-1, ВИЧ-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 (ВПЧ), 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.

[0596] 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.

[0597] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят внутриаартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[0598] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят субъекту интратекальным путем. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (СМЖ).

[0599] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят внутриопухолево в одну или более опухолей субъекта.

[0600] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят субъекту интраназальным путем. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) можно инсуфлировать через нос в форме местного введения или системного введения. В определенных аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят в виде назального спрея.

[0601] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят субъекту интраперитонеальным путем. 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 более лимфатических узлах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ (*например*, экзосом) в одном или более из шейного лимфатического узла, пахового лимфатического узла, средостенного лимфатического узла или грудного лимфатического узла. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ (*например*, экзосом) в поджелудочной железе.

[0602] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят субъекту периокулярным путем. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственного средства включает в себя пути субконъюнктивального, переднего субтеноновского, заднего субтеноновского и ретробульбарного введения.

V. Фармацевтические композиции и способы введения

[0603] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие ВВ (*например*, экзосомы), описанные в настоящем документе, которые подходят для введения субъекту. Фармацевтические композиции обычно содержат множество ВВ (*например*, экзосом), содержащих биологически активную молекулу, ковалентно связанную со множеством ВВ (*например*, экзосом) посредством малеимидного фрагмента, и фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель 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)). Фармацевтические композиции, как правило, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит одно или несколько химических соединений, таких как, например, малые молекулы, ковалентно связанные с ВВ (*например*, экзосомой), описанной в настоящем документе.

[0604] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и ВВ (*например*, экзосому), описанную в настоящем 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.

[0605] В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие ВВ (*например*, экзосому) по настоящему изобретению, имеющую 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, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[0606] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и ВВ (*например*, экзосому), описанную в настоящем 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.

[0607] 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 и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза 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).

[0608] Примеры носителей или разбавителей включают в себя, помимо прочего, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или соединение несовместимы с внеклеточными везикулами, описанными в настоящем документе, предполагается их применение в композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в эти композиции. Как правило, фармацевтическая композиция составлена так, чтобы быть 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) можно необязательно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении заболевания, расстройства или состояния, для лечения которых предназначены ВВ (*например*, экзосомы).

[0609] Растворы или суспензии могут включать в себя следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований,

таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластмассы.

[0610] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы (если они водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stenophor EL™ (BASF, Парсиппани, штат Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Обычно композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, что она должна легко проходить через иглу. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, *например*, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, *например*, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может достигаться посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например*, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например*, моностеарата алюминия и желатина.

[0611] 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 настоящем документе, при необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения ВВ (*например*, экзосом) в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка активного ингредиента вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. ВВ (*например*, экзосомы) можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, которые могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить замедленное или пульсирующее высвобождение ВВ (*например*, экзосом).

[0612] Системное введение композиций, содержащих ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению, также может осуществляться трансмукозальным путем. Для

трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники и включают в себя, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено за счет использования, *например*, назальных спреев.

[0613] В определенных аспектах фармацевтическую композицию, содержащую ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению, вводят внутривенно субъекту, которому фармацевтическая композиция может принести пользу. В определенных других аспектах 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.

[0614] 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.

[0615] Обычно фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, чтобы не содержать загрязняющих веществ, они биосовместимы и нетоксичны и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, вода является высокоочищенной и обработанной таким образом, что не содержит загрязняющих веществ, *например*, эндотоксинов.

[0616] 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 смазывающее вещество, смачивающее вещество, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент, суспендирующий агент и/или консервант.

[0617] 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, низкомолекулярное средство или агент на основе

нуклеиновой кислоты.

[0618] 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.

[0619] 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.

[0620] В определенных аспектах препарат ВВ (*например*, экзосом) по настоящему изобретению подвергается воздействию гамма-облучения с применением дозы облучения более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 кГр.

[0621] В определенных аспектах препарат ВВ (*например*, экзосом) по настоящему изобретению подвергается облучению рентгеновскими лучами с применением дозы облучения более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000 или

[0622] 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

[0623] В настоящем изобретении также предложены наборы или изделия, содержащие одну или более ВВ (*например*, экзосом) по настоящему изобретению и необязательно инструкции по применению. В некоторых аспектах набор или изделие содержит фармацевтическую композицию, описанную в настоящем 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 техники 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 в данной области техники.

[0624] В некоторых аспектах набор или изделие содержит ВВ (*например*, экзосомы), одну или более биологически активных молекул, реагентов для ковалентного присоединения одной или более биологически активных молекул к ВВ (*например*, экзосомам) посредством малеимидного фрагмента, или любую их комбинацию, и инструкции по проведению реакции для ковалентного присоединения одной или более биологически активных молекул к ВВ (*например*, экзосомам) посредством малеимидного фрагмента.

[0625] В некоторых аспектах набор содержит реагенты для конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ (*например*, экзосомой) посредством малеимидного фрагмента и инструкции по проведению конъюгации.

[0626] 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.).

[0627] Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством

ссылки в полном объеме.

[0628] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

Примеры

[0629] 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 методы 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

[0630] Для получения экзосом, описанных в настоящем документе, используют клеточную линию эмбриональной почки человека (НЕК) (НЕК293SF). Клетки стабильно трансфицируют каркасом Х и/или каркасом Y, связанным с представляющим интерес агентом (*например*, антигеном, адъювантом или иммуномодулятором). Например, экзосомы, экспрессирующие CD40L, могут быть получены путем трансфекции клеток НЕК293SF слитыми молекулами CD40L-GFP PTGFRN, которые экспрессируются в виде мономера или в виде форсированного тримера.

[0631] После трансфекции клетки НЕК293SF выращивают до высокой плотности в среде определенного химического состава в течение 7 дней. Кондиционированные среды для культивирования клеток затем собирают и центрифугируют со скоростью $300-800 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и крупного клеточного дебриса. В супернатант среды добавляют 1000 Ед/л реагента BENZONASE® и инкубируют на водяной бане при 37 °C в течение 1 часа. Супернатант собирают и центрифугируют в течение 30 минут со скоростью $16\,000 \times g$ при 4 °C для удаления остаточного клеточного дебриса и других крупных загрязнителей. Затем супернатант подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при 4 °C для осаждения экзосом. Супернатант удаляют и с помощью аспирации удаляют со дна

пробирки все остатки среды. Осадок повторно суспендируют в 200–1000 мкл ФСБ (-Ca - Mg).

[0632] Для дальнейшего обогащения популяций экзосом осадок обрабатывают с помощью очистки в градиенте плотности (сахароза или OPTIPREP™).

[0633] Для отделения фракции экзосом градиент центрифугируют со скоростью $200\,000 \times g$ в течение 16 часов при 4 °C в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti.

[0634] Затем с поверхностного слоя осторожно удаляют слой экзосом, разводят его в ~32,5 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и снова подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Полученный осадок повторно суспендируют в минимальном объеме ФСБ (~200 мкл) и хранят при 4 °C.

[0635] Для градиента OPTIPREP™ готовят 3-уровневый стерильный градиент с использованием одинаковых объемов 10%, 30% и 45% реагента OPTIPREP™ в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл для ротора SW 41 Ti. Осадок добавляют к градиенту OPTIPREP™ и ультрацентрифугируют со скоростью $200\,000 \times g$ в течение 16 часов при 4 °C для отделения фракции экзосом. Экзосомный слой затем осторожно собирают из верхних ~3 мл из пробирки.

[0636] Фракцию экзосом разводят в ~32 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем ресуспендируют в минимальном объеме ФСБ (~200 мкл) и хранят при 4 °C до возможности использования.

Пример 2

Анализ in vitro снижения уровня мРНК KRAS и/или белка KRAS

[0637] Иллюстративные ASO, описанные в настоящем документе, были разработаны для специфического нацеливания на транскрипт *KRAS*, кодирующий белок KRAS, с мутацией G12D. См. ФИГ. 1F. ASO, нацеленные на любой другой целевой ген, описанный в настоящем документе (*например*, NLRP3, STAT6, CEBP/β, STAT3 или NRAS), также могут использоваться в аналогичных способах. Описанные ASO тестируют на их способность подавлять экспрессию мРНК KRAS и/или белка KRAS в линиях репортерных клеток, содержащих аллель дикого типа (ДТ) или аллель G12D мРНК KRAS человека выше люциферазы Renilla. С целью контроля общей клеточной токсичности линии клеток также содержат люциферазу светлячка. KRAS-специфическую миРНК используют в качестве положительного контроля.

[0638] Вкратце, линии репортерных клеток, экспрессирующие белок KRAS ДТ или с мутацией G12D, выращивают в среде для культивирования клеток и высевают на 96-луночный планшет. Затем клетки обрабатывают различными концентрациями ВВ (*например*, экзосом), содержащих один или более ASO, описанных в настоящем документе («ВВ-ASO»). Приблизительно через 3 дня после обработки ВВ-ASO клетки собирают и из клеток очищают РНК и/или белок. Затем уровни экспрессии мРНК *KRAS* и/или белка KRAS в клетках количественно оценивают с помощью анализов, таких как кПЦР и вестерн-блоттинг.

Пример 3

Анализ in vivo снижения уровня мРНК KRAS/белка KRAS

[0639] Для оценки активности ВВ (*например*, экзосом), содержащих один или более ASO, описанных в настоящем документе, при снижении уровня мРНК *KRAS* и/или белка KRAS *in vivo* используют мышиную опухолевую модель. ASO, нацеленные на любой другой целевой ген, описанный в настоящем документе (*например*, NLRP3, STAT6, CEBP/β, STAT3 или NRAS), также могут использоваться в аналогичных способах. ASO, описанные в настоящем документе, вводят мышам с опухолью по различным схемам введения. У мышей периодически контролируют рост опухоли. В конечном итоге мышей умерщвляют и оценивают уровни мРНК *KRAS* и/или белка KRAS в различных клетках.

Пример 4

Анализ in vitro снижения уровня мРНК NLRP3 и/или белка NLRP3

[0640] Иллюстративные ASO, описанные в настоящем документе, были разработаны для специфического нацеливания на транскрипт *NLRP3*. См. ФИГ. 1А. Описанные ASO тестируют на их способность подавлять экспрессию мРНК *NLRP3* и/или белка NLRP3 в линиях репортерных клеток, содержащих кодирующую последовательность *NLRP3* человека выше репортера. NLRP3-специфическую миРНК используют в качестве положительного контроля.

[0641] Вкратце, линии репортерных клеток, экспрессирующие NLRP3, выращивают в среде для культивирования клеток и высевают на 96-луночный планшет. Затем клетки обрабатывают различными концентрациями ВВ (*например*, экзосом), содержащих один или более ASO, описанных в настоящем документе («ВВ-ASO»). Способы получения таких ВВ представлены в другом месте в настоящем изобретении. Приблизительно через 3 дня после обработки ВВ-ASO клетки собирают и из клеток очищают РНК и/или белок. Затем уровни

экспрессии мРНК *NLRP3* и/или белка *NLRP3* в клетках количественно оценивают с помощью анализов, таких как кПЦР и вестерн-блоттинг.

Пример 5

Дизайн ASO *NLRP3*

[0642] Мышиные и человеческие ASO были разработаны для нацеливания на экспрессию *NLRP3* (ID гена № 114548). Целевые последовательности были выбраны с использованием эталонных последовательностей NM_004895 для *NLRP3* человека и NM_145827.4 для *NLRP3* мыши. Перечень возможных ASO был получен для каждого гена путем обработки ASO по всей длине образующегося транскрипта. Были получены ASO длиной 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных оснований.

[0643] ASO были приоритизированы на основании следующих свойств: должны совпадать все формы сплайсинга; низкая энергия самодимеризации (целевая активность); отсутствие мотива GGGG (SEQ ID NO: 598) (может вызывать проблемы синтеза); менее 3 динуклеотидов CpG в олиго (потенциальная иммуностимуляция); менее 8 оснований палиндромной последовательности (потенциальная димеризация и иммуностимуляция); более 2 несовпадений и не более 17 последовательных оснований в нецелевом совпадении с любым геном, включая известные микроРНК и днкРНК, и как в образующемся, так и в зрелом транскриптах; отсутствие перекрытия с повторяющимися последовательностями и отсутствие перекрытия с ОНП, которые больше или равны 0,01 ЧМА в общей популяции. Дополнительные критерии включали в себя прогнозируемую перекрестную реактивность видов (*например*, транскрипты человека, яванского макака, макака-резуса, крысы, мыши); а также нецелевой (НЦ) фильтр не более 3 несовпадений (нс) в зрелых транскриптах, не более 3 нс в днк-транскриптах, не более 3 нс в микроРНК и не более 3 нс в образующихся транскриптах.

Пример 6

Анализ *in vivo* снижения уровня мРНК *NLRP3*/белка *NLRP3*

[0644] Для оценки активности ВВ (*например*, экзосом), содержащих один или более ASO, описанных в настоящем документе, при снижении уровня мРНК *NLRP3* и/или белка *NLRP3* *in vivo* используют мышиную фиброзную модель. ASO, описанные в настоящем документе, вводят мышам по различным схемам введения. У мышей периодически контролируют симптомы фиброза. В конечном итоге мышей умерщвляют и оценивают уровни мРНК *NLRP3* и/или белка *NLRP3* в различных клетках.

Пример 7

Функциональный анализ в первичных моноцитах и макрофагах человека

[0645] Активация пути NLRP3 индуцирует выработку IL-1 β моноцитами и макрофагами человека. Активация пути NLRP3 может достигаться путем 3-часового примирования с помощью 200 нг/мл LPS с последующей инкубацией в течение ночи с 5 mM АТФ, как показано с использованием моноцитов, выделенных из цельной крови человека, а также макрофагов M0, которые выдерживали в M-CSF в течение 6 дней с использованием моноцитов. Индуцирование выработки IL-1 β можно ингибировать с помощью MCC950 и значений IC50 при лечении свободным лекарственным средством (ФИГ. 2А-2В). Концентрации IL-1 β определяют с помощью анализа AlphaLISA.

[0646] Аналогично выработке IL-1 β клетками человека после активации пути NLRP3, макрофаги из костного мозга мышей также вырабатывают IL-1 β , что может быть достигнуто путем 3-часового примирования с помощью 200 нг/мл LPS с последующей 3-часовой инкубацией с 5 mM АТФ (ФИГ. 2С).

Пример 8

Модель перитонита *in vivo*

[0647] Внутривентрикулярная нагрузка LPS индуцирует выработку IL-1 β у мышей, который можно обнаружить в системном кровотоке через 3 часа после введения. Индуцирование IL-1 β в сыворотке мышей, которым вводили LPS, можно ингибировать путем предварительной обработки MCC950, вводимого внутривентрикулярно, за 1 час до введения (ФИГ. 3А-3В).

Пример 9

Анализ *in vitro* снижения уровня мРНК и/или белка

[0648] Иллюстративные ASO, описанные в настоящем документе, были разработаны для специфического нацеливания на транскрипт *STAT6* (ФИГ. 1В) или транскрипт *CEBP β* (ФИГ. 1С). Описанные ASO тестируют на их способность подавлять экспрессию мРНК *STAT6* или *CEBP β* и/или белка STAT6 или CEBP β в линиях репортерных клеток, содержащих кодирующую последовательность *STAT6* или *CEBP β* человека выше репортера. STAT6- или CEBP β -специфическую миРНК используют в качестве положительного контроля.

[0649] Вкратце, линии репортерных клеток, экспрессирующие STAT6 или CEBP β , выращивают в среде для культивирования клеток и высевают на 96-луночный планшет.

Затем клетки обрабатывают различными концентрациями ВВ (*например*, экзосом), содержащих один или более ASO, описанных в настоящем документе («ВВ-ASO»). Способы получения таких ВВ представлены в другом месте в настоящем изобретении. Приблизительно через 3 дня после обработки ВВ-ASO клетки собирают и из клеток очищают РНК и/или белок. Затем уровни экспрессии мРНК *STAT6* или *CEBP/β* и/или белка *STAT6* или *CEBP/β* в клетках количественно оценивают с помощью анализов, таких как кПЦР и вестерн-блоттинг.

[0650] Ведущий ASO выбирают сначала путем отбора *in silico* на основании перекрестной реактивности альтернативных транскриптов, перекрестной реактивности видов, специфичности к представляющему интерес гену, присутствия ОНП в пределах ASO, длины ASO, разнообразия расположения, токсических мотивов и прогнозируемой аффинности связывания. Затем ASO подвергают скринингу на предмет способности подавлять (на по меньшей мере 50% при 2 нМ, и менее чем 20% нокдаун GAPDH при 20 нМ) экспрессию целевых генов в линиях клеток, трансфицированных целевой последовательностью (мРНК *STAT6* или *CEBP/β*). ASO затем оценивают на предмет активности подавления целевых генов в первичных макрофагах от по меньшей мере двух доноров. Стабильность экспрессии конститутивного гена, разнообразие расположения последовательностей и экспрессия прогнозируемых не-мишеней после обработки также будут наблюдаться. Оптимальные ASO, имеющие самую высокую активность перепрограммирования (изменения экспрессии генов, выработка цитокинов, подавление Т-клеток) в первичных макрофагах, будут выбраны как ведущие ASO.

Пример 10

Дизайн ASO

[0651] Мышиные и человеческие ASO были разработаны для нацеливания на экспрессию *STAT6* (ID гена № 6778) или *CEBP/β* (ID гена № 1051). Целевые последовательности *STAT6* были выбраны с использованием эталонных последовательностей NM_001178078.2 для *STAT6* человека и NM_009284.2 для *STAT6* мыши. Целевые последовательности *CEBP/β* были выбраны с использованием эталонных последовательностей NM_001285878.1 для *CEBP/β* человека и NM_009883.4 для *CEBP/β* мыши. Перечень возможных ASO был получен для каждого гена путем обработки ASO по всей длине образующегося транскрипта. Были получены ASO длиной 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных оснований.

[0652] ASO были приоритизированы на основании следующих свойств: должны

совпадать все формы сплайсинга; низкая энергия самодимеризации (целевая активность); отсутствие мотива GGGG (может вызывать проблемы синтеза); менее 3 динуклеотидов CpG в олиго (потенциальная иммуностимуляция); менее 8 оснований палиндромной последовательности (потенциальная димеризация и иммуностимуляция); более 2 несовпадений и не более 17 последовательных оснований в нецелевом совпадении с любым геном, включая известные микроРНК и днкРНК, и как в образующемся, так и в зрелом транскриптах; отсутствие перекрытия с повторяющимися последовательностями и отсутствие перекрытия с ОНП, которые больше или равны 0,01 ЧМА в общей популяции. Дополнительные критерии включали в себя прогнозируемую перекрестную реактивность видов (*например*, транскрипты человека, яванского макака, макака-резуса, крысы, мыши); а также нецелевой (НЦ) фильтр не более 3 несовпадений (нс) в зрелых транскриптах, не более 3 нс в днк-транскриптах, не более 3 нс в микроРНК и не более 3 нс в образующихся транскриптах.

Пример 11

Загрузка ASO в экзосомы

[0653] Мышам внутривенно вводили одну дозу экзосом 2E11, загруженных репортерным ASO («ехо ASO»), или одну дозу свободного репортерного ASO («свободный ASO»). Через один час после введения наблюдали повышенное поглощение ехо ASO в CD11b⁺ дендритных клетках, моноцитах и mMDSC в крови (ФИГ. 4A); клетках Купфера в печени (ФИГ. 4B); макрофагах красной пульпы селезенки, моноцитах и mMDSC в селезенке (ФИГ. 4C) и дендритных клетках и mMDSC в опухолевой ткани (ФИГ. 4D), о чем свидетельствует СИФ, относительно локализации свободного ASO. Поглощение ехо ASO также было выше в костном мозге (ФИГ. 4E-4F) по сравнению с поглощением свободного ASO и отрицательных контролей (ФИГ. 4G-4J).

Пример 12

Ехо-STAT6-ASO и Ехо-CEBP/β-ASO способны к реполяризации макрофагов M2

[0654] Первичные макрофаги человека поляризовали путем обработки IL4/IL10/TGFβ и обрабатывали возрастающими концентрациями Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/β-ASO. Обработка *in vitro* первичных макрофагов человека с помощью Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/β-ASO индуцирует дозозависимый нокдаун STAT6 (ФИГ. 5A) или CEBP/β (ФИГ. 5C), соответственно, а также подавление гена макрофага M2, CD163 (ФИГ. 5B и 5D). Было обнаружено, что активность является несколько выше при использовании

Ехо-ASO по сравнению со свободными ASO. Кроме того, различные гены M2 подавлялись, а различные гены M1 были активированы после обработки Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/ β -ASO (ФИГ. 6A-6J).

Пример 13

Нокдаун целевых генов Ехо-STAT6-ASO и Ехо-CEBP/ β -ASO в клетках CD11b.

[0655] *In vivo* первичной клеткой-реципиентом для Ехо-STAT6-ASO и Ехо-CEBP/ β -ASO являются клетки CD11b. Чтобы дополнительно измерить эффективность поглощения и нокдауна Ехо-ASO, мышам вводили Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/ β -ASO, и их умерщвляли. CD11b⁺ клетки затем выделяли и обогащали (ФИГ. 7A-7F). Хотя это и не является конечной точкой, объем опухоли был значительно меньше у мышей, которым вводили Ехо-STAT6-ASO и Ехо-CEBP/ β -ASO, по сравнению с мышами, которым вводили скремблированный контроль Ехо-ASO, и мыши, которым вводили Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/ β -ASO, демонстрировали тенденцию к меньшим опухолям, чем мыши, которым вводили свободный ASO STAT6 (ФИГ. 7G). Нокдаун целевого гена Ехо-ASO был более выраженным в CD11b-обогащенных клетках по сравнению с необогащенными клетками после обработки Ехо-STAT6-ASO (ФИГ. 8A) или Ехо-CEBP/ β -ASO (ФИГ. 8B). Кроме того, оба Ехо-ASO были эффективными при снижении экспрессии Arg1 в большей степени в CD11b-обогащенных клетках по сравнению с необогащенными клетками (ФИГ. 8C).

[0656] CD11b-обогащенные клетки, обработанные Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/ β -ASO, также продемонстрировали перепрограммирование макрофагов, о чем свидетельствует активация различных генов M1 и подавление различных генов M2 (ФИГ. 9A-9V).

Пример 14

Лечение фиброза с помощью Ехо-STAT6-ASO и/или Ехо-CEBP/ β -ASO.

[0657] Чрезмерная активация макрофагов M2 приводит к непрерывной выработке TGF β и факторов роста, которые способствуют пролиферации миофибробластов, активации EMT/EndoMT и реорганизации внеклеточного матрикса. Макрофаги M2 являются переломным моментом между заживлением ран и обострением профиброзного процесса. Чтобы изучить, можно ли использовать Ехо-STAT6-ASO или Ехо-CEBP/ β -ASO для лечения фиброза у субъекта, первичные макрофаги M2 человека поляризовали путем обработки IL-13/TGF β , которые являются драйверами фиброза. Клетки затем подвергали воздействию возрастающих концентраций свободного ASO STAT6 (ФИГ. 10A и 10C),

свободного ASO CEBP/β (ФИГ. 10B и 10D), Eho-STAT6-ASO (ФИГ. 10A и 10C) или Eho-CEBP/β-ASO (ФИГ. 10B и 10D); и оценивали на предмет экспрессии целевого гена (*STAT6*, ФИГ. 10A; *CEBP/β*, ФИГ. 10B) или экспрессии *TGFβ1* (ФИГ. 10C-10D).

[0658] Для изучения возможности доставки Eho-ASO *in vivo* путем интраназального введения мышам в возрасте 6 недель вводили блеомицин, чтобы вызвать фиброз легких. Через две недели мышам интраназально вводили Eho-ASO-Cy5 и мышей умерщвляли через 4 часа после введения. Индуцированные блеомицином мыши, которым вводили Eho-ASO-Cy5, продемонстрировали увеличенный общий поток Cy5 по сравнению с интактными мышами, которым вводили Eho-ASO-Cy5 («IN naïve»), и по сравнению с интактными и обработанными мышами, которым вводили отрицательный контроль ФСБ («-С») (ФИГ. 11).

[0659] Поглощение экзосом наблюдалось в макрофагах легких и капиллярных эндотелиальных клетках легких как в нормальной легочной ткани, так и в легочной ткани с индуцированным фиброзом (ФИГ. 12A-12H и 13A-13H).

Пример 15

Лечение гепатокарциномы в мышинной модели с помощью Eho-STAT6-ASO и/или Eho-CEBP/β-ASO.

[0660] Мышей Нера1-6 используют для изучения эффективности *in vivo* Eho-STAT6-ASO и Eho-CEBP/β-ASO при лечении опухоли. Линия Нера1-6 представляет собой ортотопическую мышиную модель гепатокарциномы. Образцы были получены от компании CRO и проанализированы путем гибридизации *in situ* в отношении экспрессии *STAT6* и *CEBP/β* (ФИГ. 14A-14F и 15A-15F).

Пример 16

Анализ экспрессии мРНК STAT3

[0661] ASO по настоящему изобретению были протестированы на их способность снижать экспрессию мРНК *STAT3* в IL-6-стимулированных клетках PANC-1. Клетки PANC-1 выращивали в среде для культивирования клеток и высевали на 96-луночный планшет с плотностью 20000 клеток на лунку. ASO тестировали в двух отдельных когортах: 2 дозы или 5 доз вводили в клетки PANC-1 (см. **таблицу 3**) в конечных концентрациях 20 нМ и 2 нМ, соответственно. В анализе использовали трансфекцию липофектамином 2000 и 48-часовой цикл обработки с инкубацией при 37 °C и 5% CO₂. Затем проводили анализ экспрессии мРНК с использованием анализа разветвленных ДНК.

ТАБЛИЦА 3

			Данные при введении 5 доз		Данные при введении 2 доз			
			STAT3	STAT3	STAT3	STAT3	GAPDH	
SEQ ID NO:	исходное основание	длина	PAN C1 IC50 Prism	Макс. ингибирование 24 нМ	Ингибирование 20 нМ	Ингибирование 2 нМ	Ингибирование 20 нМ	Примечания
103	1046	15	0,465	89,93	95,8	82,5	10,00	1 CpG, совпадения 7x1 мм, 261x2 мм
115	2267	15	0,796	78,99	90,8	65,2	3,00	крыса, 2 CpG, совпадения 3x1 мм, 143x2 мм
138	1238	16	1,306	85,33	86,8	53,0	9,00	2 CpG, совпадения 51x2 мм
112	1482	16	1,041	86,32	91,0	70,0	-25,00	1 CpG, 1 GGGG, совпадения 90x2 мм
105	450	20	1,471	85,61	91,6	79,4	13,00	1 CpG
137	516	20	1,803	79,46	87,4	53,0	-2,00	1 CpG
124	995	20	1,597	86,46	83,3	62,6	13,00	1 CpG
114	2262	20	0,814	84,94	87,0	66,4	10,00	крыса, 2 CpG
102	2557	20	0,473	78,02	89,5	82,7	16,00	2 CpG, 1 GGGG
107	2558	20	0,037	70,92	87,7	79,0	8,00	2 CpG, 1 GGGG
116	411	20	1,854	69,78	85,5	64,5	16,00	1 CpG
120	525	20	2,054	87,43	93,4	62,8	12,00	2 CpG
130	458	20	1,67	72,16	80,7	59,3	13,00	1 CpG

			7					
134	1039	20	2,12 7	77,94	82,8	54,3	10,00	1 CpG
135	1238	20	1,04 6	78,59	84,2	53,9	4,00	2 CpG
133	2274	20	2,24 3	81,73	90,7	55,9	14,00	1 CpG
125	2263	20	2,29 6	81,67	85,1	61,7	14,00	2 CpG
126	511	20	2,78 3	87,71	90,7	61,4	13,00	1 CpG
131	894	17	2,82 5	75,20	90,7	58,9	12,00	2 CpG, совпаде ния 9x2 мм
145	2273	20	3,06 3	85,73	89,2	50,2	17,00	1 CpG
128	1043	20	3,56 5	79,56	81,1	61,1	19,00	1 CpG
139	1034	20	4,02 3	72,50	83,4	52,8	10,00	1 CpG
Конт роль	1286	20	4,10 3	81,62	84,5	49,6	15,00	не явански й макак, совпаде ния 9x2 мм
142	1484	20	6,75 7	76,10	80,0	51,7	9,00	1 CpG, 1 GGGG

ПРИМЕР 17

Анализ экспрессии мРНК *NRas*

[0662] ASO по настоящему изобретению были протестированы на их способность снижать экспрессию мРНК *NRas* в клетках НЕК-293. Клетки НЕК-293 выращивали в среде для культивирования клеток и высевали на 96-луночный планшет с плотностью 20000 клеток на лунку. ASO тестировали в двух отдельных когортах: 2 дозы или 5 доз вводили в клетки НЕК-293 (см. **таблицы 4, 5 и 6**) в конечных концентрациях 20 нМ и 2 нМ, соответственно. В анализе использовали трансфекцию липофектамином 2000 и 48-часовой цикл обработки с инкубацией при 37 °C и 5% CO₂. Затем проводили анализ экспрессии мРНК с использованием анализа разветвленных ДНК. Например, SEQ ID NO: 201 продемонстрировала ингибирование экспрессии NRas на 98,45% (**таблица 6**).

ТАБЛИЦА 4

	Клетки HEK293: двойная доза			
SEQ ID NO:	MV 20 нМ	SD 20 нМ	MV 2 нМ	SD 2 нМ
201	3,5	0,4	5,8	2,3
274	9,6	2,5	18,6	10,2
239	7,8	0,7	17,9	2,2
200	2,8	1,0	7,8	3,1
272	8,7	0,6	16,5	5,4
264	10,4	1,1	24,7	4,3
232	4,4	1,3	9,8	2,2
281	16,2	3,4	26,4	4,1
248	6,0	1,4	21,8	6,1
252	8,3	1,4	15,2	3,9
254	5,8	1,1	15,6	4,6
236	9,8	2,1	19,4	2,6
273	8,1	1,0	24,3	5,2
257	8,6	3,7	25,9	2,8
227	11,2	1,3	25,1	4,3
218	10,7	0,4	19,1	3,6
253	6,5	1,0	11,6	2,0
206	8,7	2,6	20,2	5,7
231	6,4	1,3	20,2	3,9
247	9,8	2,0	21,3	12,5
223	18,7	1,1	23,9	3,3
238	7,6	1,9	28,8	1,9
250	8,6	2,1	27,3	2,7
224	14,4	3,8	39,6	4,7

ТАБЛИЦА 5

	Клетки HEK293: доза-ответ			
SEQ ID NO:	IC20 [нМ]:	IC50 [нМ]:	IC80 [нМ]:	макс. ингиб. [%]:
200	0,041	0,160	0,666	97,6

201	0,024	0,100	0,455	97,2
254	0,067	0,336	2,109	93,4
232	0,048	0,245	1,589	93,2
248	0,051	0,288	2,401	91,0
206	0,117	0,471	2,584	90,9
231	0,180	0,538	2,096	90,4
253	0,108	0,461	2,788	90,4
239	0,027	0,159	1,463	90,4
238	0,139	0,646	4,794	88,9
272	0,034	0,166	1,294	88,9
247	0,122	0,561	4,144	88,8
264	0,039	0,229	2,434	88,5
252	0,072	0,296	1,951	88,4
218	0,139	0,427	1,944	88,0
236	0,053	0,349	4,780	87,3
257	0,069	0,364	3,671	87,3
274	0,019	0,131	2,077	86,8
250	0,173	0,715	5,683	86,3
227	0,087	0,413	4,046	86,3
281	0,061	0,263	2,224	86,2
185	0,074	0,349	3,802	85,4
223	0,121	0,581	35,387	80,8
224	0,639	1,931	#Н/Д	72,0

ТАБЛИЦА 6

SEQ ID NO:	Макс. ингибирование NRAS	Макс. ингибирование GAPDH	начальный нуклеотид	длина	Ингибирование 20 нМ 2D GAPDH
201	98,45	45,30	181	15	16,86
206	94,95	44,21	620	15	40,87
218	90,00	25,71	176	20	28,11
227	87,95	18,30	378	20	24,56
236*	91,51	40,06	421	20	34,05
239	94,35	37,62	490	20	39,01

252	91,49	29,98	604	20	13,40
264	91,73	26,13	623	20	10,43
272	90,39	40,47	922	20	23,00
274	89,15	35,71	1074	20	24,93
231	93,63	29,21	399	20	36,92
223	85,75	18,44	325	20	20,53
247	90,09	25,35	534	20	25,39
257	91,79	30,55	615	20	21,09
238	90,92	26,33	429	20	22,48
253	94,40	29,34	611	20	40,44
250	88,02	33,44	537	20	27,30
200	98,68	38,68	180	15	33,52
232*	95,91	53,16	400	20	36,10
281	90,44	50,48	1623	20	23,62
248	93,72	37,96	535	20	30,77
254	96,11	32,96	612	20	20,10
273	92,14	54,95	1072	20	26,53

ПРИМЕР 18

Конструирование экзосом

[0663] Для получения экзосом, описанных в настоящем документе, используют клеточную линию эмбриональной почки человека (НЕК) (*например*, HEK293SF). Клетки стабильно трансфицируют каркасом X, каркасом Y и/или якорным фрагментом, связанным с представляющим интерес агентом (*например*, антигеном, адъювантом или иммуномодулятором). Например, экзосомы, экспрессирующие CD40L, могут быть получены путем трансфекции клеток HEK293SF слитыми молекулами CD40L-GFP PTGFRN, которые экспрессируются в виде мономера или в виде форсированного тримера.

[0664] После трансфекции клетки НЕК выращивают до высокой плотности в среде определенного химического состава в течение 7 дней. Кондиционированные среды для культивирования клеток затем собирают и центрифугируют со скоростью $300\text{--}800 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и крупного клеточного дебриса. В супернатант среды добавляют 1000 Ед/л реагента BENZONASE[®] и инкубируют на водяной бане при 37 °C в течение 1 часа. Супернатант собирают и центрифугируют в течение 30 минут со скоростью $16\,000 \times g$ при 4 °C для удаления остаточного клеточного

дебриса и других крупных загрязнителей. Затем супернатант подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при $4\,^{\circ}\text{C}$ для осаждения экзосом. Супернатант удаляют и с помощью аспирации удаляют со дна пробирки все остатки среды. Осадок повторно суспендируют в 200–1000 мкл ФСБ (-Ca - Mg).

[0665] Для дальнейшего обогащения популяций экзосом осадок обрабатывают с помощью очистки в градиенте плотности (сахароза или OPTIPREP™).

[0666] Для отделения фракции экзосом градиент центрифугируют со скоростью $200\,000 \times g$ в течение 16 часов при $4\,^{\circ}\text{C}$ в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti.

[0667] Затем с поверхностного слоя осторожно удаляют слой экзосом, разводят его в ~32,5 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и снова подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при $4\,^{\circ}\text{C}$ для осаждения очищенных экзосом. Полученный осадок повторно суспендируют в минимальном объеме ФСБ (~200 мкл) и хранят при $4\,^{\circ}\text{C}$.

[0668] Для градиента OPTIPREP™ готовят 3-уровневый стерильный градиент с использованием одинаковых объемов 10%, 30% и 45% реагента OPTIPREP™ в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл для ротора SW 41 Ti. Осадок добавляют к градиенту OPTIPREP™ и ультрацентрифугируют со скоростью $200\,000 \times g$ в течение 16 часов при $4\,^{\circ}\text{C}$ для отделения фракции экзосом. Экзосомный слой затем осторожно собирают из верхних ~3 мл из пробирки.

[0669] Фракцию экзосом разводят в ~32 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и подвергают ультрацентрифугированию со скоростью $133\,900 \times g$ в течение 3 часов при $4\,^{\circ}\text{C}$ для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем ресуспендируют в минимальном объеме ФСБ (~200 мкл) и хранят при $4\,^{\circ}\text{C}$ до возможности использования.

ПРИМЕР 19

Эффект структуры линкера ASO на активность и загруженное количество в сконструированные или нативные экзосомы

[0670] Оценивали эффект структуры линкера ASO на количество ASO, загруженное в сконструированные или нативные экзосомы, а также эффект структуры линкера ASO на активность ASO.

[0671] Эффективность загрузки фиксированной последовательности ASO, конъюгированной с различными линкерами, оценивали в сконструированных экзосомах.

Экзосомы, сверхэкспрессирующие PTGFRN, были получены в клетках HEK293 и очищены. Нагрузки ASO загружали на поверхность экзосом путем смешивания. Соответственно, экзосомы в концентрации 1×10^{13} п/мл смешивали в соотношении 1:1 со 100 мкМ ASO с последовательностью люциферазы светлячка (FFLuc), которая была конъюгирована с различными структурами линкеров. Эффективность загрузки рассчитывали как процент начальных ASO, которые связывались с экзосомами. На ФИГ. 25 показаны структуры используемых конструкций. В конструкциях с C1 по C9 использовался липидный якорь холестерин-C6. В конструкциях с T1 по T9 использовался липидный якорь холестерин-ТЭГ. В конструкции L1 использовались липидные якоря холестерин-C8, тогда как в конструкциях L2 и L3 использовался липидный якорь токоферола пальмитат-C6. Другие линкерные компоненты, указанные на ФИГ. 25, представляют собой: фосфодиэфир (PO), фосфотиоат (PS), гексаметилен (C6), триметилен (C3), триэтиленгликоль (ТЭГ) и гексаэтиленгликоль (HEG). Результаты показали, что на количество молекул ASO, загруженных на сконструированную экзосому, влияет структура линкера (ФИГ. 25). В целом, эффективность загрузки была выше для конструкций с якорем холестерин-C6, чем для конструкций с якорем холестерин-ТЭГ. Самую высокую эффективность загрузки 68,78% наблюдали для конструкций с липидным якорем токоферол-C8, которая соответствует загрузке 4167 единиц ASO на экзосому.

[0672] Эффективность загрузки этой же фиксированной последовательности ASO, конъюгированной с различными линкерами, которая оценена на ФИГ. 25 с использованием сконструированных экзосом, также оценивали с использованием нативных экзосом. Нативные экзосомы были получены в клетках HEK293 и очищены. Экзосомы в концентрации 1×10^{13} п/мл смешивали в соотношении 1:1 со 100 мкМ ASO с последовательностью люциферазы светлячка, которая была конъюгирована с различными структурами линкеров. Эффективность загрузки рассчитывали как процент начальных ASO, которые связывались с экзосомами. Как и в случае сконструированных экзосом, на количество молекул ASO, загруженных на нативную экзосому, влияет структура линкера (ФИГ. 26). Снова, конструкции с липидным якорем холестерин-C6 продемонстрировали более высокую эффективность загрузки, чем конструкции с липидным якорем холестерин-ТЭГ. Эффективность загрузки свыше 90% наблюдали для конструкций C2 и C3 (93,6% и 90,67%), что соответствует 5616 и 5440 единицам ASO на экзосому, соответственно. Таким образом, максимальная эффективность загрузки и количество ASO на экзосому были значительно выше для нативных экзосом, чем для сконструированных экзосом.

[0673] Также оценивали активность конструкций, загруженных в нативные экзосомы. Нативные экзосомы были получены в клетках HEK293 и очищены. Экзосомы в

концентрации 1×10^{13} п/мл смешивали в соотношении 1:1 со 100 мкМ ASO с последовательностью люциферазы светлячка, конъюгированной с различными линкерами (см. ФИГ. 25 и 26). Активность *in vitro* конструкций ехoASO оценивали в клетках H1299, экспрессирующих люциферазу светлячка и люциферазу Renilla. Активность измеряли по количеству люминесценции, оставшемуся после инкубации с клетками. Используя T6 (упакованный) в качестве эталона, данные нормализовали к количеству ASO на образец, как измерено с помощью реагента Ribogreen. Активность конструкций C1–C9 (ФИГ. 27A) и конструкций T1–T9 (ФИГ. 27C) была выше, чем конструкций L1–L3 (ФИГ. 27B).

[0674]

[0675] 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.

[0676] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[0677] 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 настоящем документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в настоящем 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.

[0678] 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.

[0679] Содержание всех процитированных ссылок (включая литературные ссылки, патенты, заявки на патенты и веб-сайты), которые могут цитироваться в настоящей заявке, явным образом включены в настоящий 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 (ВАМ – англ.: biologically active molecule), ковалентно связанную с ВВ посредством якорного фрагмента (АМ – англ.: anchoring moiety), причем якорный фрагмент содержит:



Формула (I)

где n является любым целым числом.

2. Внеклеточная везикула по п. 1, в которой n является любым числом от 0 до 10.

3. Внеклеточная везикула по п. 1 или 2, в которой якорный фрагмент содержит стерин, GM1, липид, витамин, малую молекулу, пептид или их комбинацию.

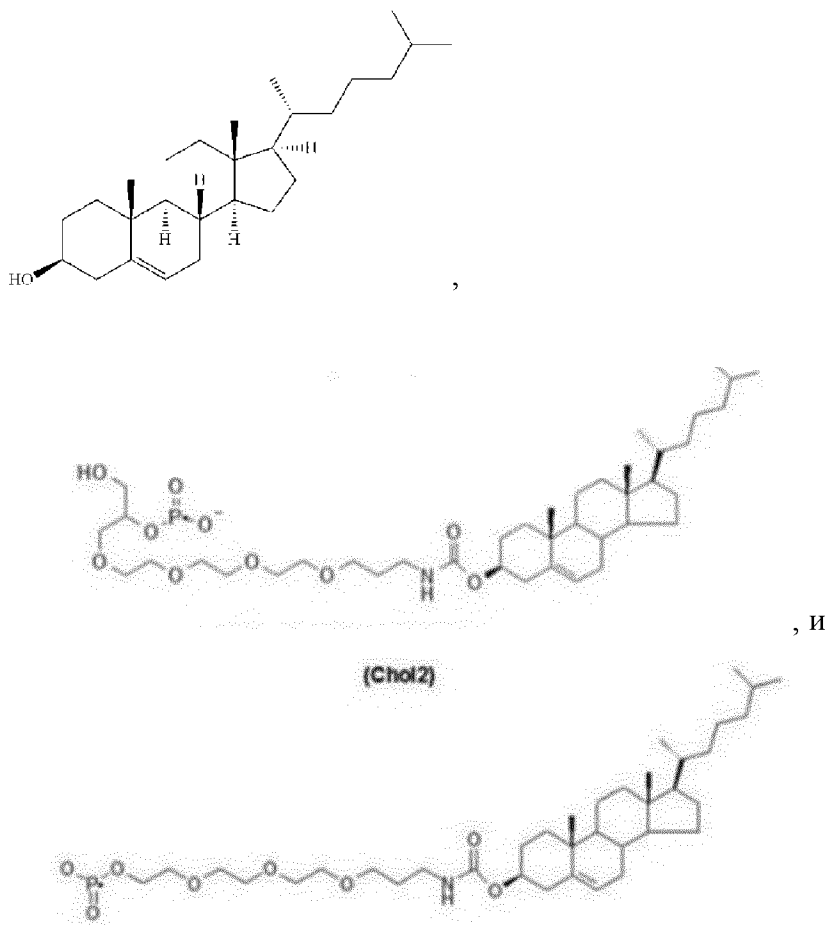
4. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–3, в которой якорный фрагмент содержит по меньшей мере 6 атомов углерода, по меньшей мере 7 атомов углерода, по меньшей мере 8 атомов углерода, по меньшей мере 9 атомов углерода, по меньшей мере 10 атомов углерода, по меньшей мере 11 атомов углерода, по меньшей мере 12 атомов углерода, по меньшей мере 13 атомов углерода, по меньшей мере 14 атомов углерода, по меньшей мере 15 атомов углерода, по меньшей мере 16 атомов углерода, по меньшей мере 17 атомов углерода, по меньшей мере 18 атомов углерода, по меньшей мере 19 атомов углерода, по меньшей мере 20 атомов углерода, по меньшей мере 25 атомов углерода, по меньшей мере 30 атомов углерода, по меньшей мере 35 атомов углерода, по меньшей мере 40 атомов углерода, по меньшей мере 45 атомов углерода, по меньшей мере 50 атомов углерода, по меньшей мере 55 атомов углерода, по меньшей мере 60 атомов углерода, по меньшей мере 65 атомов углерода, по меньшей мере 70 атомов углерода, по меньшей мере 75 атомов углерода, по меньшей мере 80 атомов углерода, по меньшей мере 85 атомов углерода или по меньшей мере 90 атомов углерода.

5. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–4, в которой якорный фрагмент содержит стерин, стероид, гопаноид, гидроксистероид, секостероид, их аналог или любую их комбинацию.

6. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–4, в которой якорный фрагмент содержит эргостерин, 7-дегидрохолестерин, холестерин, 24S-гидроксихолестерин, ланостерин, циклоартенол, фукостерол, сарингостерин, кампестерин, β-ситостерин, ситостанол,

копростанол, авенастерол, стигмастерол или любую их комбинацию.

7. Внеклеточная везикула по п. 6, в которой якорный фрагмент представляет собой холестерин или производное, имеющие структуру, выбранную из группы, состоящей из



8. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, в которой якорный фрагмент содержит стероид, который представляет собой дигидротестостерон, уваол, гецигенин, диосгенин, прогестерон, кортизол или любую их комбинацию.

9. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–4, в которой якорный фрагмент содержит липид.

10. Внеклеточная везикула по п. 9, в которой якорный фрагмент содержит цепь C₂-C₆₀.

11. Внеклеточная везикула по п. 9, в которой якорный фрагмент содержит 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.

12. Внеклеточная везикула по любому из пп. 9–11, в которой якорный фрагмент содержит жирную кислоту с прямой цепью, разветвленную жирную кислоту, ненасыщенную жирную кислоту, мононенасыщенную жирную кислоту, полиненасыщенную жирную кислоту, гидроксильную жирную кислоту, поликарбоновую кислоту или любую их комбинацию.

13. Внеклеточная везикула по п. 12, в которой якорный фрагмент содержит жирную кислоту с прямой цепью, которая представляет собой масляную кислоту, капроновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидоновую кислоту, бегеновую кислоту, лигноцериновую кислоту, гексакозановую кислоту, октакозановую кислоту, триактановую кислоту и н-дотриактановую кислоту, 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, гептакозановая кислота, или любую их комбинацию.

14. Внеклеточная везикула по п. 12, в которой якорный фрагмент содержит разветвленную жирную кислоту, которая представляет собой изомасляную кислоту, изокапроновую кислоту, изокаприловую кислоту, изокаприновую кислоту, изолауриновую кислоту, 11-метилдодекановую кислоту, изомиристиновую кислоту, 13-метилтетрадекановую 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-децилпентадекановую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту, кислоту Fine oxocol 1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.), 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, или любую их комбинацию.

15. Внеклеточная везикула по п. 12, в которой якорный фрагмент содержит ненасыщенную жирную кислоту, которая представляет собой 4-деценую кислоту, капролеиновую кислоту, 4-додеценую кислоту, 5-додеценую кислоту, лауролеевую кислоту, 4-тетрадеценую кислоту, 5-тетрадеценую кислоту, 9-тетрадеценую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, 6-октадеценую кислоту, олеиновую кислоту, 9-октадеценую кислоту, 11-октадеценую кислоту, 9-эйкозеновую кислоту, цис-11-эйкозеновую кислоту, цетолеиновую кислоту, 13-докозеновую кислоту, 15-тетракозеновую кислоту, 17-гексакозеновую кислоту, 6,9,12,15-гексадекатетраеновую 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 или любую их комбинацию.

16. Внеклеточная везикула по п. 12, в которой якорный фрагмент содержит гидроксигирную кислоту, которая представляет собой α -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксимиристиновую кислоту, α -гидроксипальмитиновую кислоту, α -гидроксистеариновую кислоту, ω -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксиарахиновую кислоту, 9-гидрокси-12-октадеценую кислоту, рицинолевую кислоту, α -гидроксибегеновую кислоту, 9-гидрокси-транс-10,12-октадекадиеновую кислоту, камолоновую кислоту, ипуроловую кислоту, 9,10-дигидроксистеариновую кислоту, 12-гидроксистеариновую кислоту или любую их комбинацию.

17. Внеклеточная везикула по п. 12, в которой якорный фрагмент содержит поликарбоновую кислоту, которая представляет собой щавелевую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, адипиновую кислоту, пимелиновую кислоту, субериновую кислоту, азелаиновую кислоту, себациновую кислоту, D,L-яблочную кислоту или любую их комбинацию.

18. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–4, в которой якорный фрагмент содержит

фосфолипид.

19. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидовую кислоту, 2 лизофосфатидилхолин, сфингомиелин или любую их комбинацию.

20. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидилэтаноламины, которые представляют собой дилауроилфосфатидилэтаноламин, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, дистеароилфосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилэтаноламин, диерукоилфосфатидилэтаноламин или любую их комбинацию.

21. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидилглицерин, который представляет собой дилауроилфосфатидилглицерин, димиристоилфосфатидилглицерин, дипальмитоилфосфатидилглицерин, дистеароилфосфатидилглицерин, диолеилфосфатидилглицерин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилглицерин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилглицерин, диерукоилфосфатидилглицерин или любую их комбинацию.

22. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидилсерин, который представляет собой дилауроилфосфатидилсерин, димиристоилфосфатидилсерин, дипальмитоилфосфатидилсерин, дистеароилфосфатидилсерин, диолеилфосфатидилсерин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилсерин, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилсерин, диерукоилфосфатидилсерин или любую их комбинацию.

23. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидную кислоту, которая представляет собой дилауроилфосфатидную кислоту, димиристоилфосфатидную кислоту, дипальмитоилфосфатидную кислоту, дистеароилфосфатидную кислоту, диолеилфосфатидную кислоту, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидную кислоту, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидную кислоту, диерукоилфосфатидную кислоту или любую их комбинацию.

24. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой фосфатидилинозитол, который представляет собой дилауроилфосфатидилинозитол, димиристоилфосфатидилинозитол, дипальмитоилфосфатидилинозитол, дистеароилфосфатидилинозитол, диолеилфосфатидилинозитол, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилинозитол, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилинозитол, диерукоилфосфатидилинозитол или любую их комбинацию.

25. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой симметричный фосфолипид, который представляет собой 1,2-дипропионил-sn-глицеро-3-фосфохолин (03:0 PC); 1,2-дибутирил-sn-глицеро-3-фосфохолин (04:0 PC); 1,2-дипентаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (05:0 PC); 1,2-дигексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (06:0 PC); 1,2-дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (07:0 PC); 1,2-диоктаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (08:0 PC); 1,2-динонаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (09:0 PC); 1,2-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (10:0 PC); 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (11:0 PC, DUPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (12:0 PC); 1,2-дитридеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (13:0 PC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0 PC, DMPC); 1,2-дипентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (15:0 PC); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0 PC, DPPC); 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (4ME 16:0 PC); 1,2-дигептадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (17:0 PC); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 PC, DSPC); 1,2-динонадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (19:0 PC); 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:0 PC); 1,2-дигенаарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (21:0 PC); 1,2-дибегеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:0 PC); 1,2-дитрикозаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (23:0 PC); 1,2-дилигноцериол-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:0 PC); 1,2-димиристолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:1 (Δ9-цис) PC); 1,2-димиристелаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:1 (Δ9-транс) PC); 1,2-дипальмитолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:1 (Δ9-цис) PC); 1,2-дипальмителаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:1 (Δ9-транс) PC); 1,2-дипетроселеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ6-цис) PC); 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ9-цис) PC, DOPC); 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 (Δ9-транс) PC); 1,2-дилинолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:2 (цис) PC, DLPC); 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:3 (цис) PC, DLnPC); 1,2-дизйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:1 (цис) PC); 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:4 (цис) PC, DAPC); 1,2-диерукоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:1 (цис) PC); 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:6 (цис) PC, DHAPC); 1,2-динервоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:1 (цис) PC); 1,2-дигексаноил-sn-глицеро-3-

фосфоэтаноламин (06:0 PE); 1,2-диоктаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (08:0 PE); 1,2-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (10:0 PE); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (12:0 PE); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (14:0 PE); 1,2-дипентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (15:0 PE); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (16:0 PE); 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (4ME 16:0 PE); 1,2-дигептадеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (17:0 PE); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:0 PE, DSPE); 1,2-дипальмитолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (16:1 PE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:1 (Δ9-цис) PE, DOPE); 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:1 (Δ9-транс) PE); 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:2 PE, DLPE); 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (18:3 PE, DLnPE); 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (20:4 PE, DAPE); 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (22:6 PE, DHAPE); 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 Diether PC); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевую соль (DOPG) или любую их комбинацию.

26. Внеклеточная везикула по п. 18, в которой фосфолипид представляет собой асимметричный фосфолипид, который представляет собой 1-миристоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0-16:0 PC, MPPC); 1-миристоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0-18:0 PC, MSPC); 1-пальмитоил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-02:0 PC); 1-пальмитоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-14:0 PC, PMPC); 1-пальмитоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:0 PC, PSPC); 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:1 PC, POPC); 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-18:2 PC, PLPC); 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0-20:4 PC); 1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0-22:6 PC); 1-стеароил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-14:0 PC, SMPC); 1-стеароил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-16:0 PC, SPPC); 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-18:1 PC, SOPC); 1-стеароил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-18:2 PC); 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-20:4 PC); 1-стеароил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0-22:6 PC); 1-олеоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-14:0 PC, OMPC); 1-олеоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-16:0 PC, OPPC); 1-олеоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-18:0 PC, OSPC); 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (16:0-18:1 PE, POPE); 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (16:0-18:2 PE); 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-

фосфозтаноламин (16:0-20:4 PE); 1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0-22:6 PE); 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-18:1 PE); 1-стеароил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-18:2 PE); 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-20:4 PE); 1-стеароил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0-22:6 PE); 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (OChemsPC) или любую их комбинацию.

27. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой фосфолипид представляет собой лизолипид.

28. Внеклеточная везикула по п. 27, в которой фосфолипид представляет собой лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол, лизофосфатидилсерин или любую их комбинацию.

29. Внеклеточная везикула по п. 27, в которой фосфолипид представляет собой 1-гексаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (06:0 лизо PC); 1-гептаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (07:0 лизо PC); 1-октаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (08:0 лизо PC); 1-нонаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (09:0 лизо PC); 1-деканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (10:0 лизо PC); 1-ундеканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (11:0 лизо PC); 1-лауроил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (12:0 лизо PC); 1-тридеканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (13:0 лизо PC); 1-миристоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (14:0 лизо PC); 1-пентадеканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (15:0 лизо PC); 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (16:0 лизо PC); 1-гептадеканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (17:0 лизо PC); 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 лизо PC); 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1 лизо PC); 1-нонадеканойл-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (19:0 лизо PC); 1-арахидоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (20:0 лизо PC); 1-бегеноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (22:0 лизо PC); 1-лигноцериол-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (24:0 лизо PC); 1-гексакозаноил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (26:0 лизо PC); 1-миристоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (14:0 лизо PE); 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (16:0 лизо PE); 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин (18:0 лизо PE); 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-

фосфоэтаноламин (18:1 лизо PE); 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C16 лизо PC) или любую их комбинацию.

30. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, в которой якорный фрагмент содержит витамин.

31. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, в которой якорный фрагмент содержит витамин D, витамин K, витамин E или любую их комбинацию.

32. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–31, в которой якорный фрагмент дополнительно содержит линкер между биологически активной молекулой и якорным фрагментом.

33. Внеклеточная везикула по п. 32, в которой линкер содержит нерасщепляемый линкер.

34. Внеклеточная везикула по п. 33, в которой нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), глицерин, алкил, сукцинимид, малеимид или любую их комбинацию.

35. Внеклеточная везикула по п. 33, в которой нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), характеризуемый формулой $R_3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или $R_3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$, где R_3 представляет собой водород, метил или этил, а n является целым числом от 2 до 200.

36. Внеклеточная везикула по п. 33, в которой нерасщепляемый линкер содержит диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), гексаэтиленгликоль (HEG), пентаэтиленгликоль или любую их комбинацию.

37. Внеклеточная везикула по любому из пп. 32–34, в которой линкер содержит полиглицерин (PG), имеющий формулу $((R_3-O-(CH_2-CH(OH)-CH_2O)_n-)$, где R_3 представляет собой водород, метил или этил, а n является целым числом от 3 до 200.

38. Внеклеточная везикула по любому из пп. 32–34, в которой линкер содержит диглицерин, триглицерин, тетраглицерин (TG), пентаглицерин, гексаглицерин (HG) или

любую их комбинацию.

39. Внеклеточная везикула по любому из пп. 32–34, в которой линкер содержит алкил.

40. Внеклеточная везикула по любому из пп. 32–34, в которой линкер содержит алкенил, алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкинилалкил, алкинилалкенил, алкинилалкенил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил или любую их комбинацию.

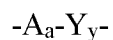
41. Внеклеточная везикула по п. 32, в которой линкер содержит расщепляемый линкер.

42. Внеклеточная везикула по п. 41, в которой расщепляемый линкер представляет собой линкер, расщепляемый окислительно-восстановительным методом, линкер, расщепляемый реактивными формами кислорода, pH-зависимый расщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, линкер, расщепляемый протеазой, линкер, расщепляемый эстеразой, линкер, расщепляемый фосфатазой, фотоактивированный расщепляемый линкер, саморасщепляющийся линкер или любую их комбинацию.

43. Внеклеточная везикула по п. 41, в которой расщепляемый линкер представляет собой саморасщепляющийся линкер.

44. Внеклеточная везикула по п. 41, в которой расщепляемый линкер представляет собой циннамильную группу, нафтильную группу, бифенильную группу, гетероциклическое кольцо, гомоароматическую группу, кумарин, фуран, тиофен, тиазол, оксазол, изоксазол, пиррол, пиразол, пиридин, имидазон, триазол или любую их комбинацию.

45. Внеклеточная везикула по любому из пп. 41–44, в которой линкер имеет формулу:



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

46. Внеклеточная везикула по п. 45, в которой –A_a– представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид.

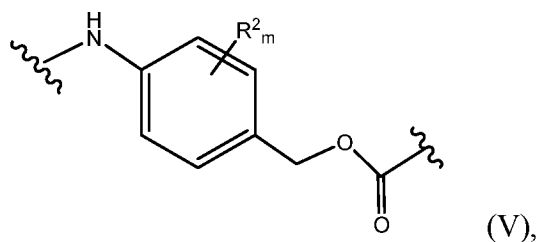
47. Внеклеточная везикула по п. 46, в которой а равно 2 и –A_a– выбран из группы, состоящей из валин-аланина, валин-цитруллина, фенилаланин-лизина, N-метилвалин-цитруллина, циклогексилаланин-лизина и бета-аланин-лизина.

48. Внеклеточная везикула по п. 46, в которой указанный –A_a– представляет собой валин-аланин или валин-цитруллин.

49. Внеклеточная везикула по любому из пп. 45–48, в которой у равно 1.

50. Внеклеточная везикула по любому из пп. 45–49, в которой –Y– представляет собой саморасщепляющийся спейсер.

51. Внеклеточная везикула по п. 50, в которой –Y_y– имеет формулу (V):



где каждый R² независимо представляет собой C₁₋₈ алкил, -O-(C₁₋₈ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4.

52. Внеклеточная везикула по п. 51, в которой m равно 0, 1 или 2.

53. Внеклеточная везикула по п. 51, в которой m равно 0.

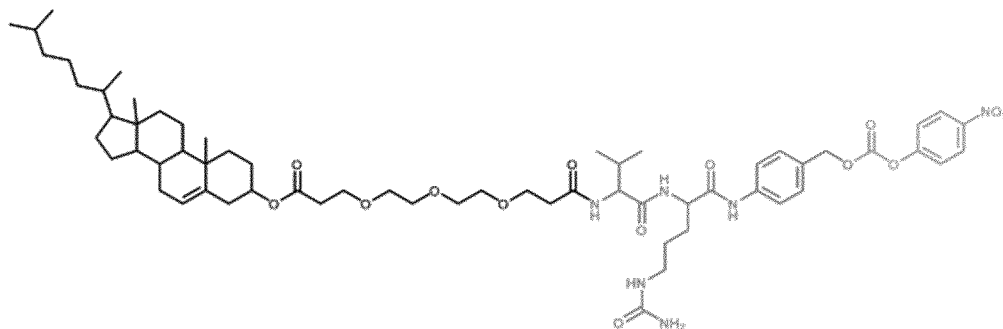
54. Внеклеточная везикула по любому из пп. 45–53, в которой расщепляемый линкер

представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

55. Внеклеточная везикула по любому из пп. 45–49, в которой –Y- представляет собой несаморасщепляющийся спейсер.

56. Внеклеточная везикула по п. 55, в которой несаморасщепляющийся спейсер представляет собой –Gly- или –Gly-Gly-.

57. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–4, в которой якорный фрагмент содержит:



58. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, которая содержит (i) якорный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 301–334 и 401–567, и (ii) линкер, выбранный из линкерных комбинаций из таблицы 1 или таблицы 2.

59. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, в которой якорный фрагмент содержит каркасный белок.

60. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–59, дополнительно содержащая каркасный фрагмент.

61. Внеклеточная везикула по п. 59 или 60, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас X.

62. Внеклеточная везикула по п. 61, в которой каркас X выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена суперсемейства иммуноглобулинов 2 (белок IGSF2); члена суперсемейства иммуноглобулинов 3 (белок IGSF3); члена суперсемейства иммуноглобулинов 8 (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4

(белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4); их функционального фрагмента и любой их комбинации.

63. Внеклеточная везикула по п. 61, в которой каркас X представляет собой белок PTGFRN или его функциональный фрагмент.

64. Внеклеточная везикула по п. 61, в которой каркас X содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:302.

65. Внеклеточная везикула по п. 61, в которой каркас X содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO:302.

66. Внеклеточная везикула по п. 59 или 60, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас Y.

67. Внеклеточная везикула по п. 66, в которой каркас Y представляет собой каркасный белок, который способен прикреплять биологически активную молекулу к поверхности просвета внеклеточной везикулы и/или к внешней поверхности внеклеточной везикулы.

68. Внеклеточная везикула по п. 66 или 67, в которой каркас Y выбран из группы, состоящей из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C (белок MARCKS); миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C типа 1 (белок MARCKSL1); кислоторастворимого белка головного мозга 1 (белок BASP1), их функционального фрагмента и любой их комбинации.

69. Внеклеточная везикула по любому из пп. 66–68, в которой каркас Y представляет собой белок BASP1 или его функциональный фрагмент.

70. Внеклеточная везикула по любому из пп. 66–69, в которой каркас Y содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета BB.

71. Внеклеточная везикула по п. 70, в которой ND связан с поверхностью просвета экзосомы посредством миристоилирования.
72. Внеклеточная везикула по п. 70 или 71, в которой ED связан с поверхностью просвета экзосомы посредством ионного взаимодействия.
73. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–72, в которой ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более основных аминокислот в последовательности, при этом основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg, His и любой их комбинации.
74. Внеклеточная везикула по п. 73, в которой основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 10.
75. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–74, в которой ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: XX), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: XX) или любую их комбинацию.
76. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–75, в которой ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой Gly; где «:» представляет собой пептидную связь; где каждый из X2–X6 независимо представляет собой аминокислоту и где X6 включает основную аминокислоту.
77. Внеклеточная везикула по п. 76, в которой:
- (i) X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
 - (ii) X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
 - (iii) X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
 - (iv) X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His; или
 - (v) любой комбинации из (i)–(iv).

78. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–77, в которой ND содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где

- (i) G представляет собой Gly;
- (ii) «:» представляет собой пептидную связь;
- (iii) X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X3 представляет собой аминокислоту;
- (v) X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- (vi) X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и
- (vii) X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

79. Внеклеточная везикула по любому из пп. 76–78, в которой X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

80. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–79, в которой ND и ED соединены посредством линкера.

81. Внеклеточная везикула по п. 80, в которой линкер содержит одну или более аминокислот.

82. Способ по любому из пп. 70–81, в котором ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414), (v) GGKLSK (SEQ ID NO: 415) или (vi) любой их комбинации.

83. Внеклеточная везикула по п. 82, в которой ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

84. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–83, в которой ND содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 411).

85. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–84, в которой каркас Y имеет длину по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот.

86. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–85, в которой каркас Y содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

87. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–85, в которой каркас Y состоит из (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

88. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–87, в которой каркас Y не содержит Met на N-конце.
89. Внеклеточная везикула по любому из пп. 70–88, в которой каркас Y содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка.
90. Внеклеточная везикула по п. 89, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркаса Y представляет собой Gly.
91. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–90, в которой биологически активная молекула связана с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ.
92. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–90, в которой биологически активная молекула связана с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ.
93. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–92, в которой биологически активная молекула представляет собой полипептид, пептид, полинуклеотид (ДНК и/или РНК), химическое соединение или любую их комбинацию.
94. Внеклеточная везикула по п. 93, в которой биологически активная молекула представляет собой химическое соединение.
95. Внеклеточная везикула по п. 94, в которой химическое соединение представляет собой малую молекулу.
96. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–95, в которой биологически активная молекула содержит антисмысловой олигонуклеотид (ASO), миРНК, микроРНК, кшРНК, нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.
97. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–96, в которой биологически активная молекула содержит пептид, белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или любую их комбинацию.

98. Внеклеточная везикула по п. 97, в которой его антигенсвязывающий фрагмент содержит фрагмент scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₁₂, Fv, dAb и Fd, диатела, связанный с антителом полипептид или любой их фрагмент.
99. Внеклеточная везикула по п. 96, в которой биологически активная молекула содержит ASO.
100. Внеклеточная везикула по п. 99, в которой ASO нацелен на транскрипт.
101. Внеклеточная везикула по п. 100, в которой транскрипт представляет собой транскрипт *STAT6*, транскрипт *CEBP/β*, транскрипт *STAT3*, транскрипт *KRAS*, транскрипт *NRAS*, транскрипт *NLPR3*, транскрипт *PMP22* или любую их комбинацию.
102. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *STAT6* содержит SEQ ID NO: 13.
103. Внеклеточная везикула по п. 102, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 601–SEQ ID NO: 703.
104. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *CEBP/β* содержит SEQ ID NO: 23.
105. Внеклеточная везикула по п. 104, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704–SEQ ID NO: 806.
106. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *STAT3* содержит SEQ ID NO: 43.
107. Внеклеточная везикула по п. 106, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 889–SEQ ID NO: 988.
108. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *NRAS* содержит SEQ ID NO: 53.
109. Внеклеточная везикула по п. 108, в которой ASO содержит последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 989–SEQ ID NO: 1088.

110. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *NLPR3* содержит SEQ ID NO: 3.

111. Внеклеточная везикула по п. 110, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101–SEQ ID NO: 200.

112. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *KRAS* представляет собой транскрипт мутанта *KRAS*.

113. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой мутант *KRAS* представляет собой G12D *KRAS*.

114. Внеклеточная везикула по п. 112, в которой транскрипт *KRAS* содержит SEQ ID NO: 32.

115. Внеклеточная везикула по п. 114, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 807–SEQ ID NO: 888.

116. Внеклеточная везикула по п. 101, в которой транскрипт *PMP22* содержит SEQ ID NO: 58.

117. Внеклеточная везикула по п. 116, в которой ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62–95 и 201–270.

118. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–117, в которой ВВ представляет собой экзосому.

119. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому из пп. 1–118 и фармацевтически приемлемый носитель.

120. Способ конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ, включающий в себя связывание якорного фрагмента с ВВ.

121. Набор, содержащий ВВ по любому из пп. 1–118 и инструкцию по применению.
122. Набор, содержащий реагенты для конъюгирования биологически активной молекулы с ВВ и инструкцию по проведению конъюгации, за счет чего образуется ВВ по любому из пп. 1–118.
123. Способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту ВВ по любому из пп. 1–118.
124. Способ по п. 121, в котором заболевание или нарушение представляет собой рак, воспалительное нарушение, нейродегенеративное нарушение, заболевание центральной нервной системы или нарушение обмена веществ.
125. Способ по п. 121 или 122, в котором ВВ вводят внутривенно, внутривентриально, назально, перорально, внутримышечно, подкожно, парентерально или внутриопухолевого.

Фиг. 1А

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	Положение мРНК (SEQ ID NO: 3)	
				Начало	Конец
ASO-NLRP3-206	GGCTCGATCCAGGAGTGTGT	101	20	206	225
ASO-NLRP3-208	TTGGCTCGATCCAGGAGTGT	102	20	208	227
ASO-NLRP3-214	CTCCTGTTGGCTCGATCCAG	103	20	214	233
ASO-NLRP3-748	GCGGGTGCTTGCCATCTTCA	104	20	748	767
ASO-NLRP3-825	GGATAGTCCTCTAAGTGCAT	105	20	825	844
ASO-NLRP3-892	GGCTAGATCCACATGGTCTG	106	20	892	911
ASO-NLRP3-898	TAGCGTGGCTAGATCCACAT	107	20	898	917
ASO-NLRP3-899	TTAGCGTGGCTAGATCCACA	108	20	899	918
ASO-NLRP3-900	ATTAGCGTGGCTAGATCCAC	109	20	900	919
ASO-NLRP3-902	TCATTAGCGTGGCTAGATCC	110	20	902	921
ASO-NLRP3-903	ATCATTAGCGTGGCTAGATC	111	20	903	922
ASO-NLRP3-954	GCGAAGATCCACACGGCCAT	112	20	954	973
ASO-NLRP3-960	ATCGCAGCGAAGATCCACAC	113	20	960	979
ASO-NLRP3-964	GTTGATCGCAGCGAAGATCC	114	20	964	983
ASO-NLRP3-966	CTGTTGATCGCAGCGAAGAT	115	20	966	985
ASO-NLRP3-969	CTCCTGTTGATCGCAGCGAA	116	20	969	988
ASO-NLRP3-970	TCTCCTGTTGATCGCAGCGA	117	20	970	989
ASO-NLRP3-971	CTCTCCTGTTGATCGCAGCG	118	20	971	990
ASO-NLRP3-1016	CTGAACCCCACTTCGGCTCA	119	20	1016	1035
ASO-NLRP3-1021	ATTATCTGAACCCCACTTCG	120	20	1021	1040
ASO-NLRP3-1028	CACGTGCATTATCTGAACCC	121	20	1028	1047
ASO-NLRP3-1103	TCGAAAGGTACTCCAGTAAA	122	20	1103	1122
ASO-NLRP3-1108	GATTCTCGAAAGGTACTCCA	123	20	1108	1127
ASO-NLRP3-1113	ATAGAGATTCTCGAAAGGTA	124	20	1113	1132
ASO-NLRP3-1159	CACGTACTTTCTGTACTTCT	125	20	1159	1178
ASO-NLRP3-1173	TGGAATCTGCTTCTCACGTA	126	20	1173	1192
ASO-NLRP3-1197	CGGGCATTCCTGTCTTCAAT	127	20	1197	1216
ASO-NLRP3-1204	ACCCAGACGGGCATTCCTGT	128	20	1204	1223
ASO-NLRP3-1227	CGTTTGTGAGGCTCACACT	129	20	1227	1246
ASO-NLRP3-1232	TGTAGCGTTTGTGAGGCTC	130	20	1232	1251
ASO-NLRP3-1239	AGTCGTGTGTAGCGTTTGTT	131	20	1239	1258
ASO-NLRP3-1240	CAGTCGTGTGTAGCGTTTGT	132	20	1240	1259
ASO-NLRP3-1241	GCAGTCGTGTGTAGCGTTTG	133	20	1241	1260
ASO-NLRP3-1242	CGCAGTCGTGTGTAGCGTTT	134	20	1242	1261
ASO-NLRP3-1313	ACGTCTTGGTCTTGCCGATG	135	20	1313	1332
ASO-NLRP3-1314	CACGTCTTGGTCTTGCCGAT	136	20	1314	1333
ASO-NLRP3-1341	ATCTTAATGGGACTCACGGG	137	20	1341	1360
ASO-NLRP3-1343	CCATCTTAATGGGACTCACG	138	20	1343	1362
ASO-NLRP3-1346	ACTCCATCTTAATGGGACTC	139	20	1346	1365
ASO-NLRP3-1491	TAGTCAAACCTGTCTTG GTA	140	20	1491	1510
ASO-NLRP3-1561	GCTCATGATCAGGTCCCCCA	141	20	1561	1580
ASO-NLRP3-1568	GGCAGCAGCTCATGATCAGG	142	20	1568	1587

Фиг. 1А (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	Положение мРНК (SEQ ID NO:3)	
				Начало	Конец
ASO-NLRP3-1664	CGTCAAAGGCACCTTGCAGC	143	20	1664	1683
ASO-NLRP3-1670	TGTGCTCGTCAAAGGCACCT	144	20	1670	1689
ASO-NLRP3-1676	GTCCTATGTGCTCGTCAAAG	145	20	1676	1695
ASO-NLRP3-1678	CGGTCCTATGTGCTCGTCAA	146	20	1678	1697
ASO-NLRP3-1680	AGCGGTCCTATGTGCTCGTC	147	20	1680	1699
ASO-NLRP3-1681	GAGCGGTCCTATGTGCTCGT	148	20	1681	1700
ASO-NLRP3-1682	AGAGCGGTCCTATGTGCTCG	149	20	1682	1701
ASO-NLRP3-1688	CAGTGCAGAGCGGTCCTATG	150	20	1688	1707
ASO-NLRP3-1693	CCAGTCAGTGCAGAGCGGTC	151	20	1693	1712
ASO-NLRP3-1704	TCGGCCTTCTGCCAGTCAGT	152	20	1704	1723
ASO-NLRP3-1718	GAATGTCTCCCCGCTCGGCC	153	20	1718	1737
ASO-NLRP3-1720	GAGAATGTCTCCCCGCTCGG	154	20	1720	1739
ASO-NLRP3-1723	CAGGAGAATGTCTCCCCGCT	155	20	1723	1742
ASO-NLRP3-1837	GATCTCCACATGCCGAGGAT	156	20	1837	1856
ASO-NLRP3-1932	TTCTCCTGAATCAGACTGAA	157	20	1932	1951
ASO-NLRP3-1993	CAGTCCAGTGCACACGATCC	158	20	1993	2012
ASO-NLRP3-2325	TACATGGCGGCAAGAACTC	159	20	2325	2344
ASO-NLRP3-2432	CGAATTTGCCATAGTTTTCC	160	20	2432	2451
ASO-NLRP3-2472	CCAAAGAGGAAACGTACAAC	161	20	2472	2491
ASO-NLRP3-2543	GCCTGATTTGCTGAGAGATC	162	20	2543	2562
ASO-NLRP3-2638	CATCTCGTACAAACAGTAGA	163	20	2638	2657
ASO-NLRP3-2639	GCATCTCGTACAAACAGTAG	164	20	2639	2658
ASO-NLRP3-2667	ATGGCCCTTTGCACGAAGTC	165	20	2667	2686
ASO-NLRP3-2672	AGTCCATGGCCCTTTGCACG	166	20	2672	2691
ASO-NLRP3-2699	AGAGATTGATCTCAATCTTG	167	20	2699	2718
ASO-NLRP3-2750	GATGACAGTTCTCAATGCAA	168	20	2750	2769
ASO-NLRP3-2755	CACCCGATGACAGTTCTCAA	169	20	2755	2774
ASO-NLRP3-2760	GACTCCACCCGATGACAGTT	170	20	2760	2779
ASO-NLRP3-2830	AAGGTGTGCGGCCTTCCTTTT	171	20	2830	2849
ASO-NLRP3-2836	CATATCAAGGTGTCGGCCTT	172	20	2836	2855
ASO-NLRP3-3087	CAGCACTCATGCGAGAGGCC	173	20	3087	3106
ASO-NLRP3-3094	GTCGAAGCAGCACTCATGCG	174	20	3094	3113
ASO-NLRP3-3109	GAGGACCAAGGAGATGTGCA	175	20	3109	3128
ASO-NLRP3-3120	TGGTTGCTGCTGAGGACCAA	176	20	3120	3139
ASO-NLRP3-3212	GATTGCACAACAGGTGCTTC	177	20	3212	3231
ASO-NLRP3-3476	GGTGCGTGAGATTCTGATTA	178	20	3476	3495
ASO-NLRP3-3481	GTAAAGGTGCGTGAGATTCT	179	20	3481	3500
ASO-NLRP3-3488	CTCGCAGGTAAAGGTGCGTG	180	20	3488	3507
ASO-NLRP3-3489	CCTCGCAGGTAAAGGTGCGT	181	20	3489	3508
ASO-NLRP3-3493	GTTGCCTCGCAGGTAAAGGT	182	20	3493	3512
ASO-NLRP3-3498	AGAGTGTTGCCTCGCAGGTA	183	20	3498	3517

Фиг. 1А (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	Положение мРНК (SEQ ID NO:3)	
				Начало	Конец
ASO-NLRP3-3502	TCCGAGAGTGTTGCCTCGCA	185	20	3502	3521
ASO-NLRP3-3503	CTCCGAGAGTGTTGCCTCGC	186	20	3503	3522
ASO-NLRP3-3504	TCTCCGAGAGTGTTGCCTCG	187	20	3504	3523
ASO-NLRP3-3508	CTTGTCTCCGAGAGTGTTGC	188	20	3508	3527
ASO-NLRP3-3514	GATCCCCTTGTTCTCCGAGAG	189	20	3514	3533
ASO-NLRP3-3561	ACCTGAAGCTTGCAGTCGGG	190	20	3561	3580
ASO-NLRP3-3580	GCAGTTGTCTAATTCCAACA	191	20	3580	3599
ASO-NLRP3-3585	AGGTTGCAGTTGTCTAATTC	192	20	3585	3604
ASO-NLRP3-3593	GTGACGTGAGGTTGCAGTTG	193	20	3593	3612
ASO-NLRP3-3598	GCAGTGTGACGTGAGGTTGC	194	20	3598	3617
ASO-NLRP3-3652	GCTCAGCTTTCGCAGGCTCT	195	20	3652	3671
ASO-NLRP3-3676	GTCGCCCAGGTCATTGTTGC	196	20	3676	3695
ASO-NLRP3-3690	ATCATGACCCCCAGGTCGCC	197	20	3690	3709
ASO-NLRP3-4096	ACATCCTCTAACTGAGGCGC	198	20	4096	4115
ASO-NLRP3-4105	CCAAGAGGAACATCCTCTAA	199	20	4105	4124
ASO-NLRP3-4256	GTTATGGTCAGTTAATAGAA	200	20	4256	4275

Фиг. 1В

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэпмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1053	CTGGTGACGAGGGTT	601	15	CbsTbsGbsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdsdGsdAsdGsdGsGbsTbsTb	1053	1067
ASO-STAT6-1359	CGCTCACACCGCTTG	602	15	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdsAs(5MdC)sdsAs(5MdC)s(5MdC)sdsGs(5MdC)sTbsTbsGb	1359	1373
ASO-STAT6-1890	AGGCTAGTAACGTAC	603	15	AbsGbsGbs(5MdC)sdsTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdsGsTbsAbsCb	1890	1904
ASO-STAT6-1892	GAAGGCTAGTAACGT	604	15	GbsAbsAbsdGsdGs(5MdC)sdsTsdAsdGsdTsdAsdAsCbsGbsTb	1892	1906
ASO-STAT6-1915	GGTTCGGTCGGGCTC	605	15	GbsGbsTbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsdTs(5MdC)sdsGsdGsdGsCbsTbsCb	1915	1929
ASO-STAT6-1916	AGGTTCCGTCGGGCT	606	15	AbsGbsGbsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsdTs(5MdC)sdsGsdGsGbsCbsTb	1916	1930
ASO-STAT6-1917	AAGTTCCGTCGGGC	607	15	AbsAbsGbsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsdTs(5MdC)sdsGsGbsGbsCb	1917	1931
ASO-STAT6-1918	AAAGTTCCGTCGGG	608	15	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsdTs(5MdC)sGbsGbsGb	1918	1932
ASO-STAT6-1919	GAAAGTTCCGTCGG	609	15	GbsAbsAbsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsdTsCbsGbsGb	1919	1933
ASO-STAT6-1920	AGAAAGTTCCGTGG	610	15	AbsGbsAbsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdsGsTbsCbsGb	1920	1934
ASO-STAT6-1937	AGTCGCTGAAGCGGA	611	15	AbsGbsTbs(5MdC)sdsGs(5MdC)sdsTsdGsdAsdAsdGs(5MdC)sGbsGbsAb	1937	1951
ASO-STAT6-1938	GAGTCGCTGAAGCGG	612	15	GbsAbsGbsdTs(5MdC)sdsGs(5MdC)sdsTsdGsdAsdAsdGsCbsGbsGb	1938	1952
ASO-STAT6-2061	CGGATTCGGTCCCC	613	15	CbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)sdsGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)sCbsCbsCb	2061	2075
ASO-STAT6-2062	CCGGATTCGGTCCCC	614	15	CbsCbsGbsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdsGsdGsdTs(5MdC)sCbsCbsCb	2062	2076
ASO-STAT6-2063	CCCGGATTCGGTCCC	615	15	CbsCbsCbsdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdsGsdGsdTsCbsCbsCb	2063	2077
ASO-STAT6-2064	TCCCGGATTCGGTCC	616	15	TbsCbsCbs(5MdC)sdsGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdsGsdGsTbsCbsCb	2064	2078
ASO-STAT6-2066	GATCCCGGATTCGGT	617	15	GbsAbsTbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdsGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2080

Фиг. 1В (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэнмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-2067	AGATCCCGGATTCGG	618	15	AbsGbsAbsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTsCbsGbsGb	2067	2081
ASO-STAT6-2068	AAGATCCCGGATTCG	619	15	AbsAbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTsCbsGb	2068	2082
ASO-STAT6-2352	TGATACGGGGGGATG	620	15	TbsGbsAbsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2352	2366
ASO-STAT6-3073	CGTGTGCGCGCTGCA	621	15	CbsGbsTbsdGsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsGbsCbsAb	3073	3087
ASO-STAT6-1053	ACTGGTGACGAGGGTT	622	16	AbsCbsTbsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsdGsGbsTbsTb	1053	1068
ASO-STAT6-1054	AACTGGTGACGAGGGT	623	16	AbsAbsCbsdTsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsGbsGbsTb	1054	1069
ASO-STAT6-1356	CTCACACCGCTTGATC	624	16	CbsTbsCbsdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsdGsAbsTbsCb	1356	1371
ASO-STAT6-1847	CGGTCAGACCAGTAGC	625	16	CbsGbsGbsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsdTsAbsGbsCb	1847	1862
ASO-STAT6-1886	CTAGTAACGTAAGTT	626	16	CbsTbsAbsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsGbsTbsTb	1886	1901
ASO-STAT6-1887	GCTAGTAACGTAAGT	627	16	GbsCbsTbsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sTbsGbsTb	1887	1902
ASO-STAT6-1888	GGCTAGTAACGTAAG	628	16	GbsGbsCbsdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAsCbsTbsGb	1888	1903
ASO-STAT6-1889	AGGCTAGTAACGTAAG	629	16	AbsGbsGbs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsAbsCbsTb	1889	1904
ASO-STAT6-1890	AAGGCTAGTAACGTAC	630	16	AbsAbsGbsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsTbsAbsCb	1890	1905
ASO-STAT6-1893	AAGAAGGCTAGTAACG	631	16	AbsAbsGbsdAsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsAbsCbsGb	1893	1908
ASO-STAT6-1917	AAAGGTTCCGTCGGGC	632	16	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsGbsCb	1917	1932
ASO-STAT6-1919	AGAAAGGTTCCGTCGG	633	16	AbsGbsAbsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	1919	1934
ASO-STAT6-2056	TTCGGTCCCCCAGTGA	634	16	TbsTbsCbsdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsTbsGbsAb	2056	2071

Фиг. 1В (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэнмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-2060	CGGATTCGGTCCCCCA	635	16	CbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sCbsCbsAb	2060	2075
ASO-STAT6-2066	AGATCCCGGATTCGGT	636	16	AbsGbsAbsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2081
ASO-STAT6-2070	AGCAAGATCCCGGATT	637	16	AbsGbsCbsdAsdAsdGsdAsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsTb	2070	2085
ASO-STAT6-2351	TGATACGGGGGGGATGG	638	16	TbsGbsAbsdTsdAs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTbsGbsGb	2351	2366
ASO-STAT6-2352	TTGATACGGGGGGATG	639	16	TbsTbsGbsdAsdTsdAs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsGb	2352	2367
ASO-STAT6-2359	AGAGGCTTGATACGG	640	16	AbsGbsAbsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sCbsGbsGb	2359	2374
ASO-STAT6-3633	GGGTTAGCATATGTCA	641	16	GbsGbsGbsdTsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTbsCbsAb	3633	3648
ASO-STAT6-673	TGGATCTCCCCTACTCG	642	17	TbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTsdAs(5MdC)sTbsCbsGb	673	689
ASO-STAT6-1052	ACTGGTGACGAGGGTTC	643	17	AbsCbsTbsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTbsTbsCb	1052	1068
ASO-STAT6-1356	GCTCACACCGCTTGATC	644	17	GbsCbsTbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTsdGsAbsTbsCb	1356	1372
ASO-STAT6-1357	CGCTCACACCGCTTGAT	645	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsAbsTb	1357	1373
ASO-STAT6-1359	TCCGCTCACACCGCTTG	646	17	TbsCbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTbsTbsGb	1359	1375
ASO-STAT6-1360	TTCCGCTCACACCGCTT	647	17	TbsTbsCbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsTb	1360	1376
ASO-STAT6-1839	ACCAGTAGCTCCGGAGA	648	17	AbsCbsCbsdAsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGsdGsAbsGbsAb	1839	1855
ASO-STAT6-1848	GCCGGTCAGACCAGTAG	649	17	GbsCbsCbsdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sTbsAbsGb	1848	1864
ASO-STAT6-1849	AGCCGGTCAGACCAGTA	650	17	AbsGbsCbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	1849	1865
ASO-STAT6-1891	AGAAGGCTAGTAACGTA	651	17	AbsGbsAbsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	1891	1907

Фиг. 1В (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэпмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1915	AAGGTTCCGTCGGGGCTC	652	17	AbsAbsGbsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsdGsCbsTbsCb	1915	1931
ASO-STAT6-1916	AAAGGTTCCGTCGGGGCT	653	17	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsGbsCbsTb	1916	1932
ASO-STAT6-1917	GAAAGGTTCCGTCGGGGC	654	17	GbsAbsAbsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsGbsCb	1917	1933
ASO-STAT6-1938	CTGAGTCGCTGAAGCGG	655	17	CbsTbsGbsdAsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsdGsCbsGbsGb	1938	1954
ASO-STAT6-1939	TCTGAGTCGCTGAAGCG	656	17	TbsCbsTbsdGsdAsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsGbsCbsGb	1939	1955
ASO-STAT6-2063	ATCCCGGATTCCGTCCC	657	17	AbsTbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTsCbsCbsCb	2063	2079
ASO-STAT6-2064	GATCCCGGATTCCGTCC	658	17	GbsAbsTbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsTbsCbsCb	2064	2080
ASO-STAT6-2065	AGATCCCGGATTCCGTC	659	17	AbsGbsAbsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsGbsTbsCb	2065	2081
ASO-STAT6-2066	AAGATCCCGGATTCCGT	660	17	AbsAbsGbsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2082
ASO-STAT6-2068	GCAAGATCCCGGATTCCG	661	17	GbsCbsAbsdAsdGsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsTbsCbsGb	2068	2084
ASO-STAT6-2187	CGGTCATCTTGATGGTA	662	17	CbsGbsGbsdTs(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsGsGbsTbsAb	2187	2203
ASO-STAT6-2350	TGATACGGGGGGATGGA	663	17	TbsGbsAbsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsGbsGbsAb	2350	2366
ASO-STAT6-2351	TTGATACGGGGGGATGG	664	17	TbsTbsGbsdAsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsTbsGbsGb	2351	2367
ASO-STAT6-2352	CTTGATACGGGGGGATG	665	17	CbsTbsTbsdGsdAsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2352	2368
ASO-STAT6-2357	GAGGCC TTGATACGGGG	666	17	GbsAbsGbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsAs(5MdC)sdGsGbsGbsGb	2357	2373
ASO-STAT6-513	GGGGGTCCCTCTGATATATG	667	20	GbsGbsGbsGmsGmsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdTsdGsdAsdTsAmsTmsAbsTbsGb	513	532
ASO-STAT6-671	GTGGATCTCCCTACTCGGT	668	20	GbsTbsGbsGmsAmsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdTsAs(5MdC)sTmsCmsGbsGbsTb	671	690

Фиг. 1В (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэлмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1131	AGCCCAACAGGAATCGAACT	669	20	AbsGbsCbsCmsCmsdAsdAs(5MdC)sdAsdGsdGsdAsdAsdTs(5MdC)sGmsAmsAbsCbsTb	1131	1150
ASO-STAT6-1354	CGCTCACACCGCTTGATCTT	670	20	CbsGbsCbsTmsCmsdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGsAmsTmsCbsTbsTb	1354	1373
ASO-STAT6-1355	CCGCTCACACCGCTTGATCT	671	20	CbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGmsAmsTbsCb sTb	1355	1374
ASO-STAT6-1356	TCCGCTCACACCGCTTGATC	672	20	TbsCbsCbsGmsCmsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGmsAbsTb sCb	1356	1375
ASO-STAT6-1432	AGTTTGCCGGGGCCAAGTGT	673	20	AbsGbsTbsTmsTmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsAmsGmsTbsGbsTb	1432	1451
ASO-STAT6-1555	AAGGGCACGCGGTCCATCTC	674	20	AbsAbsGbsGmsGms(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)sAmsTmsCbsTb sCb	1555	1574
ASO-STAT6-1556	AAAGGGCACGCGGTCCATCT	675	20	AbsAbsAbsGmsGmsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sCmsAmsTbsCbsTb	1556	1575
ASO-STAT6-1557	CAAAGGGCACGCGGTCCATC	676	20	CbsAbsAbsAmsGmsdGsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTsCmsCmsAbsTbsCb	1557	1576
ASO-STAT6-1558	ACAAAGGGCACGCGGTCCAT	677	20	AbsCbsAbsAmsAmsdGsdGsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsTmsCmsCbsAbsTb	1558	1577
ASO-STAT6-1826	CCGGAGACAGCGTTTGGTGA	678	20	CbsCbsGbsGmsAmsdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsdTsdTsdTsGmsGmsTbsGbsAb	1826	1845
ASO-STAT6-1827	TCCGGAGACAGCGTTTGGTG	679	20	TbsCbsCbsGmsGmsdAsdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsdTsdTsTmsGmsGbsTbsGb	1827	1846
ASO-STAT6-1833	AGTAGCTCCGAGACAGCGT	680	20	AbsGbsTbsAmsGms(5MdC)sdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdGsdAs(5MdC)sAmsGmsCbsGbsTb	1833	1852
ASO-STAT6-1843	CGGTCAGACCAGTAGCTCCG	681	20	CbsGbsGbsTmsCmsdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsdTsdAsdGsCmsTmsCbsCbsGb	1843	1862
ASO-STAT6-1846	AGCCGGTCAGACCAGTAGCT	682	20	AbsGbsCbsCmsGmsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsTmsAmsGbsCbsTb	1846	1865
ASO-STAT6-1847	CAGCCGGTCAGACCAGTAGC	683	20	CbsAbsGbsCmsCmsdGsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsGmsTmsAbsGbsCb	1847	1866
ASO-STAT6-1883	GCTAGTAACGTAAGTTTGC	684	20	GbsCbsTbsAmsGmsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsdGsTmsTmsTbsGbsCb	1883	1902
ASO-STAT6-1889	AAGAAGGCTAGTAACGTAAGTTTGC	685	20	AbsAbsGbsAmsAmsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sGmsTmsAbsCbsTb	1889	1908

Фиг. 1В (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэпмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1890	GAAGAAGGCTAGTAACGTAC	686	20	GbsAbsAbsGmsAmsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAsCmsGmsTbsAbsCb	1890	1909
ASO-STAT6-1891	AGAAGAAGGCTAGTAACGTA	687	20	AbsGbsAbsAmsGmsdAsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsAmsCmsGbsTbsAb	1891	1910
ASO-STAT6-1916	GAGAAAGGTTCCGTCGGGCT	688	20	GbsAbsGbsAmsAmsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGmsGmsGbsCbsTb	1916	1935
ASO-STAT6-1917	GGAGAAAGGTTCCGTCGGGC	689	20	GbsGbsAbsGmsAmsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsCmsGmsGbsGbsCb	1917	1936
ASO-STAT6-2056	CGGATTCGGTCCCCCAGTGA	690	20	CbsGbsGbsAmsTmsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sAmsGmsTbsGbsAb	2056	2075
ASO-STAT6-2057	CCGGATTCGGTCCCCCAGTG	691	20	CbsCbsGbsGmsAmsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sCmsAmsGbsTbsGb	2057	2076
ASO-STAT6-2060	ATCCCGGATTCGGTCCCCCA	692	20	AbsTbsCbsCmsCmsdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sCmsCmsCbsCbsAb	2060	2079
ASO-STAT6-2062	AGATCCCGGATTCGGTCCCC	693	20	AbsGbsAbsTmsCms(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsTmsCmsCbsCbsCb	2062	2081
ASO-STAT6-2063	AAGATCCCGGATTCGGTCCC	694	20	AbsAbsGbsAmsTms(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsGmsTmsCbsCbsCb	2063	2082
ASO-STAT6-2065	GCAAGATCCCGGATTCGGTC	695	20	GbsCbsAbsAmsGmsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTsCmsGmsGbsTbsCb	2065	2084
ASO-STAT6-2068	TGAGCAAGATCCCGGATTCG	696	20	TbsGbsAbsGmsCmsdAsdAsdGsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAmsTmsTbsCbsGb	2068	2087
ASO-STAT6-2347	TGATACGGGGGGATGGAGTG	697	20	TbsGbsAbsTmsAms(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsdGsGmsAmsGbsTbsGb	2347	2366
ASO-STAT6-2348	TTGATACGGGGGGATGGAGT	698	20	TbsTbsGbsAmsTmsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsGmsGmsAbsGbsTb	2348	2367
ASO-STAT6-2358	GGGAGAGGCCTTGATACGGG	699	20	GbsGbsGbsAmsGmsdAsdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsAmsCmsGbsGbsGb	2358	2377
ASO-STAT6-2782	GATCACCAACTGGGGTTGGC	700	20	GbsAbsTbsCmsAms(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdGsdGsdGsdGsTmsTmsGbsGbsCb	2782	2801
ASO-STAT6-3070	TGCGTGTGCGCGCTGCAGGT	701	20	TbsGbsCbsGmsTmsdGsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsCmsAmsGbsGbsTb	3070	3089
ASO-STAT6-3071	GTGCGTGTGCGCGCTGCAGG	702	20	GbsTbsGbsCmsGmsdTsdGsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsGmsCmsAbsGbsGb	3071	3090
ASO-STAT6-3431	GCCCTTGTACTTTTGCATAG	703	20	GbsCbsCbsCmsTmsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTsdTsdTsdTsdGsCmsAmsTbsAbsGb	3431	3450

Фиг. 1С

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэлмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-540	AGTCCGCCTCGTAGT	704	15	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsAbsGbsTb	540	554
ASO-CEBPb-565	TTGCCGCCGTACGCA	705	15	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	579
ASO-CEBPb-569	CGCCTTGCCGCCGTA	706	15	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	569	583
ASO-CEBPb-648	GCTCGTGGTCGCCGA	707	15	GbsCbsTbs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	662
ASO-CEBPb-816	CGTAGTCGTCGGAGA	708	15	CbsGbsTbsAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsAbsGbsAb	816	830
ASO-CEBPb-817	CCGTAGTCGTCGGAG	709	15	CbsCbsGbsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsAbsGb	817	831
ASO-CEBPb-818	CCCGTAGTCGTCGGA	710	15	CbsCbsCbsdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGbsGbsAb	818	832
ASO-CEBPb-819	CCCCGTAGTCGTCGG	711	15	CbsCbsCbs(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	819	833
ASO-CEBPb-820	CCCCGTAGTCGTCG	712	15	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsTbsCbsGb	820	834
ASO-CEBPb-851	GCCGTA CTGGCCGG	713	15	GbsCbsCbsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdGs(5MdC)sCbsGbsGb	851	865
ASO-CEBPb-853	TAGCCGTA CTGGCC	714	15	TbsAbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsGbsCbsCb	853	867
ASO-CEBPb-856	ACGTAGCCGTA CTG	715	15	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sTbsCbsGb	856	870
ASO-CEBPb-858	TCACGTAGCCGTA CT	716	15	TbsCbsAbs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAbsCbsTb	858	872
ASO-CEBPb-987	AGTCCGCGGGCTCGA	717	15	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTsCbsGbsAb	987	1001
ASO-CEBPb-1056	GCGCGTACGGGAAGC	718	15	GbsCbsGbs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsAsAbsGbsCb	1056	1070
ASO-CEBPb-1064	AGCGCGCAGCGCGTA	719	15	AbsGbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1078
ASO-CEBPb-1065	AAGCGCGCAGCGCGT	720	15	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1079
ASO-CEBPb-1066	TAAGCGCGCAGCGCG	721	15	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sGbsCbsGb	1066	1080

Фиг. 1С (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэпмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-1071	CGAGGTAAGCGCGCA	722	15	CbsGbsAbsdGsdGsdTsdAsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsCbsAb	1071	1085
ASO-CEBPb-1270	CGCCGGATCTTGAC	723	15	CbsGbsCbs(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsTbsAbsCb	1270	1284
ASO-CEBPb-1273	TCGCGCCGGATCTTG	724	15	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sTbsTbsGb	1273	1287
ASO-CEBPb-1274	CTCGCGCCGGATCTT	725	15	CbsTbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCbsTbsTb	1274	1288
ASO-CEBPb-1405	TCGCGCGACAGCTGC	726	15	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sTbsGbsCb	1405	1419
ASO-CEBPb-1407	GCTCGCGCGACAGCT	727	15	GbsCbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdAs(5MdC)sdAsGbsCbsTb	1407	1421
ASO-CEBPb-539	AGTCCGCCTCGTAGTA	728	16	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdAsGbsTbsAb	539	554
ASO-CEBPb-540	CAGTCCGCCTCGTAGT	729	16	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsAbsGbsTb	540	555
ASO-CEBPb-563	TGCCGCCGTACGCAGC	730	16	TbsGbsCbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sAbsGbsCb	563	578
ASO-CEBPb-564	TTGCCGCCGTACGCAG	731	16	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsCbsAbsGb	564	579
ASO-CEBPb-565	CTTGCCGCCGTACGCA	732	16	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	580
ASO-CEBPb-568	CGCCTTGCCGCCGTAC	733	16	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsTbsAbsCb	568	583
ASO-CEBPb-644	CGTGGTCGCCGATGCT	734	16	CbsGbsTbsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdAsdTsGbsCbsTb	644	659
ASO-CEBPb-645	TCGTGGTCGCCGATGC	735	16	TbsCbsGbsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdAsTbsGbsCb	645	660
ASO-CEBPb-648	CGCTCGTGGTCGCCGA	736	16	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	663
ASO-CEBPb-819	CCCCCGTAGTCGTCGG	737	16	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	819	834
ASO-CEBPb-855	ACGTAGCCGTACTCGG	738	16	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsCbsGbsGb	855	870
ASO-CEBPb-860	GGCTCACGTAGCCGTA	739	16	GbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	860	875

Фиг. 1С (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15-мерный гэпмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-986	AGTCCGCGGGCTCGAA	740	16	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsAbsAb	986	1001
ASO-CEBPb-987	CAGTCCGCGGGCTCGA	741	16	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTsCbsGbsAb	987	1002
ASO-CEBPb-996	TTCCGCTTGCACTCCG	742	16	TbsTbsCbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)sdAsdGsdTsCbsCbsGb	996	1011
ASO-CEBPb-1049	ACGGGAAGCCCGCCGC	743	16	AbsCbsGbsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsCb	1049	1064
ASO-CEBPb-1050	TACGGGAAGCCCGCCG	744	16	TbsAbsCbsdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsCbsCbsGb	1050	1065
ASO-CEBPb-1064	AAGCGCGCAGCGCGTA	745	16	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1079
ASO-CEBPb-1065	TAAGCGCGCAGCGCGT	746	16	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1080
ASO-CEBPb-1066	GTAAGCGCGCAGCGCG	747	16	GbsTbsAbsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sGbsCbsGb	1066	1081
ASO-CEBPb-1083	ACCGCCTGGTAGCCGA	748	16	AbsCbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdGsdGsdTsdAsdGs(5MdC)sCbsGbsAb	1083	1098
ASO-CEBPb-1088	TCGGCACCGCCTGGTA	749	16	TbsCbsGbsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdGsGbsTbsAb	1088	1103
ASO-CEBPb-1253	CGTCGCTGTGCTTGTC	750	16	CbsGbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdTsdGs(5MdC)sdTsdTsGbsTbsCb	1253	1268
ASO-CEBPb-1269	CGCCGGATCTTGACT	751	16	CbsGbsCbs(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsAbsCbsTb	1269	1284
ASO-CEBPb-1272	TCGCGCCGGATCTTGT	752	16	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTbsGbsTb	1272	1287
ASO-CEBPb-1274	GCTCGCGCCGGATCTT	753	16	GbsCbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCbsTbsTb	1274	1289
ASO-CEBPb-539	CAGTCCGCTCGTAGTA	754	17	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdAsGbsTbsAb	539	555
ASO-CEBPb-564	CTTGCCGCCGTACGCAG	755	17	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsCbsAbsGb	564	580
ASO-CEBPb-565	CCTTGCCGCCGTACGCA	756	17	CbsCbsTbsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	581
ASO-CEBPb-567	CGCCTTGCCGCCGTACG	757	17	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAbsCbsGb	567	583

Фиг. 1С (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэлмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-647	CGCTCGTGGTCGCCGAT	758	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsAbsTb	647	663
ASO-CEBPb-648	GCGCTCGTGGTCGCCGA	759	17	GbsCbsGbs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	664
ASO-CEBPb-815	CCGTAGTCGTCGGAGAA	760	17	CbsCbsGbsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsdAsGbsAbsAb	815	831
ASO-CEBPb-818	CCCCCGTAGTCGTCGGA	761	17	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGbsGbsAb	818	834
ASO-CEBPb-820	TGCCCCCGTAGTCGTCG	762	17	TbsGbsCbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsTbsCbsGb	820	836
ASO-CEBPb-854	ACGTAGCCGTA CTGGC	763	17	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsGbsCb	854	870
ASO-CEBPb-855	CACGTAGCCGTA CTGG	764	17	CbsAbsCbsdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsCbsGbsGb	855	871
ASO-CEBPb-859	GGCTCACGTAGCCGTAC	765	17	GbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsTbsAbsCb	859	875
ASO-CEBPb-1050	GTACGGGAAGCCCGCCG	766	17	GbsTbsAbs(5MdC)sdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsCbsCbsGb	1050	1066
ASO-CEBPb-1053	CGCGTACGGGAAGCCCG	767	17	CbsGbsCbsdGsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)sCbsCbsGb	1053	1069
ASO-CEBPb-1062	AGCGCGCAGCGCTACG	768	17	AbsGbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdTsAbsCbsGb	1062	1078
ASO-CEBPb-1063	AAGCGCGCAGCGGTAC	769	17	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsTbsAbsCb	1063	1079
ASO-CEBPb-1064	TAAGCGCGCAGCGCTA	770	17	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1080
ASO-CEBPb-1065	GTAAGCGCGCAGCGCT	771	17	GbsTbsAbsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1081
ASO-CEBPb-1265	CGGATCTTGACTCGTC	772	17	CbsGbsGbsdAsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsTbsCb	1265	1281
ASO-CEBPb-1270	CGCGCCGGATCTTGTA	773	17	CbsGbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsTbsAbsCb	1270	1286
ASO-CEBPb-1271	TCGCGCCGGATCTTGTA	774	17	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsTbsAb	1271	1287
ASO-CEBPb-1272	CTCGCGCCGGATCTTGT	775	17	CbsTbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTbsGbsTb	1272	1288

Фиг. 1С (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэлмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-1274	CGCTCGCGCCGGATCTT	776	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTscbsTbsTb	1274	1290
ASO-CEBPb-1277	TTGCGCTCGCGCCGGAT	777	17	TbsTbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsc(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsGbsAbsTb	1277	1293
ASO-CEBPb-564	CGCCTTGCCGCCGTACGCAG	778	20	CbsGbsCbsCmsTmsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsCmsGmsCbsAbsGb	564	583
ASO-CEBPb-565	CCGCCCTTGCCGCCGTACGCA	779	20	CbsCbsGbsCmsCmsdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAmsCmsGbsCbsAb	565	584
ASO-CEBPb-818	TTGCCCCCGTAGTCGTCGGA	780	20	TbsTbsGbsCmsCms(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsTmsCmsGbsGbsAb	818	837
ASO-CEBPb-1061	TAAGCGCGCAGCGGTACGG	781	20	TbsAbsAbsGmsCmsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsTmsAmsCbsGbsGb	1061	1080
ASO-CEBPb-1062	GTAAGCGCGCAGCGGTACG	782	20	GbsTbsAbsAmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGmsTmsAbsCbsGb	1062	1081
ASO-CEBPb-1064	AGGTAAGCGCGCAGCGGTA	783	20	AbsGbsGbsTmsAmsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdTsdGs(5MdC)sGmsCmsGbsTbsAb	1064	1083
ASO-CEBPb-1267	CGCGCCGGATCTTGTACTCG	784	20	CbsGbsCbsGmsCms(5MdC)sdGsdGsdAsdTsc(5MdC)sdTsdTsdGsdTsAmsCmsTbsCbsGb	1267	1286
ASO-CEBPb-1272	GCGCTCGCGCCGGATCTTGT	785	20	GbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTscmsTmsTbsGbsTb	1272	1291
ASO-CEBPb-645	GCGCTCGTGGTCGCCGATGC	786	20	GbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGmsAmsTbsGbsCb	645	664
ASO-CEBPb-848	TAGCCGTACTCGGCCGGCTT	787	20	TbsAbsGbsCmsCmsdTsdGsdTs(5MdC)sdTsc(5MdC)sdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sGmsGmsCbsTbsTb	848	867
ASO-CEBPb-849	GTAGCCGTACTCGGCCGGCT	788	20	GbsTbsAbsGmsCms(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsc(5MdC)sdGsdGs(5MdC)sCmsGmsGbsCbsTb	849	868
ASO-CEBPb-850	CGTAGCCGTACTCGGCCGGC	789	20	CbsGbsTbsAmsGms(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsc(5MdC)sdGsdGsCmsCmsGbsGbsCb	850	869
ASO-CEBPb-1063	GGTAAGCGCGCAGCGGTAC	790	20	GbsGbsTbsAmsAmsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdTsdGs(5MdC)sdGsCmsGmsTbsAbsCb	1063	1082
ASO-CEBPb-1070	TAGCCGAGGTAAGCGCGCAG	791	20	TbsAbsGbsCmsCmsdTsdGsdGsdGsdTsdAsdTsdGs(5MdC)sdGsCmsGmsCbsAbsGb	1070	1089
ASO-CEBPb-1071	GTAGCCGAGGTAAGCGCGCA	792	20	GbsTbsAbsGmsCms(5MdC)sdGsdAsdTsdGsdTsdAsdTsdGs(5MdC)sGmsCmsGbsCbsAb	1071	1090
ASO-CEBPb-1262	CGGATCTTGTACTCGTCGCT	793	20	CbsGbsGbsAmsTms(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTsc(5MdC)sdGsTmsCmsGbsCbsTb	1262	1281

Фиг. 1С (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15-мерный гэлмер LNA (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Стоп
ASO-CEBPb-1274	TTGCGCTCGCGCCGGATCTT	794	20	TbsTbsGbsCmsGms(5MdC)sdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAmsTmsCbsTbsTb	1274	1293
ASO-CEBPb-1275	GTTGCGCTCGCGCCGGATCT	795	20	GbsTbsTbsGmsCmsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsGmsAmsTbsCbsTb	1275	1294
ASO-CEBPb-644	CGCTCGTGGTCGCCGATGCT	796	20	CbsGbsCbsTmsCmsdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsAmsTmsGbsCbsTb	644	663
ASO-CEBPb-647	GCGCGCTCGTGGTCGCCGAT	797	20	GbsCbsGbsCmsGms(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGsCmsCmsGbsAbsTb	647	666
ASO-CEBPb-851	ACGTAGCCGTACTCGGCCGG	798	20	AbsCbsGbsTmsAmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsGmsCmsCbsGbsGb	851	870
ASO-CEBPb-1266	GCGCCGGATCTTGACTCGT	799	20	GbsCbsGbsCmsCmsdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAsCmsTmsCbsGbsTb	1266	1285
ASO-CEBPb-1268	TCGCGCCGGATCTTGACTC	800	20	TbsCbsGbsCmsGms(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsTmsAmsCbsTbsCb	1268	1287
ASO-CEBPb-1270	GCTCGCGCCGGATCTTGAC	801	20	GbsCbsTbsCmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTmsGmsTbsAbsCb	1270	1289
ASO-CEBPb-646	CGCGCTCGTGGTCGCCGATG	802	20	CbsGbsCbsGmsCmsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCmsGmsAbsTbsGb	646	665
ASO-CEBPb-1060	AAGCGCGCAGCGGTACGGG	803	20	AbsAbsGbsCmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdTsAmsCmsGbsGbsGb	1060	1079
ASO-CEBPb-1263	CCGGATCTTGACTCGTCGC	804	20	CbsCbsGbsGmsAmsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGmsTmsCbsGbsCb	1263	1282
ASO-CEBPb-1269	CTCGCGCCGGATCTTGACT	805	20	CbsTbsCbsGmsCmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsGmsTmsAbsCbsTb	1269	1288
ASO-CEBPb-1271	CGCTCGCGCCGGATCTTGTA	806	20	CbsGbsCbsTmsCmsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sTmsTmsGbsTbsAb	1271	1290

Фиг. 1D

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	Положение мРНК (SEQ ID NO: 43)		Химическая структура ASO (Nb — LNA, dN — ДНК, (5MdC) — 5-метил-dC, Nm — MOE, s — фосфоротиоат)
				Начало	Конец	
ASO-STAT3-2559	GGTAGGCGCCTCAGT CG	889	17	2559	2576	GbsGbsTbsdAsdGsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsTbsCbsGb
ASO-STAT3-2556	GGTAGGCGCCTCAGT CGTAT	890	20	2556	2576	GbsGbsTbsAmsGmsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsdTsCmsGmsTbsAb sTb
ASO-STAT3-2557	AGGTAGGCGCCTCAG TCGTA	891	20	2557	2577	Ab sGbsGbsTmsAmsdGsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsTmsCmsGbsTb sAb
ASO-STAT3-1046	ATTTGTTGACGGGTC	892	15	1046	1061	Ab sTbsTbsdTsdGsdTsdtTsdtGs dAs (5MdC) sdG sdGsGbsTbsCb
ASO-STAT3-351	GATTCTTTGCTGGCC GCATA	893	20	351	371	GbsAbsTbsTmsCmsdTsdTsdtTs dGs (5MdC) sdT sdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sGmsCmsAbsTbsAb
ASO-STAT3-450	CGTAGATTGTGCTGA TAGAG	894	20	450	470	CbsGbsTbsAmsGmsdAsdTsdTs dGsdTs dGs (5MdC) sdTsdtGs dAsTmsAmsGbsAbsGb
ASO-STAT3-2558	GTAGGCGCCTCAGTC GT	895	17	2558	2575	GbsTbsAbsdGsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsdTsCbsGbsTb
ASO-STAT3-2558	CAGGTAGGCGCCTCA GTCGT	896	20	2558	2578	CbsAbsGbsGmsTmsdAsdGsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsGmsTmsCbsGb sTb
ASO-STAT3-865	CGCCAGCTCACTCAC GATGC	897	20	865	885	CbsGbsCbsCmsAmsdGs (5MdC) sdTs (5MdC) sd As (5MdC) sdTs (5MdC) sdAs (5MdC) sGmsAmsT bsGbsCb
ASO-STAT3-894	CGTACTCCATCGCTG A	898	16	894	910	CbsGbsTbsdAs (5MdC) sdTs (5MdC) s (5MdC) s dAsdTs (5MdC) sdGs (5MdC) sTbsGbsAb
ASO-STAT3-1778	TAGTCAGCTGCTCGA TGCTC	899	20	1778	1798	TbsAbsGbsTmsCmsdAsdGs (5MdC) sdTsdtGs (5MdC) sdTs (5MdC) sdGsdAsTmsGmsCbsTbsCb
ASO-STAT3-2558	TAGGCGCCTCAGTCG T	900	16	2558	2574	TbsAbsGbsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) s dTs (5MdC) sdAsdGsdTsCbsGbsTb
ASO-STAT3-1482	CACAATTGGCTCGGC C	901	16	1482	1498	CbsAbsCbsdAsdAsdTsdTsdtGs dGs (5MdC) sdT s (5MdC) sdGsGbsCbsCb

Фиг. 1D (продолжение)

ASO-STAT3-892	CACGTACTCCATCGC TGACA	902	20	892	912	CbsAbsCbsGmsTmsdAs (5MdC) sdTs (5MdC) s (5MdC) sdAsdTs (5MdC) sdGs (5MdC) sTmsGmsAbsCbsAb
ASO-STAT3-2262	CGACAATACTTTCCG AATGC	903	20	2262	2282	CbsGbsAbsCmsAmsdAsdTsAs (5MdC) sdTsdTsdTs (5MdC) s (5MdC) sdGsAmsAmsTbsGbsCb
ASO-STAT3-2267	CGACAATACTTTCCG	904	15	2267	2282	CbsGbsAbs (5MdC) sdAsdAsdTsAs (5MdC) sdTsdTsdTsCbsCbsGb
ASO-STAT3-411	AAGCGGCTATACTGC TGGTC	905	20	411	431	AbsAbsGbsCmsGmsdGs (5MdC) sdTsdAsdTsAs (5MdC) sdTsdGs (5MdC) sTmsGmsGbsTbsCb
ASO-STAT3-2267	GCCGACAATACTTTC CG	906	17	2267	2284	GbsCbsCbsdGsdAs (5MdC) sdAsdAsdTsAs (5MdC) sdTsdTsdTsCbsCbsGb
ASO-STAT3-896	ACGTACTCCATCGCT	907	15	896	911	AbsCbsGbsdTsAs (5MdC) sdTs (5MdC) s (5MdC) sdAsdTs (5MdC) sGbsCbsTb
ASO-STAT3-2555	GTAGGCGCCTCAGTC GTATC	908	20	2555	2575	GbsTbsAbsGmsGms (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsdTs (5MdC) sGmsTmsAbsTbsCb
ASO-STAT3-525	AGGCACCGGGCCACA ATCCG	909	20	525	545	AbsGbsGbsCmsAms (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdAs (5MdC) sdAsAmsTmsCbsCbsGb
ASO-STAT3-1766	CGATGCTCAGTCCTC GCTTG	910	20	1766	1786	CbsGbsAbsTmsGms (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsdTs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sGmsCmsTbsTbsGb
ASO-STAT3-1114	ATCGGCCCGTGCTGT A	911	16	1114	1130	AbsTbsCbsdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsdTsGsdGs (5MdC) sdTsGbsTbsAb
ASO-STAT3-2557	TAGGCGCCTCAGTCG TA	912	17	2557	2574	TbsAbsGbsdGs (5MdC) sdGs (5MdC) s (5MdC) sdTs (5MdC) sdAsdGsdTs (5MdC) sGbsTbsAb
ASO-STAT3-995	AGTTTTCTAGCCGAT CTAGG	913	20	995	1015	AbsGbsTbsTmsTmsdTs (5MdC) sdTsdAsdGs (5MdC) s (5MdC) sdGsdAsdTsCmsTmsAbsGbsGb
ASO-STAT3-2263	CCGACAATACTTTCC GAATG	914	20	2263	2283	CbsCbsGbsAmsCmsdAsdAsdTsAs (5MdC) sdTsdTsdTs (5MdC) s (5MdC) sGmsAmsAbsTbsGb
ASO-STAT3-511	AATCCGGGCAATCTC CATTG	915	20	511	531	AbsAbsTbsCmsCmsdGsdGsdGs (5MdC) sdAsdAsdTs (5MdC) sdTs (5MdC) sCmsAmsTbsTbsGb
ASO-STAT3-511	CGGGCAATCTCCATT G	916	16	511	527	CbsGbsGbsdGs (5MdC) sdAsdAsdTs (5MdC) sdTs (5MdC) s (5MdC) sdAsTbsTbsGb

Фиг. 1D

ASO-STAT3-1043	TAATTTGTTGACGGG TCTGA	917	20	1043	1063	TbsAbsAbsTmsTmsdTsdGsdTsdTsdGsdAs (5M dC) sdGsdGsdGsTmsCmsTbsGbsAb
ASO-STAT3-1780	TGTAGTCAGCTGCTC GATGC	918	20	1780	1800	TbsGbsTbsAmsGmsdTts (5MdC) sdAsdGs (5MdC) sdTsdGs (5MdC) sdTs (5MdC) sGmsAmsTbsGb sCb
ASO-STAT3-458	TGATTCTTCGTAGAT TGTGC	919	20	458	478	TbsGbsAbsTmsTms (5MdC) sdTsdTs (5MdC) sd GsdTsdAsdGsdAsdTtsTmsGmsTbsGbsCb
ASO-STAT3-894	ACGTACTCCATCGCT GA	920	17	894	911	AbsCbsGbsdTsdAs (5MdC) sdTs (5MdC) s (5Md C) sdAsdTts (5MdC) sdGs (5MdC) sTbsGbsAb
ASO-STAT3-1779	GTAGTCAGCTGCTCG ATGCT	921	20	1779	1799	GbsTbsAbsGmsTms (5MdC) sdAsdGs (5MdC) sd TsdGs (5MdC) sdTs (5MdC) sdGsAmsTmsGbsCb sTb
ASO-STAT3-2274	TGGCTCTCTGGCCGA CAATA	922	20	2274	2294	TbsGbsGbsCmsTms (5MdC) sdTs (5MdC) sdTsd GsdGs (5MdC) s (5MdC) sdGsdAsCmsAmsAbsTb sAb
ASO-STAT3-1039	TTGTTGACGGGTCTG AAGTT	923	20	1039	1059	TbsTbsGbsTmsTmsdTsdGsdAs (5MdC) sdGsdGsdG sdTs (5MdC) sdTsdGsAmsAmsGbsTbsTb
ASO-STAT3-1238	TAGTGAACCTGGACGC CGGTC	924	20	1238	1258	TbsAbsGbsTmsGmsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdG sdAs (5MdC) sdGs (5MdC) sCmsGmsGbsTbsCb
ASO-STAT3-1239	GTAGTGAACCTGGACG CCGGT	925	20	1239	1259	GbsTbsAbsGmsTmsdTsdGsdAs (5MdC) sdTsdG sdGsdAs (5MdC) sdGsCmsCmsGbsGbsTb
ASO-STAT3-516	GCCACAATCCGGGCA ATCTC	926	20	516	536	GbsCbsCbsAmsCmsdTsdAsdTts (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsdGs (5MdC) sdAsAmsTmsCbsTbsCb
ASO-STAT3-1238	GAACTGGACGCCGGT C	927	16	1238	1254	GbsAbsAbs (5MdC) sdTsdGsdGsdAs (5MdC) sd Gs (5MdC) s (5MdC) sdGsGbsTbsCb
ASO-STAT3-1034	GACGGGTCTGAAGTT GAGAT	928	20	1034	1054	GbsAbsCbsGmsGmsdTsdTs (5MdC) sdTsdGsdA sdAsdTsdTsdTsGmsAmsGbsAbsTb
ASO-STAT3-1239	GAACTGGACGCCGGT	929	15	1239	1254	GbsAbsAbs (5MdC) sdTsdGsdGsdAs (5MdC) sd Gs (5MdC) s (5MdC) sGbsGbsTb
ASO-STAT3-1113	ATCGGCCCGGTGCTGT AC	930	17	1113	1130	AbsTbsCbsdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsd TsdGs (5MdC) sdTsdGsTbsAbsCb
ASO-STAT3-1484	AAGCATCACAATTGG CTCGG	931	20	1484	1504	AbsAbsGbsCmsAmsdTts (5MdC) sdAs (5MdC) sd AsdAsdTsdTsdGsdGsCmsTmsCbsGbsGb

Фиг. 1D (продолжение)

ASO-STAT3-2556	GCGCCTCAGTCGTAT	932	15	2556	2571	GbsCbsGbs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAs dGsdTs (5Mdc) sdGsTbsAbsTb
ASO-STAT3-461	GCTTGATTCTTCGTA GATTG	933	20	461	481	GbsCbsTbsTmsGmsdAsdTsdTs (5Mdc) sdTsdT s (5Mdc) sdGsdTsdAsGmsAmsTbsTbsGb
ASO-STAT3-2273	GGCTCTCTGGCCGAC AATAC	934	20	2273	2293	GbsGbsCbsTmsCmsdTs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5 Mdc) s (5Mdc) sdGsdAs (5Mdc) sAmsAmsTbsAb sCb
ASO-STAT3-1783	CAGTGTAAGTCAGCTG CTCGA	935	20	1783	1803	CbsAbsGbsTmsGmsdTsdAsdGsdTs (5Mdc) sdA sdGs (5Mdc) sdTsdGsCmsTmsCbsGbsAb
ASO-STAT3-891	ACGTACTCCATCGCT GACAA	936	20	891	911	AbsCbsGbsTmsAms (5Mdc) sdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTs (5Mdc) sdGs (5Mdc) sdTsGmsAmsC bsAbsAb
ASO-STAT3-510	ATCCGGGCAATCTCC ATTGG	937	20	510	530	AbsTbsCbsCmsGmsdGsdGs (5Mdc) sdAsdAsdT s (5Mdc) sdTs (5Mdc) s (5Mdc) sAmsTmsTbsGb sGb
ASO-STAT3-2115	GGTTCCACGGACTGG ATCTG	938	20	2115	2135	GbsGbsTbsTmsCms (5Mdc) sdAs (5Mdc) sdGsd GsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGsAmsTmsCbsTbsGb
ASO-STAT3-1482	GCATCACAATTGGCT CGGCC	939	20	1482	1502	GbsCbsAbsTmsCmsdAs (5Mdc) sdAsdAsdTsdT sdGsdGs (5Mdc) sdTsCmsGmsGbsCbsCb
ASO-STAT3-986	GCCGATCTAGGCAGA TGTTG	940	20	986	1006	GbsCbsCbsGmsAmsdTs (5Mdc) sdTsdAsdGsdG s (5Mdc) sdAsdGsdAsTmsGmsTbsTbsGb
ASO-STAT3-893	GCACGTACTCCATCG CTGAC	941	20	893	913	GbsCbsAbsCmsGmsdTsdAs (5Mdc) sdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTs (5Mdc) sdGsCmsTmsGbsAb sCb
ASO-STAT3-1237	ACTGGACGCCGGTCT	942	15	1237	1252	AbsCbsTbsdGsdGsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsTbsCbsTb
ASO-STAT3-1111	CATCGGCCGGTGCTG TACAA	943	20	1111	1131	CbsAbsTbsCmsGmsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsd GsdTsdGs (5Mdc) sdTsdGsTmsAmsCbsAbsAb
ASO-STAT3-1236	ACTGGACGCCGGTCT T	944	16	1236	1252	AbsCbsTbsdGsdGsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsdTsCbsTbsTb
ASO-STAT3-2557	GGCGCCTCAGTCGTA	945	15	2557	2572	GbsGbsCbsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) s dAsdGsdTs (5Mdc) sGbsTbsAb
ASO-STAT3-2264	GCCGACAATACTTTC CGAAT	946	20	2264	2284	GbsCbsCbsGmsAms (5Mdc) sdAsdAsdTsdAs (5 Mdc) sdTsdTsdTs (5Mdc) sCmsGmsAbsAbsTb

Фиг. 1D (продолжение)

ASO-STAT3-1234	GGACGCCGGTCTTGA	947	15	1234	1249	GbsGbsAbs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGs dGsdTs (5Mdc) sdTsTbsGbsAb
ASO-STAT3-1241	TAGTGAAGTGGACGCG	948	17	1241	1258	TbsAbsGbsdTsdGsdAsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGsdAs (5Mdc) sdGsCbsCbsGb
ASO-STAT3-524	GGCACC GGCCACAA TCCGG	949	20	524	544	GbsGbsCbsAmsCms (5Mdc) sdGsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAs (5Mdc) sdAsdAsTmsCmsCbsGbsGb
ASO-STAT3-890	CGTACTCCATCGCTGACAAA	950	20	890	910	CbsGbsTbsAmsCmsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTs (5Mdc) sdGs (5Mdc) sdTsdGsAmsCmsAbsAbsAb
ASO-STAT3-1114	CATCGGCCGGTGCTGTA	951	17	1114	1131	CbsAbsTbs (5Mdc) sdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsdTsdGs (5Mdc) sdTsGbsTbsAb
ASO-STAT3-1108	CGGCCGGTGCTGTACAATGG	952	20	1108	1128	CbsGbsGbsCmsCmsdTsdGsdGsdTsdGs (5Mdc) sdTsdGsdTsdAs (5Mdc) sAmsAmsTbsGbsGb
ASO-STAT3-409	GCGGCTATACTGCTGTCAA	953	20	409	429	GbsCbsGbsGmsCmsdTsdAsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGs (5Mdc) sdTsdGsGmsTmsCbsAbsAb
ASO-STAT3-1356	ATGTTAAATTTCCGGGATCC	954	20	1356	1376	AbTbsGbsTmsTmsdTsdAsdTsdAsdTsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsGmsAmsTbsCbsCb
ASO-STAT3-1231	CGCCGGTCTTGATGA	955	15	1231	1246	CbsGbsCbs (5Mdc) sdGsdGsdTs (5Mdc) sdTsdTsdGsdAsTbsGbsAb
ASO-STAT3-2267	CTGGCCGACAATACTTTCCG	956	20	2267	2287	CbsTbsGbsGmsCms (5Mdc) sdGsdAs (5Mdc) sdAsdTsdAs (5Mdc) sdTsTmsTmsCbsCbsGb
ASO-STAT3-1238	AACTGGACGCCGGTC	957	15	1238	1253	AbTbsCbsdTsdGsdGsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsGbsTbsCb
ASO-STAT3-1237	AACTGGACGCCGGTC	958	16	1237	1253	AbTbsCbsdTsdGsdGsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsTbsCbsTb
ASO-STAT3-522	CACCGGGCCACAATCCGGC	959	20	522	542	CbsAbsCbsCmsGmsdTsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAs (5Mdc) sdAsdTsdTs (5Mdc) sCmsGmsGbsGbsCb
ASO-STAT3-2266	TGGCCGACAATACTTTCCGA	960	20	2266	2286	TbsGbsGbsCmsCmsdTsdGs (5Mdc) sdAsdTsdTs (5Mdc) sdTsTmsTmsCbsGbsAb
ASO-STAT3-1998	GTGCTCAAGATGGCCCGCTC	961	20	1998	2018	GbsTbsGbsCmsTms (5Mdc) sdAsdTsdGsdAsdTsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sCmsGmsCbsTbsCb

Фиг. 1D (продолжение)

ASO-STAT3-881	TCGCTGACAAAAGCC CCGCC	962	20	881	901	TbsCbsGbsCmsTmsdGsdAs (5Mdc) sdAsdAsdA sdAsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sCmsCmsGbsCbsCb
ASO-STAT3-513	ACAATCCGGGCAATC TCCAT	963	20	513	533	AbsCbsAbsAmsTms (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsd Gs (5Mdc) sdAsdAsdTs (5Mdc) sTmsCmsCbsAb sTb
ASO-STAT3-1107	GGCCGGTGCTGTACA ATGGG	964	20	1107	1127	GbsGbsCbsCmsGmsdGsdTsdGs (5Mdc) sdTsdG sdTsdAs (5Mdc) sdAsAmsTmsGbsGbsGb
ASO-STAT3-1235	TGGACGCCGGTCTTG	965	15	1235	1250	TbsGbsGbsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) s dGsdGsdTs (5Mdc) sTbsTbsGb
ASO-STAT3-882	ATCGCTGACAAAAGC CCCGC	966	20	882	902	AbsTbsCbsGmsCmsdTsdGsdAs (5Mdc) sdAsdA sdAsdAsdGs (5Mdc) sCmsCmsCbsGbsCb
ASO-STAT3-1112	GCATCGGCCGGTGCT GTACA	967	20	1112	1132	GbsCbsAbsTmsCmsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sd GsdGsdTsdGs (5Mdc) sdTsGmsTmsAbsCbsAb
ASO-STAT3-521	ACCGGGCCACAATCC GGGCA	968	20	521	541	AbsCbsCbsGmsGmsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAs (5Mdc) sdAsdAsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sGmsGmsG bsCbsAb
ASO-STAT3-1110	ATCGGCCGGTGCTGT ACAAT	969	20	1110	1130	AbsTbsCbsGmsGms (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsd TsdGs (5Mdc) sdTsdGsdTsAmsCmsAbsAbsTb
ASO-STAT3-1475	AATTGGCTCGGCCCC CATTC	970	20	1475	1495	AbsAbsTbsTmsGmsdGs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sd GsdGs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sCms AmsTbsTbsCb
ASO-STAT3-894	TGCACGTACTCCATC GCTGA	971	20	894	914	TbsGbsCbsAmsCmsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTs (5Mdc) sGmsCmsTbsGb sAb
ASO-STAT3-519	CGGGCCACAATCCGG GCAAT	972	20	519	539	CbsGbsGbsGmsCms (5Mdc) sdAs (5Mdc) sdAsd AsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdGsGmsCmsAbsAb sTb
ASO-STAT3-2553	AGGCGCCTCAGTCGT ATCTT	973	20	2553	2573	AbsGbsGbsCmsGms (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) C) sdAsdGsdTs (5Mdc) sdGsdTsAmsTmsCbsTb sTb
ASO-STAT3-2552	GGCGCCTCAGTCGTA TCTTT	974	20	2552	2572	GbsGbsCbsGmsCms (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsd GsdTs (5Mdc) sdGsdTsdAsTmsCmsTbsTbsTb
ASO-STAT3-883	CATCGCTGACAAAAG CCCCG	975	20	883	903	CbsAbsTbsCmsGms (5Mdc) sdTsdGsdAs (5Mdc)) sdAsdAsdAsdAsdGsCmsCmsCbsCbsGb

Фиг. 1D (продолжение)

ASO-STAT3-842	TCCGATCTGGTCCA GCGCA	976	20	842	862	TbsCbsCbsGmsCmsdAsdT _s (5MdC) sdTsdGsdGsdT _s (5MdC) s (5MdC) sdAsGmsCmsGbsCbsAb
ASO-STAT3-851	CGATGCTTCTCCGCA TCTGG	977	20	851	871	CbsGbsAbsTmsGms (5MdC) sdTsdT _s (5MdC) sdT _s (5MdC) s (5MdC) sdGs (5MdC) sdAsTmsCmsTbsGbsGb
ASO-STAT3-2265	GGCCGACAATACTTT CCGAA	978	20	2265	2285	GbsGbsCbsCmsGmsdAs (5MdC) sdAsdAsdTsdAs (5MdC) sdTsdTsdT _s CmsCmsGbsAbsAb
ASO-STAT3-520	CCGGGCCACAATCCG GGCAA	979	20	520	540	CbsCbsGbsGmsGms (5MdC) s (5MdC) sdAs (5MdC) sdAsdAsdT _s (5MdC) s (5MdC) sdGsGmsGmsCbsAbsAb
ASO-STAT3-985	CCGATCTAGGCAGAT GTTGG	980	20	985	1005	CbsCbsGbsAmsTms (5MdC) sdTsdAsdGsdGs (5MdC) sdAsdGsdAsdT _s GmsTmsTbsGbsGb
ASO-STAT3-524	ACCGGGCCACAATCC GG	981	17	524	541	AbsCbsCbsdGsdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdAs (5MdC) sdAsdAsdT _s (5MdC) sCbsGbsGb
ASO-STAT3-1106	GCCGGTGCTGTACAA TGGGG	982	20	1106	1126	GbsCbsCbsGmsGmsdTsdGs (5MdC) sdTsdGsdTsdAs (5MdC) sdAsdAsTmsGmsGbsGbsGb
ASO-STAT3-517	GGCCACAATCCGGGC AATCT	983	20	517	537	GbsGbsCbsCmsAms (5MdC) sdAsdAsdT _s (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsdGs (5MdC) sAmsAmsTbsCbsTb
ASO-STAT3-1721	GGACCTCGGCCACTT GATCC	984	20	1721	1741	GbsGbsAbsCmsCmsdT _s (5MdC) sdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdAs (5MdC) sdTsdT _s GmsAmsTbsCbsCb
ASO-STAT3-1113	AGCATCGGCCGGTG TGTAC	985	20	1113	1133	AbsGbsCbsAmsTms (5MdC) sdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdGsdGsdTsdGs (5MdC) sTmsGmsTbsAbsCb
ASO-STAT3-992	TAGCCGATCTAGGCA G	986	16	992	1008	TbsAbsGbs (5MdC) s (5MdC) sdGsdAsdT _s (5MdC) sdTsdAsdGsdGsCbsAbsGb
ASO-STAT3-993	TAGCCGATCTAGGCA	987	15	993	1008	TbsAbsGbs (5MdC) s (5MdC) sdGsdAsdT _s (5MdC) sdTsdAsdGsGbsCbsAb
ASO-STAT3-1104	CGGTGCTGTACAATG GGGTC	988	20	1104	1124	CbsGbsGbsTmsGms (5MdC) sdTsdGsdTsdAs (5MdC) sdAsdAsdTsdGsGmsGmsGbsTbsCb

Фиг. 1Е

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	Положение мРНК (SEQ ID NO: 53)		Химическая структура ASO (Nb — LNA, dN — ДНК, (5MdC) — 5-метил-dC, Nm — MOE, s — фосфоротиоат)
				Начало	Конец	
ASO-NRas-180	GATTGTCAGTGGCT	989	15	180	195	GbsAbsTbsdTsdGsdTs (5MdC) sdAsdGsdTsdGs (5MdC) sGbsCbsTb
ASO-NRas-181	GGATTGTCAGTGGCG	990	15	181	196	GbsGbsAbsdTsdTsdGsdTs (5MdC) sdAsdGsdTs dGsCbsGbsCb
ASO-NRas-434	GAGTCTTTTACTCGC	991	15	434	449	GbsAbsGbsdTs (5MdC) sdTsdTsdTsdTsdAs (5M dC) sdTsCbsGbsCb
ASO-NRas-617	CGGTACTGGCGTATT	992	15	617	632	CbsGbsGbsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5MdC) sdGsdTsAbsTbsTb
ASO-NRas-618	TCGGTACTGGCGTAT	993	15	618	633	TbsCbsGbsdGsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5M dC) sdGsTbsAbsTb
ASO-NRas-619	TTCGGTACTGGCGTA	994	15	619	634	TbsTbsCbsdGsdGsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5MdC) sGbsTbsAb
ASO-NRas-620	ATTCGGTACTGGCGT	995	15	620	635	AbsTbsTbs (5MdC) sdGsdGsdTsdAs (5MdC) sdT sdGsdGsCbsGbsTb
ASO-NRas-3002	CCGGCTAATTGTAAC	996	15	3002	3017	CbsCbsGbsdGs (5MdC) sdTsdAsdAsdTsdTsdGs dTsAbsAbsCb
ASO-NRas-617	TCGGTACTGGCGTATT	997	16	617	633	TbsCbsGbsdGsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5M dC) sdGsdTsAbsTbsTb
ASO-NRas-618	TTCGGTACTGGCGTAT	998	16	618	634	TbsTbsCbsdGsdGsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5MdC) sdGsTbsAbsTb
ASO-NRas-619	ATTCGGTACTGGCGTA	999	16	619	635	AbsTbsTbs (5MdC) sdGsdGsdTsdAs (5MdC) sdT sdGsdGs (5MdC) sGbsTbsAb
ASO-NRas-615	CGGTACTGGCGTATTT C	1000	17	615	632	CbsGbsGbsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5MdC) sdGsdTsdAsdTsbTbsTbsCb
ASO-NRas-616	TCGGTACTGGCGTATT T	1001	17	616	633	TbsCbsGbsdGsdTsdAs (5MdC) sdTsdGsdGs (5M dC) sdGsdTsdAsTbsTbsTb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-617	TTCGGTACTGGCGTAT T	1002	17	617	634	TbsTbsCbsdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsAbsTbsTb
ASO-NRas-618	ATTCGGTACTGGCGTA T	1003	17	618	635	AbsTbsTbs (5Mdc) sdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsTbsAbsTb
ASO-NRas-619	CATTCGGTACTGGCGT A	1004	17	619	636	CbsAbsTbsdTs (5Mdc) sdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sGbsTbsAb
ASO-NRas-620	TCATTCGGTACTGGCG T	1005	17	620	637	TbsCbsAbsdTs (5Mdc) sdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGsCbsGbsTb
ASO-NRas-134	CCACCAGTTTGTACTC AGTC	1006	20	134	154	CbsCbsAbsCmsCmsdAsdGsdTsdTsdTsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsCmsAmsGbsTbsCb
ASO-NRas-176	GGATTGTCAGTGCCT TTTC	1007	20	176	196	GbsGbsAbsTmsTmsdGsdTs (5Mdc) sdAsdGsdTs dGs (5Mdc) sdGs (5Mdc) sTmsTmsTbsTbsCb
ASO-NRas-179	GCTGGATTGTCAGTGC GCTT	1008	20	179	199	GbsCbsTbsGmsGmsdAsdTs (5Mdc) sdAsdGsdTsdGsCmsGmsCbsTbsTb
ASO-NRas-180	AGCTGGATTGTCAGTG CGCT	1009	20	180	200	AbsGbsCbsTmsGmsdGsdAsdTs (5Mdc) sdAsdGsdTsGmsCmsGbsCbsTb
ASO-NRas-181	TAGCTGGATTGTCAGT GCGC	1010	20	181	201	TbsAbsGbsCmsTmsdGsdGsdAsdTs (5Mdc) sdAsdGsTmsGmsCbsGbsCb
ASO-NRas-183	ATTAGCTGGATTGTCA GTGC	1011	20	183	203	AbsTbsTbsAmsGms (5Mdc) sdTsdGsdGsdAsdTs dTsdGsdTs (5Mdc) sAmsGmsTbsGbsCb
ASO-NRas-325	GTATTGGTCTCTCATG GCAC	1012	20	325	345	GbsTbsAbsTmsTmsdGsdGsdTs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsdTsGmsGmsCbsAbsCb
ASO-NRas-337	GCCTGTCCTCATGTAT TGGT	1013	20	337	357	GbsCbsCbsTmsGmsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsdTsGsdTsAsTmsTmsGbsGbsTb
ASO-NRas-338	CGCCTGTCCTCATGTA TTGG	1014	20	338	358	CbsGbsCbsCmsTmsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsdTsGsdTsAmsTmsTbsGbsGb
ASO-NRas-341	CTTCGCCTGTCCTCAT GTAT	1015	20	341	361	CbsTbsTbsCmsGms (5Mdc) s (5Mdc) sdTsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsTmsGmsTbsAbsTb
ASO-NRas-378	GACTTGCTATTATTGA TGGC	1016	20	378	398	GbsAbsCbsTmsTmsdGs (5Mdc) sdTsdAsdTs dAsdTsTsdGsAmsTmsGbsGbsCb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-379	TGACTTGCTATTATTG ATGG	1017	20	379	399	TbsGbsAbsCmsTmsdTsdGs (5MdC) sdTsdAsdTsdTsGmsAmsTbsGbsGb
ASO-NRas-388	ATCCGCAAATGACTTG CTAT	1018	20	388	408	AbstbsCbsCmsGms (5MdC) sdAsdAsdAsdTsdGs dAs (5MdC) sdTsdTsGmsCmsTbsAbsTb
ASO-NRas-389	TATCCGCAAATGACTT GCTA	1019	20	389	409	TbsAbsTbsCmsCmsdGs (5MdC) sdAsdAsdAsdTsdGs dAs (5MdC) sdTsTmsGmsCbsTbsAb
ASO-NRas-399	TAGAGGTAAATATCCG CAAA	1020	20	399	419	TbsAbsGbsAmsGmsdGsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdTsdTs (5MdC) s (5MdC) sGmsCmsAbsAbsAb
ASO-NRas-400	GTAGAGGTAAATATCC GCAA	1021	20	400	420	GbsTbsAbsGmsAmsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdTsdTs (5MdC) sCmsGmsCbsAbsAb
ASO-NRas-401	TGTAGAGGTAAATATC CGCA	1022	20	401	421	TbsGbsTbsAmsGmsdAsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdTsdTsCmsCmsGbsCbsAb
ASO-NRas-402	CTGTAGAGGTAAATAT CCGC	1023	20	402	422	CbsTbsGbsTmsAmsdGsdAsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdTsdAsTmsCmsCbsGbsCb
ASO-NRas-408	TGCTCCCTGTAGAGGT TAAT	1024	20	408	428	TbsGbsCbsTmsCms (5MdC) s (5MdC) sdTsdGsdTsdAsdGsdAsdGsdGsTmsTmsAbsAbsTb
ASO-NRas-421	TACTCGCTTAATCTGC TCCC	1025	20	421	441	TbsAbsCbsTmsCmsdGs (5MdC) sdTsdTsdAsdAsdTsdTs (5MdC) sdTsdGsCmsTmsCbsCbsCb
ASO-NRas-422	TTACTCGCTTAATCTG CTCC	1026	20	422	442	TbsTbsAbsCmsTms (5MdC) sdGs (5MdC) sdTsdTsdAsdAsdTsdTs (5MdC) sdTsGmsCmsTbsCbsCb
ASO-NRas-429	GAGTCTTTTACTCGCT TAAT	1027	20	429	449	GbsAbsGbsTmsCmsdTsdTsdTsdTsdAs (5MdC) sdTs (5MdC) sdGs (5MdC) sTmsTmsAbsAbsTb
ASO-NRas-490	ATCAACTGTCCTTGTT GGCA	1028	20	490	510	AbstbsCbsAmsAms (5MdC) sdTsdGsdTs (5MdC) s (5MdC) sdTsdTsdGsdTsTmsGmsGbsCbsAb
ASO-NRas-513	GCCAGTTCGTGGGCTT GTTT	1029	20	513	533	GbsCbsCbsAmsGmsdTsdTs (5MdC) sdGsdTsdGs dGsdGs (5MdC) sdTsTmsGmsTbsTbsTb
ASO-NRas-514	GGCCAGTTCGTGGGCT TGTT	1030	20	514	534	GbsGbsCbsCmsAmsdGsdTsdTs (5MdC) sdGsdTs dGsdGsdGs (5MdC) sTmsTmsGbsTbsTb
ASO-NRas-520	ACTCTTGGCCAGTTCG TGGG	1031	20	520	540	AbstbsTbsCmsTmsdTsdGsdGs (5MdC) s (5MdC) sdAsdGsdTsdTs (5MdC) sGmsTmsGbsGbsGb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-521	AACTCTTGGCCAGTTCGTGG	1032	20	521	541	AbsAbsCbsTmsCmsdTsdTsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdGsdTsdTsCmsGmsTbsGbsGb
ASO-NRas-522	TAACTCTTGGCCAGTTCGTG	1033	20	522	542	TbsAbsAbsCmsTms (5Mdc) sdTsdTsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdGsdTsTmsCmsGbsTbsGb
ASO-NRas-524	CGTAACTCTTGGCCAGTTCG	1034	20	524	544	CbsGbsTbsAmsAms (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTsdTsdGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsGmsTmsTbsCbsGb
ASO-NRas-532	TGGAATCCCGTAACTCTTGG	1035	20	532	552	TbsGbsGbsAmsAmsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdTsdAsdAs (5Mdc) sdTsCmsTmsTbsGbsGb
ASO-NRas-534	AATGGAATCCCGTAACTCTT	1036	20	534	554	AbsAbsTbsGmsGmsdAsdAsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdTsdAsdAsCmsTmsCbsTbsTb
ASO-NRas-535	GAATGGAATCCCGTAACCTCT	1037	20	535	555	GbsAbsAbsTmsGmsdGsdAsdAsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdTsdAsAmsCmsTbsCbsTb
ASO-NRas-536	TGAATGGAATCCCGTAACCTC	1038	20	536	556	TbsGbsAbsAmsTmsdGsdGsdAsdAsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdGsdTsAmsAmsCbsTbsCb
ASO-NRas-537	ATGAATGGAATCCCGTAACCT	1039	20	537	557	AbsTbsGbsAmsAmsdTsdGsdGsdAsdAsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdGsTmsAmsAbsCbsTb
ASO-NRas-539	CAATGAATGGAATCCCGTAAC	1040	20	539	559	CbsAbsAbsTmsGmsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdAsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sCmsGmsTbsAbsAb
ASO-NRas-604	GCGTATTTCTCTTACCAGTG	1041	20	604	624	GbsCbsGbsTmsAmsdTsdTsdTs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTsdTsdAs (5Mdc) sCmsAmsGbsTbsGb
ASO-NRas-611	GGTACTGGCGTATTTCTCTT	1042	20	611	631	GbsGbsTbsAmsCmsdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsAsdTsdTsdTsCmsTmsCbsTbsTb
ASO-NRas-612	CGGTACTGGCGTATTTCTCT	1043	20	612	632	CbsGbsGbsTmsAms (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsdAsdTsdTsTmsCmsTbsCbsTb
ASO-NRas-613	TCGGTACTGGCGTATTCTCT	1044	20	613	633	TbsCbsGbsGmsTmsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsdAsdTsdTsTmsTmsCbsTbsCb
ASO-NRas-614	TTCGGTACTGGCGTATTCTCT	1045	20	614	634	TbsTbsCbsGmsGmsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsdAsTmsTmsTbsCbsTb
ASO-NRas-615	ATTCGGTACTGGCGTATTCTCT	1046	20	615	635	AbsTbsTbsCmsGmsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sdGsdTsAmsTmsTbsTbsCb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-616	CATTCGGTACTGGCGT ATTT	1047	20	616	636	CbsAbsTbsTmsCmsdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTs dGsdGs (5Mdc) sdGsTmsAmsTbsTbsTb
ASO-NRas-617	TCATTCGGTACTGGCG TATT	1048	20	617	637	TbsCbsAbsTmsTms (5Mdc) sdGsdGsdTsdAs (5M dc) sdTsdGsdGs (5Mdc) sGmsTmsAbsTbsTb
ASO-NRas-618	TTCATTCGGTACTGGC GTAT	1049	20	618	638	TbsTbsCbsAmsTmsdTs (5Mdc) sdGsdGsdTsdAs (5Mdc) sdTsdGsdGsCmsGmsTbsAbsTb
ASO-NRas-619	TTTCATTCGGTACTGG CGTA	1050	20	619	639	TbsTbsTbsCmsAmsdTs (5Mdc) sdGsdGsdTs dAs (5Mdc) sdTsdGsGmsCmsGbsTbsAb
ASO-NRas-620	TTTTTCATTCGGTACTG GCGT	1051	20	620	640	TbsTbsTbsTmsCmsdAsdTs (5Mdc) sdGsdGs dTs (5Mdc) sdTsGmsGmsCbsGbsTb
ASO-NRas-622	TTTTTTCATTCGGTAC TGGC	1052	20	622	642	TbsTbsTbsTmsTmsdTs (5Mdc) sdAsdTs (5M dc) sdGsdGsdTsCmsTmsGbsGbsCb
ASO-NRas-623	GTTTTTTCATTCGGTA CTGG	1053	20	623	643	GbsTbsTbsTmsTmsdTs (5Mdc) sdAsdTs (5Mdc) sdGsdGsdTsAmsCmsTbsGbsGb
ASO-NRas-624	AGTTTTTTCATTCGGT ACTG	1054	20	624	644	AbsGbsTbsTmsTmsdTs (5Mdc) sdAsdTs dTs (5Mdc) sdGsdGsTmsAmsCbsTbsGb
ASO-NRas-690	GTATCTTGTTACATCA CCAC	1055	20	690	710	GbsTbsAbsTmsCmsdTs (5Mdc) sdAsdTs (5Mdc) sdAsdTs (5Mdc) sAmsCmsCbsAbsCb
ASO-NRas-691	AGTATCTTGTTACATC ACCA	1056	20	691	711	AbsGbsTbsAmsTms (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTs dAs (5Mdc) sdAsdTsCmsAmsCbsCbsAb
ASO-NRas-731	GTGCAGCTTGAAAGTG GCTC	1057	20	731	751	GbsTbsGbsCmsAmsdGs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTs dAs (5Mdc) sdAsdGsTsGmsGmsCbsTbsCb
ASO-NRas-835	GTAATAAATACTGAG AGCT	1058	20	835	855	GbsTbsAbsCmsTmsdAsdAs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTsGsdAsGmsAmsGbsCbsTb
ASO-NRas-836	TGTAATAAATACTGA GAGC	1059	20	836	856	TbsGbsTbsAmsCmsdTs (5Mdc) sdAsdAs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTsGsdAsGmsAmsGbsCbsCb
ASO-NRas-918	GGGAGTAACAAGAGGT GCAT	1060	20	918	938	GbsGbsGbsAmsGmsdTs (5Mdc) sdAsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) sdGsGsdGsTmsGmsCbsAbsTb
ASO-NRas-922	AACAGGGAGTAACAAG AGGT	1061	20	922	942	AbsAbsCbsAmsGmsdGs (5Mdc) sdAsdAs (5Mdc) sdAsdAsGmsAmsGbsGbsTb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-1072	GTTGCTACTTTAGAGC TCAA	1062	20	1072	1092	GbsTbsTbsGmsCmsdTsdAs (5Mdc) sdTsdTsdTs dAsdGsdAsdGsCmsTmsCbsAbsAb
ASO-NRas-1074	CAGTTGCTACTTTAGA GCTC	1063	20	1074	1094	CbsAbsGbsTmsTmsdGs (5Mdc) sdTsdAs (5Mdc) sdTsdTsdTsdAsdGsAmsGmsCbsTbsCb
ASO-NRas-1313	GAAAGTTGGATTTAAT TACG	1064	20	1313	1333	GbsAbsAbsAmsGmsdTsdTsdGsdGsdAsdTsdTsd TsdAsdAsTmsTmsAbsCbsGb
ASO-NRas-1475	GCATCTGCTCTCAAAT AGAT	1065	20	1475	1495	GbsCbsAbsTmsCmsdTsdGs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdTs (5Mdc) sdAsdAsdAsTmsAmsGbsAbsTb
ASO-NRas-1617	TATAGGTAGTAACCTA TGAA	1066	20	1617	1637	TbsAbsTbsAmsGmsdTsdAsdGsdTsdAsdAs (5Mdc) s (5Mdc) sdTsAmsTmsCbsAbsAb
ASO-NRas-1618	GTATAGGTAGTAACCT ATGA	1067	20	1618	1638	GbsTbsAbsTmsAmsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdAsd As (5Mdc) s (5Mdc) sTmsAmsTbsGbsAb
ASO-NRas-1621	ATTGTATAGGTAGTAA CCTA	1068	20	1621	1641	AbsTbsTbsGmsTmsdTsdAsdTsdAsdGsdGsdTsdAsd GsdTsdAsAmsCmsCbsTbsAb
ASO-NRas-1622	CATTGTATAGGTAGTA ACCT	1069	20	1622	1642	CbsAbsTbsTmsGmsdTsdAsdTsdAsdGsdGsdTsd AsdGsdTsAmsAmsCbsCbsTb
ASO-NRas-1623	ACATTGTATAGGTAGT AACC	1070	20	1623	1643	AbsCbsAbsTmsTmsdTsdGsdTsdAsdTsdAsdGsdGsd TsdAsdGsTmsAmsAbsCbsCb
ASO-NRas-1956	CCCTGGTCCATTAGCA CCAT	1071	20	1956	1976	CbsCbsCbsTmsGmsdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdA sdTsdTsdAsdGs (5Mdc) sAmsCmsCbsAbsTb
ASO-NRas-1957	ACCCTGGTCCATTAGC ACCA	1072	20	1957	1977	AbsCbsCbsCmsTmsdTsdGsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTsdAsdGsCmsAmsCbsCbsAb
ASO-NRas-1958	GACCCTGGTCCATTAG CACC	1073	20	1958	1978	GbsAbsCbsCmsCmsdTsdGsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTsdAsGmsCmsAbsCbsCb
ASO-NRas-1959	TGACCCTGGTCCATTA GCAC	1074	20	1959	1979	TbsGbsAbsCmsCms (5Mdc) sdTsdGsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTsdTsAmsGmsCbsAbsCb
ASO-NRas-1962	CTGTGACCCTGGTCCA TTAG	1075	20	1962	1982	CbsTbsGbsTmsGmsdTsdAs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdTsdGsdGsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sAmsTmsTbs AbsGb
ASO-NRas-1965	AAACTGTGACCCTGGT CCAT	1076	20	1965	1985	AbsAbsAbsCmsTmsdTsdGsdTsdGsdAs (5Mdc) s (5Mdc) s (5Mdc) sdTsdGsdGsTmsCmsCbsAbsTb

Фиг. 1Е (продолжение)

ASO-NRas-2113	GTAAAGGGTTTGTGCTAACT	1077	20	2113	2133	GbsTbsAbsAmsAmsdGsdGsdGsdTsdTsdTsdGsdTsdGs (5Mdc) sTmsAmsAbsCbsTb
ASO-NRas-2114	GGTAAAGGGTTTGTGCTAAC	1078	20	2114	2134	GbsGbsTbsAmsAmsdAsdGsdGsdGsdTsdTsdTsdGsdTsdGsCmsTmsAbsAbsCb
ASO-NRas-2122	CCAGTCATGGTAAAGGGTTT	1079	20	2122	2142	CbsCbsAbsGmsTms (5Mdc) sdAsdTsdGsdGsdTs dAsdAsdAsdGsGmsGmsTbsTbsTb
ASO-NRas-2417	TACCAGGGTATTATCTGCAA	1080	20	2417	2437	TbsAbsCbsCmsAmsdGsdGsdGsdTsdAsdTsdTsdAsdTsdTs (5Mdc) sTmsGmsCbsAbsAb
ASO-NRas-2419	ATTACCAGGGTATTATCTGCTGC	1081	20	2419	2439	AbsTbsTbsAmsCms (5Mdc) sdAsdGsdGsdGsdTs dAsdTsdTsdAsTmsCmsTbsGbsCb
ASO-NRas-2759	CTGAGGTGATAAGCCTCAGG	1082	20	2759	2779	CbsTbsGbsAmsGmsdGsdTsdGsdAsdTsdAsdAsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sTmsCmsAbsGbsGb
ASO-NRas-2760	ACTGAGGTGATAAGCCTCAG	1083	20	2760	2780	AbsCbsTbsGmsAmsdGsdGsdTsdGsdAsdTsdAsdAsdTsdGs (5Mdc) sCmsTmsCbsAbsGb
ASO-NRas-2761	GACTGAGGTGATAAGCCTCA	1084	20	2761	2781	GbsAbsCbsTmsGmsdAsdGsdGsdTsdGsdAsdTsdAsdTsdGsCmsCmsTbsCbsAb
ASO-NRas-2886	CATACAAGGGCTATTGCGAC	1085	20	2886	2906	CbsAbsTbsAmsCmsdAsdAsdGsdGsdGs (5Mdc) s dTsdAsdTsdTsGmsGmsCbsAbsCb
ASO-NRas-3557	GACTAAACATGGGCCCCACTA	1086	20	3557	3577	GbsAbsCbsTmsAmsdAsdAs (5Mdc) sdAsdTsdGs dGsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sCmsAmsCbsTbsAb
ASO-NRas-4027	TCCATCTTAGGTCAGTACTC	1087	20	4027	4047	TbsCbsCbsAmsTms (5Mdc) sdTsdTsdAsdTsdGs dTs (5Mdc) sdAsdTsdTsAmsCbsTbsCb
ASO-NRas-4082	GTCTTACAACCTCCACGGAC	1088	20	4082	4102	GbsTbsCbsTmsTmsdAs (5Mdc) sdAsdAs (5Mdc) sdTsdTs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsCmsGmsGbsAbsCb

Фиг. 1F

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
807	5,574	5,587	212	225	TCAGCTCCAACTAC	ASO-KRAS-0004	TbsCbsAbsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sTbsAbsCb
808	5,575	5,588	213	226	ATCAGCTCCAACTA	ASO-KRAS-0005	AbsTbsCbsdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAsCbsTbsAb
809	5,576	5,589	214	227	CATCAGCTCCAACT	ASO-KRAS-0006	CbsAbsTbs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)s dAsAbsCbsTb
810	5,577	5,590	215	228	CCATCAGCTCCAAC	ASO-KRAS-0007	CbsCbsAbsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sAbsAbsCb
811	5,578	5,591	216	229	GCCATCAGCTCCAA	ASO-KRAS-0008	GbsCbsCbsdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s CbsAbsAb
812	5,579	5,592	217	230	CGCCATCAGCTCCA	ASO-KRAS-0009	CbsGbsCbs(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs CbsCbsAb
813	5,580	5,593	218	231	ACGCCATCAGCTCC	ASO-KRAS-0010	AbsCbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sTbsCbsCb
814	5,581	5,594	219	232	TACGCCATCAGCTC	ASO-KRAS-0011	TbsAbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs CbsTbsCb
815	5,582	5,595	220	233	CTACGCCATCAGCT	ASO-KRAS-0012	CbsTbsAbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)s dAsGbsCbsTb
816	5,583	5,596	221	234	CCTACGCCATCAGC	ASO-KRAS-0013	CbsCbsTbsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sAbsGbsCb
817	5,584	5,597	222	235	GCCTACGCCATCAG	ASO-KRAS-0014	GbsCbsCbsdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs CbsAbsGb
818	5,585	5,598	223	236	TGCCTACGCCATCA	ASO-KRAS-0015	TbsGbsCbs(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)s dAsTbsCbsAb
819	5,586	5,599	224	237	TTGCCTACGCCATC	ASO-KRAS-0016	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s (5MdC)sAbsTbsCb
820	5,587	5,600	225	238	CTTGCCTACGCCAT	ASO-KRAS-0017	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsAbsTb
821	5,573	5,587	211	225	TCAGCTCCAACTACC	ASO-KRAS-0018	TbsCbsAbsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsAbsCbsCb
822	5,574	5,588	212	226	ATCAGCTCCAACTAC	ASO-KRAS-0019	AbsTbsCbsdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sTbsAbsCb
823	5,575	5,589	213	227	CATCAGCTCCAACTA	ASO-KRAS-0020	CbsAbsTbs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)s dAsdAsCbsTbsAb

Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
824	5,576	5,590	214	228	CCATCAGCTCCAACT	ASO-KRAS-0021	CbsCbsAbsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsAbsCbsT _b
825	5,577	5,591	215	229	GCCATCAGCTCCAAC	ASO-KRAS-0022	GbsCbsCbsdAsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)sAbsAbsCb
826	5,578	5,592	216	230	CGCCATCAGCTCCAA	ASO-KRAS-0023	CbsGbsCbs(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)sCbsAbsAb
827	5,579	5,593	217	231	ACGCCATCAGCTCCA	ASO-KRAS-0024	AbsCbsGbs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s CbsCbsAb
828	5,580	5,594	218	232	TACGCCATCAGCTCC	ASO-KRAS-0025	TbsAbsCbsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)sTbsCbsCb
829	5,581	5,595	219	233	CTACGCCATCAGCTC	ASO-KRAS-0026	CbsTbsAbs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGsCbsTbsCb
830	5,582	5,596	220	234	CCTACGCCATCAGCT	ASO-KRAS-0027	CbsCbsTbsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsGbsCbsT _b
831	5,583	5,597	221	235	GCCTACGCCATCAGC	ASO-KRAS-0028	GbsCbsCbsdTsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)sAbsGbsCb
832	5,584	5,598	222	236	TGCCTACGCCATCAG	ASO-KRAS-0029	TbsGbsCbs(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s CbsAbsGb
833	5,585	5,599	223	237	TTGCCTACGCCATCA	ASO-KRAS-0030	TbsTbsCbs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsTbsCbsAb
834	5,586	5,600	224	238	CTTGCTACGCCATC	ASO-KRAS-0031	CbsTbsTbsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)sAbsTbsCb
835	5,587	5,601	225	239	TCTTGCTACGCCAT	ASO-KRAS-0032	TbsCbsTbsdTsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)sCbsAbsT _b
836	5,572	5,587	210	225	TCAGCTCCAACTACCA	ASO-KRAS-0033	TbsCbsAbsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdAs(5M _d C)s _d TsdAsCbsCbsAb
837	5,573	5,588	211	226	ATCAGCTCCAACTACC	ASO-KRAS-0034	AbsTbsCbsdAsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdAs(5M _d C)s _d TsAbsCbsCb
838	5,574	5,589	212	227	CATCAGCTCCAACTAC	ASO-KRAS-0035	CbsAbsTbs(5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdAs(5M _d C)sTbsAbsCb

Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
839	5,575	5,590	213	228	CCATCAGCTCCAACTA	ASO-KRAS-0036	CbsCbsAbsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdAsCbsTbsAb
840	5,576	5,591	214	229	GCCATCAGCTCCAACT	ASO-KRAS-0037	GbsCbsCbsdAsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)s _d AsAbsCbsTb
841	5,577	5,592	215	230	CGCCATCAGCTCCAAC	ASO-KRAS-0038	CbsGbsCbs(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)s(5M _d C)sAbsAbsCb
842	5,578	5,593	216	231	ACGCCATCAGCTCCAA	ASO-KRAS-0039	AbsCbsGbs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s (5M _d C)sCbsAbsAb
843	5,579	5,594	217	232	TACGCCATCAGCTCCA	ASO-KRAS-0040	TbsAbsCbsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)s _d T _s CbsCbsAb
844	5,580	5,595	218	233	CTACGCCATCAGCTCC	ASO-KRAS-0041	CbsTbsAbs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGs(5M _d C)sTbsCbsCb
845	5,581	5,596	219	234	CCTACGCCATCAGCTC	ASO-KRAS-0042	CbsCbsTbsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsdGsCbsTbsCb
846	5,582	5,597	220	235	GCCTACGCCATCAGCT	ASO-KRAS-0043	GbsCbsCbsdTsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)s _d AsGbsCbsTb
847	5,583	5,598	221	236	TGCCTACGCCATCAGC	ASO-KRAS-0044	TbsGbsCbs(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s (5M _d C)sAbsGbsCb
848	5,584	5,599	222	237	TTGCCTACGCCATCAG	ASO-KRAS-0045	TbsTbsGbs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsdT _s CbsAbsGb
849	5,585	5,600	223	238	CTTGCCTACGCCATCA	ASO-KRAS-0046	CbsTbsTbsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)s _d AsTbsCbsAb
850	5,586	5,601	224	239	TCTTGCCTACGCCATC	ASO-KRAS-0047	TbsCbsTbsdTsdGs(5M _d C)s(5M _d C)s _d TsdAs(5M _d C)s _d Gs(5M _d C)s(5M _d C)sAbsTbsCb

Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
851	5,587	5,602	225	240	CTCTTGCCTACGCCAT	ASO-KRAS-0048	CbsTbsCbsdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsAbsTb
852	5,571	5,587	209	225	TCAGCTCCAACTACCAC	ASO-KRAS-0049	TbsCbsAbsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sCbsAbsCb
853	5,572	5,588	210	226	ATCAGCTCCAACTACCA	ASO-KRAS-0050	AbsTbsCbsdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdAsCbsCbsAb
854	5,573	5,589	211	227	CATCAGCTCCAACTACC	ASO-KRAS-0051	CbsAbsTbs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsAbsCbsCb
855	5,574	5,590	212	228	CCATCAGCTCCAACTAC	ASO-KRAS-0052	CbsCbsAbsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sTbsAbsCb
856	5,575	5,591	213	229	GCCATCAGCTCCAACTA	ASO-KRAS-0053	GbsCbsCbsdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAsCbsTbsAb
857	5,576	5,592	214	230	CGCCATCAGCTCCAACT	ASO-KRAS-0054	CbsGbsCbs(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsAbsCbsTb
858	5,577	5,593	215	231	ACGCCATCAGCTCCAAC	ASO-KRAS-0055	AbsCbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sAbsAbsCb
859	5,578	5,594	216	232	TACGCCATCAGCTCCAA	ASO-KRAS-0056	TbsAbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sCbsAbsAb
860	5,579	5,595	217	233	CTACGCCATCAGCTCCA	ASO-KRAS-0057	CbsTbsAbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdTsCbsCbsAb
861	5,580	5,596	218	234	CCTACGCCATCAGCTCC	ASO-KRAS-0058	CbsCbsTbsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sTbsCbsCb

Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
862	5,581	5,597	219	235	GCCTACGCCATCAGCTC	ASO-KRAS-0059	GbsCbsCbsdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsdGsCbsTbsCb
863	5,582	5,598	220	236	TGCCTACGCCATCAGCT	ASO-KRAS-0060	TbsGbsCbs(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdAsGbsCbsTb
864	5,583	5,599	221	237	TTGCCTACGCCATCAGC	ASO-KRAS-0061	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sAbsGbsCb
865	5,584	5,600	222	238	CTTGCCTACGCCATCAG	ASO-KRAS-0062	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsdTsCbsAbsGb
866	5,585	5,601	223	239	TCTTGCCTACGCCATCA	ASO-KRAS-0063	TbsCbsTbsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsTbsCbsAb
867	5,586	5,602	224	240	CTCTTGCCTACGCCATC	ASO-KRAS-0064	CbsTbsCbsdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sAbsTbsCb
868	5,587	5,603	225	241	ACTCTTGCCTACGCCAT	ASO-KRAS-0065	AbsCbsTbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsAbsTb
869	5,568	5,587	206	225	TCAGCTCCAACTACCACAAG	ASO-KRAS-0066	TbsCbsAbsGmsCmsdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdAs(5MdC)s(5MdC)sAmsCmsAbsAbsGb
870	5,569	5,588	207	226	ATCAGCTCCAACTACCACAA	ASO-KRAS-0067	AbsTbsCbsAmsGms(5MdC)sdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sCmsAmsCbsAbsAb
871	5,570	5,589	208	227	CATCAGCTCCAACTACCACA	ASO-KRAS-0068	CbsAbsTbsCmsAmsdGs(5MdC)sdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdAsCmsCmsAbsCbsAb

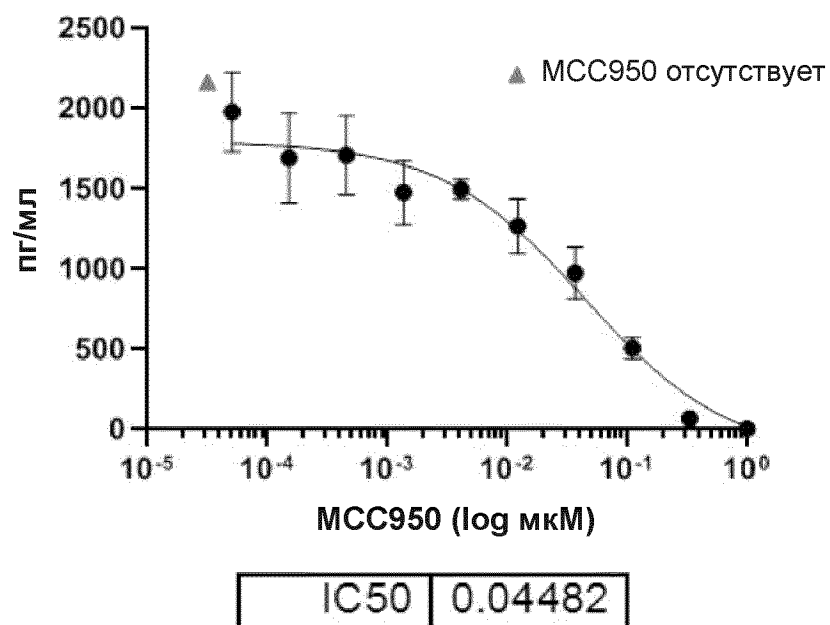
Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
872	5,571	5,590	209	228	CCATCAGCTCCAAC CCAC	ASO-KRAS-0069	CbsCbsAbsTmsCmsdAsdGs(5MdC)sdT(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sdTAsmsCmsCbsAbsCb
873	5,572	5,591	210	229	GCCATCAGCTCCAAC TACCA	ASO-KRAS-0070	GbsCbsCbsAmsTms(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sTmsAmsCbsCbsAb
874	5,573	5,592	211	230	CGCCATCAGCTCCAA CTACC	ASO-KRAS-0071	CbsGbsCbsCmsAmsdT(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)s(5MdC)sdTsdAsCmsTmsAbsCbsCb
875	5,574	5,593	212	231	ACGCCATCAGCTCCA ACTAC	ASO-KRAS-0072	AbsCbsGbsCmsCmsdTsdTs(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)s(5MdC)sdTsdAsAmsCmsTbsAbsCb
876	5,575	5,594	213	232	TACGCCATCAGCTCC AACTA	ASO-KRAS-0073	TbsAbsCbsGmsCms(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)s(5MdC)sAmsAmsCbsTbsAb
877	5,576	5,595	214	233	CTACGCCATCAGCTC CAACT	ASO-KRAS-0074	CbsTbsAbsCmsGms(5MdC)s(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)sCmsAmsAbsCbsTb
878	5,577	5,596	215	234	CCTACGCCATCAGCT CCAAC	ASO-KRAS-0075	CbsCbsTbsAmsCmsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sdT(5MdC)sCmsCmsAbsAbsCb
879	5,578	5,597	216	235	GCCTACGCCATCAGC TCCAA	ASO-KRAS-0076	GbsCbsCbsTmsAms(5MdC)sdTGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGs(5MdC)sTmsCmsCbsAbsAb
880	5,579	5,598	217	236	TGCCTACGCCATCAG CTCCA	ASO-KRAS-0077	TbsGbsCbsCmsTmsdTsdAs(5MdC)sdTGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGsCmsTmsCbsCbsAb
881	5,580	5,599	218	237	TTGCCTACGCCATCA GCTCC	ASO-KRAS-0078	TbsTbsGbsCmsCmsdTsdAs(5MdC)sdTGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTs(5MdC)sdTsdGsGmsCmsTbsCbsCb

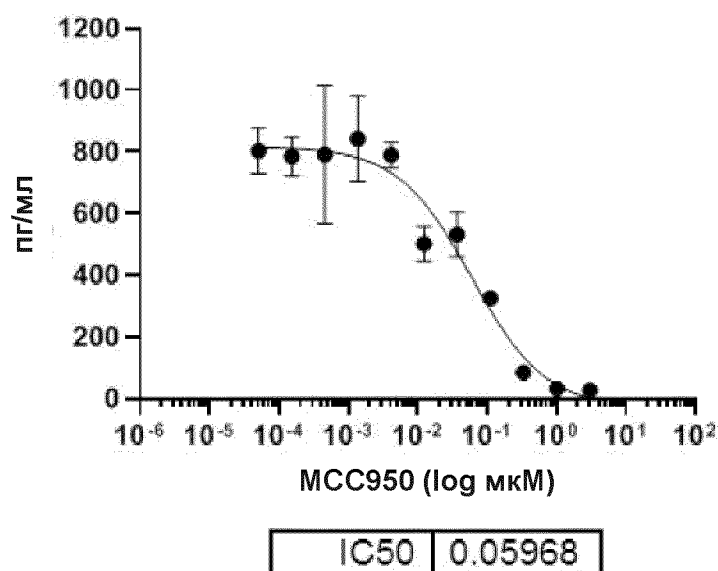
Фиг. 1F (продолжение)

SEQ ID No.	Начало (SEQ ID NO: 31)	Конец (SEQ ID NO: 31)	Начало (SEQ ID NO: 33)	Конец (SEQ ID NO: 33)	Последовательность ASO	ASO №	ASO с химической структурой
882	5,581	5,600	219	238	CTTGCCTACGCCATC AGCTC	ASO-KRAS-0079	CbsTbsTbsGmsCms (5Mdc) sdTsdAs (5Mdc) s dGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTbs (5Mdc) sAmsGm sCbsTbsCb
883	5,582	5,601	220	239	TCTTGCCTACGCCAT CAGCT	ASO-KRAS-0080	TbsCbsTbsTmsGms (5Mdc) s (5Mdc) sdTsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsdTbsCmsAm sGbsCbsTb
884	5,583	5,602	221	240	CTCTTGCCTACGCCA TCAGC	ASO-KRAS-0081	CbsTbsCbsTmsTmsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdTs dAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdAsTmsCm sAbsGbsCb
885	5,584	5,603	222	241	ACTCTTGCCTACGCC ATCAG	ASO-KRAS-0082	AbsCbsTbsCmsTmsdTsdGs (5Mdc) s (5Mdc) s dTsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) s (5Mdc) sAmsTm sCbsAbsGb
886	5,585	5,604	223	242	CACTCTTGCCTACGC CATCA	ASO-KRAS-0083	CbsAbsCbsTmsCmsdTsdTsdGs (5Mdc) s (5Mdc) C) sdTsdAs (5Mdc) sdGs (5Mdc) sCmsAmsTbs CbsAb
887	5,586	5,605	224	243	GCACTCTTGCCTACG CCATC	ASO-KRAS-0084	GbsCbsAbsCmsTms (5Mdc) sdTsdTsdGs (5Mdc) C) s (5Mdc) sdTsdAs (5Mdc) sdGsCmsCmsAbs TbsCb
888	5,587	5,606	225	244	GGCACTCTTGCCTAC GCCAT	ASO-KRAS-0085	GbsGbsCbsAmsCmsdTbs (5Mdc) sdTsdTsdGs (5Mdc) s (5Mdc) sdTsdAs (5Mdc) sGmsCmsCbs AbsTb

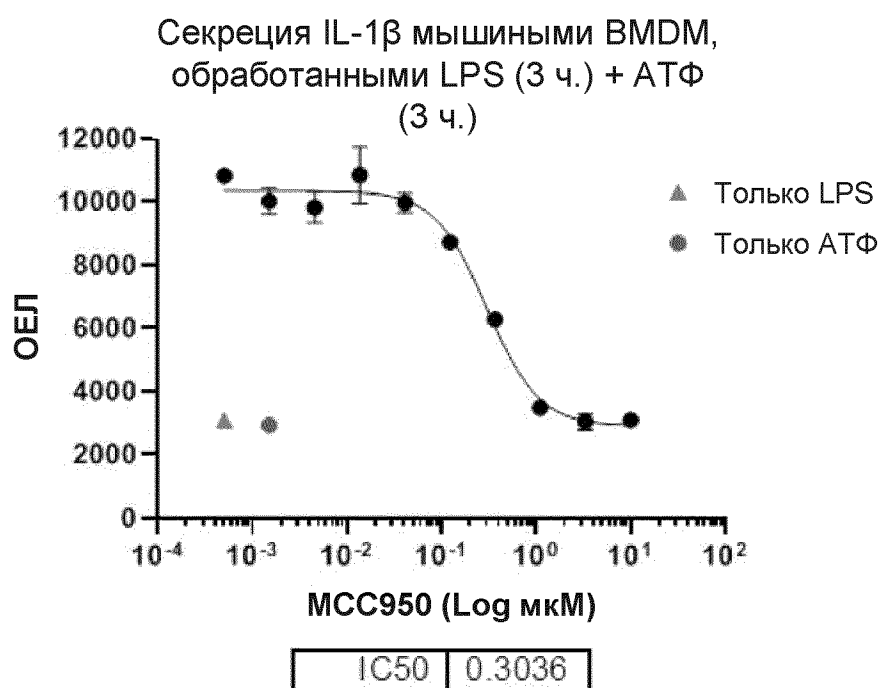
Фиг. 2А

Выработка IL-1 β моноцитами

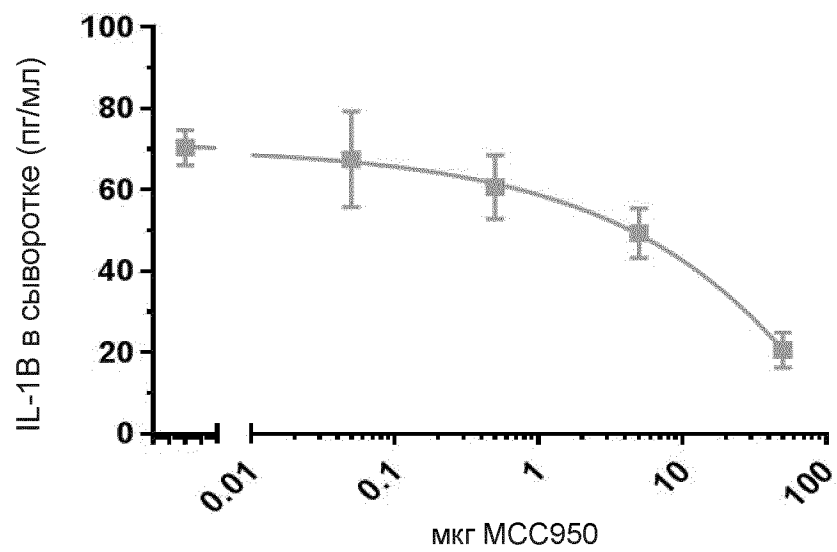
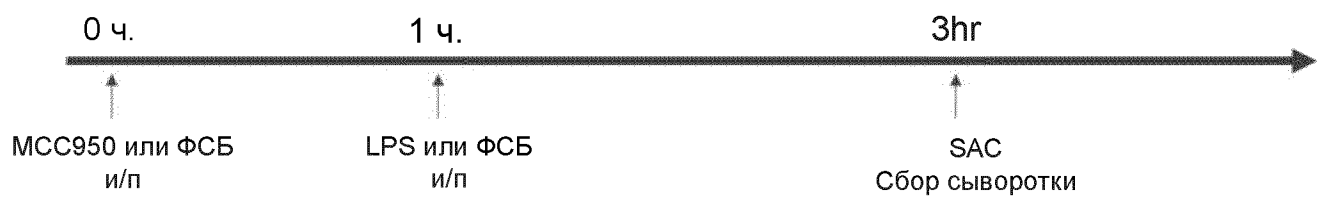
Фиг. 2В

Выработка IL-1 β макрофагами M0

Фиг. 2С

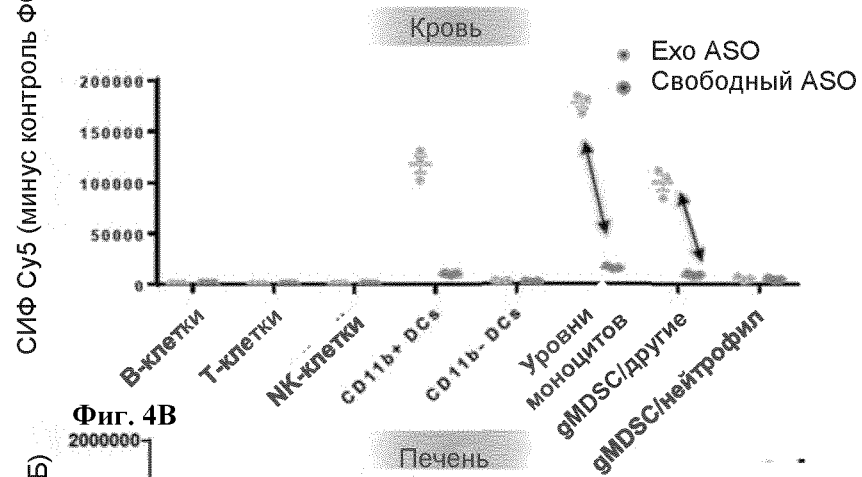


Фиг. 3А

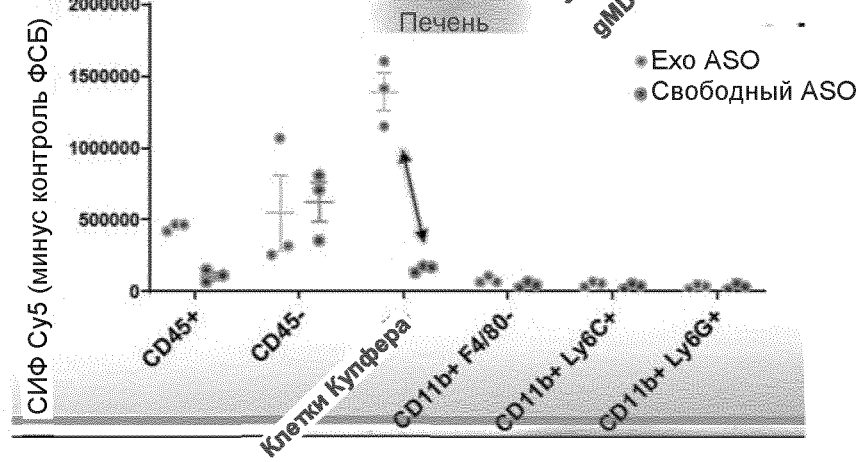


Фиг. 3В

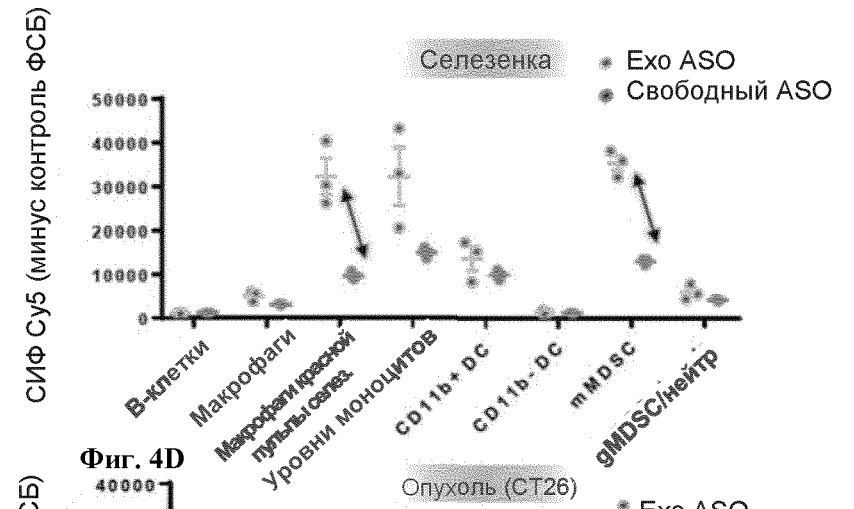
Фиг. 4А



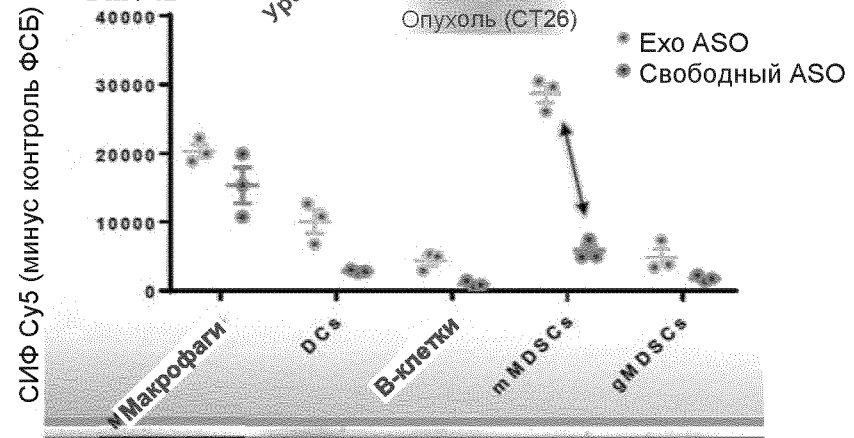
Фиг. 4В



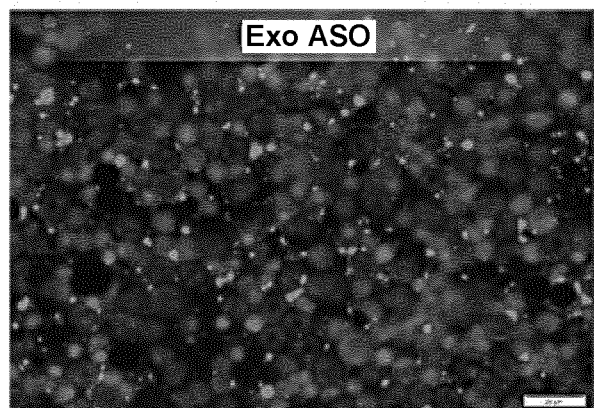
Фиг. 4С



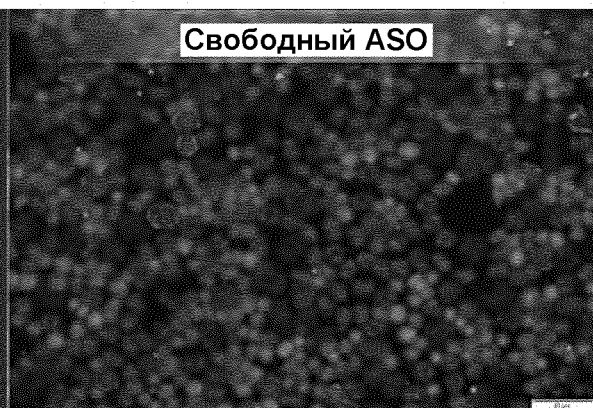
Фиг. 4D



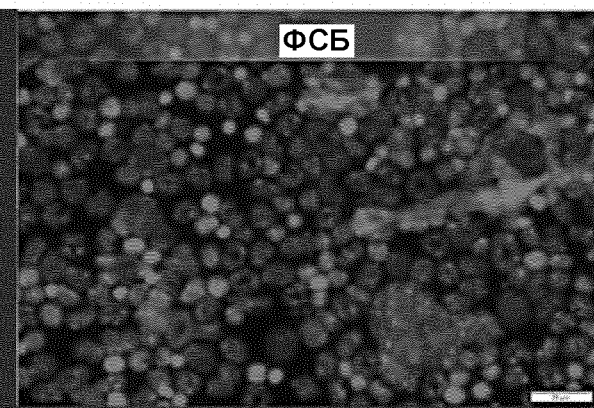
Фиг. 4Е



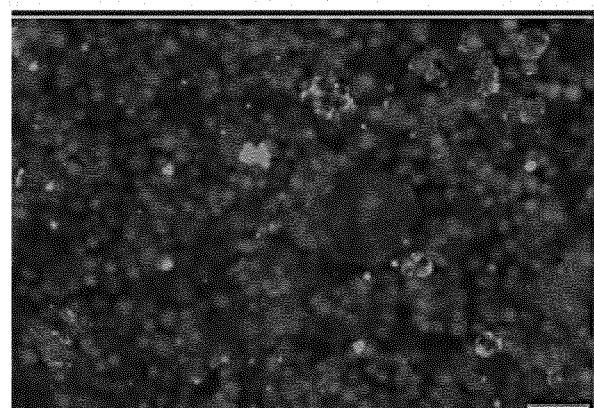
Фиг. 4G



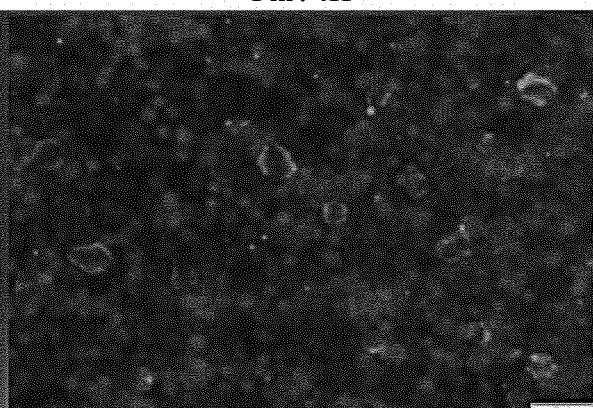
Фиг. 4I



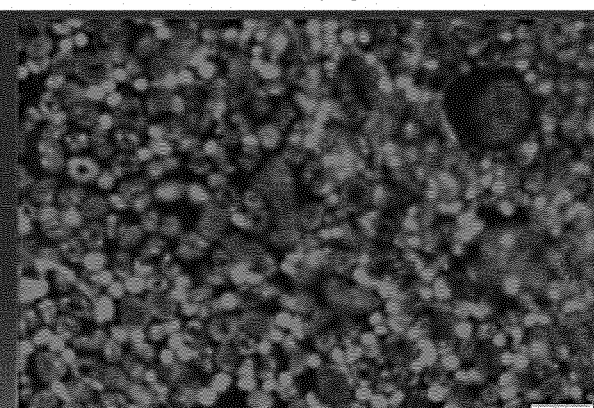
Фиг. 4F



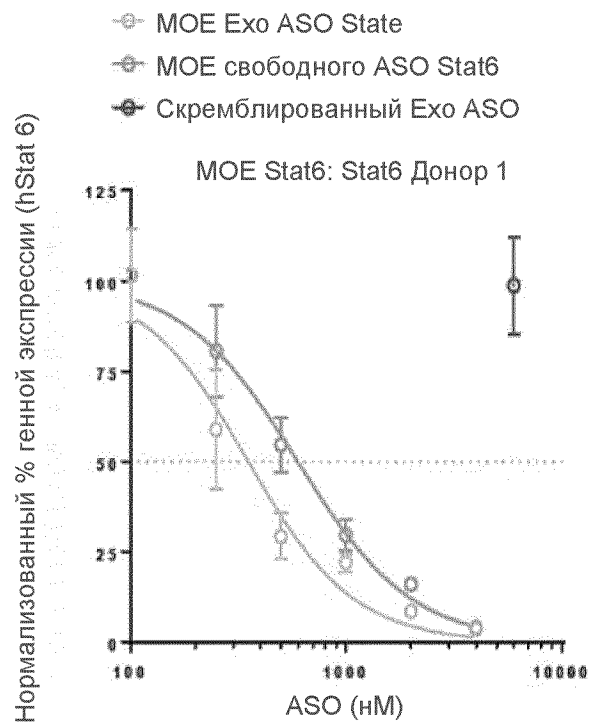
Фиг. 4H



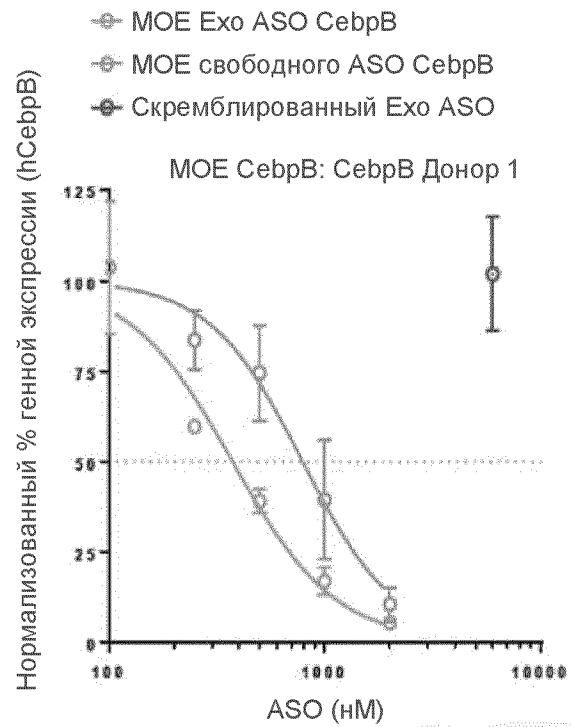
Фиг. 4J



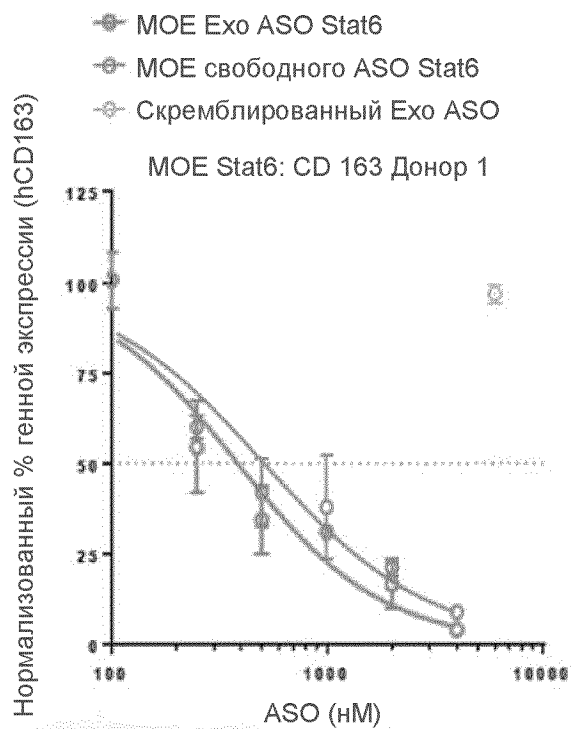
Фиг. 5А



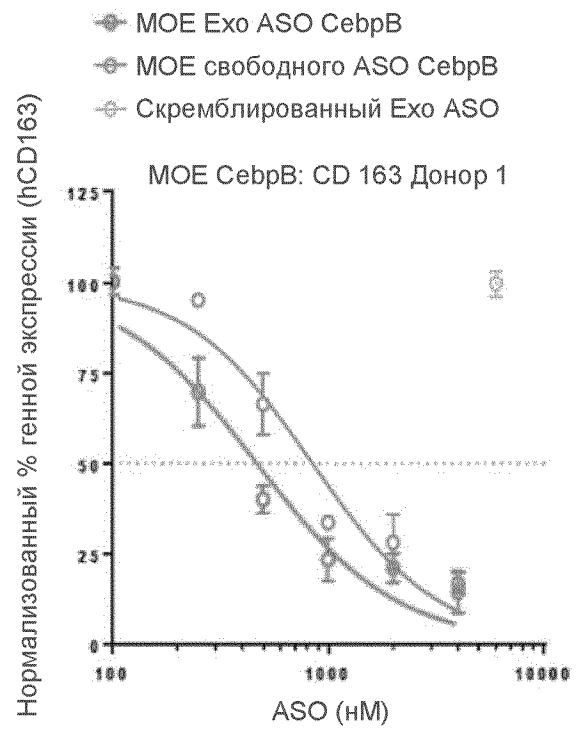
Фиг. 5С



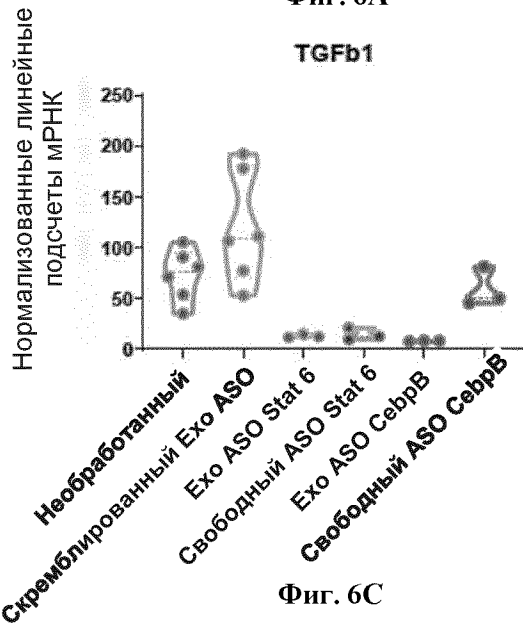
Фиг. 5В



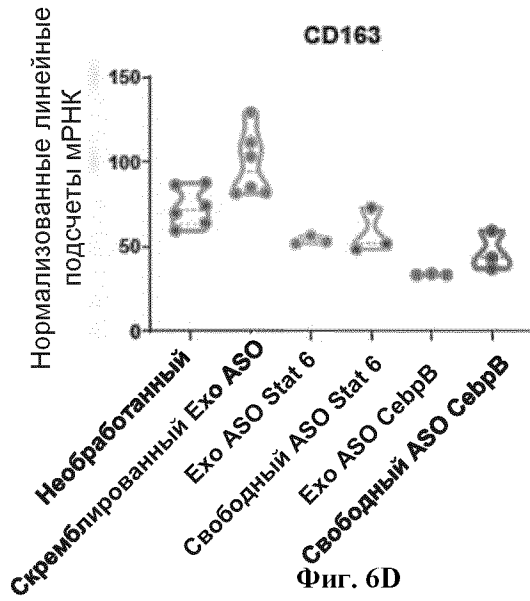
Фиг. 5D



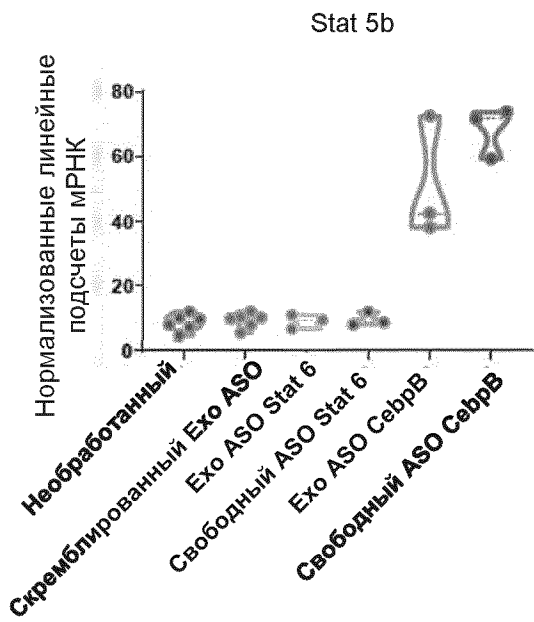
Фиг. 6А



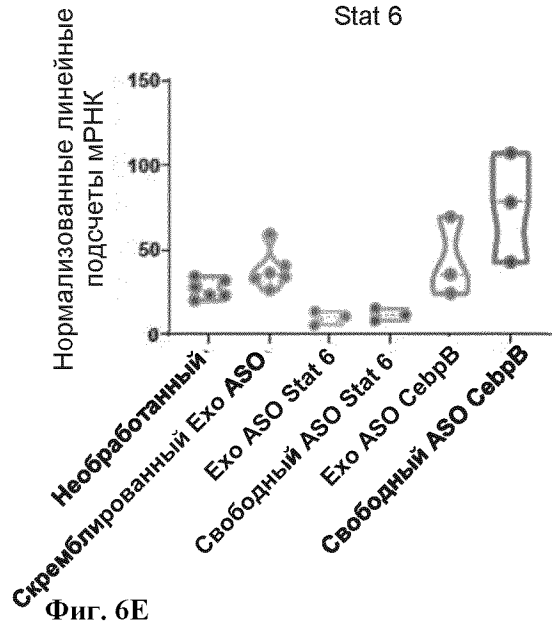
Фиг. 6В



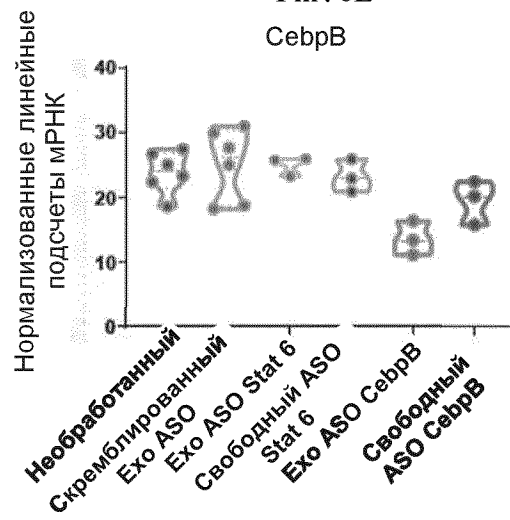
Фиг. 6С



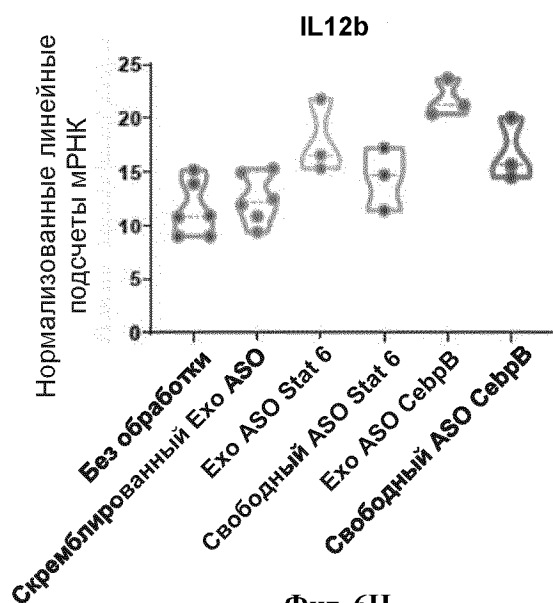
Фиг. 6D



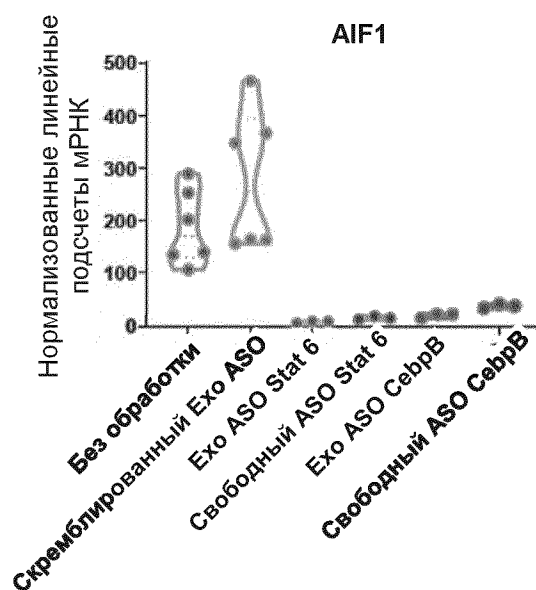
Фиг. 6Е



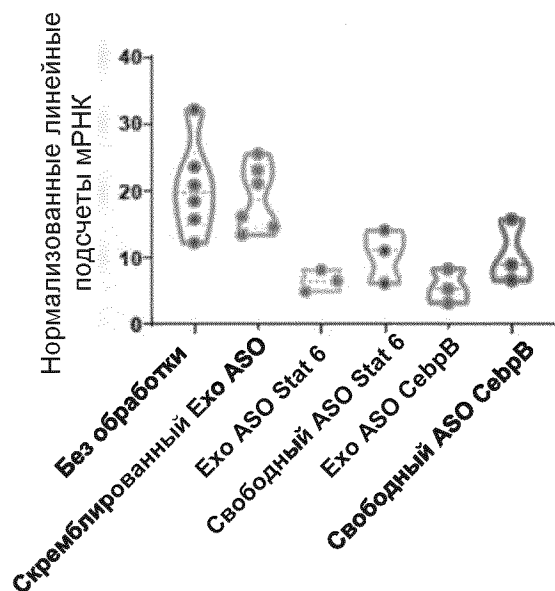
Фиг. 6F



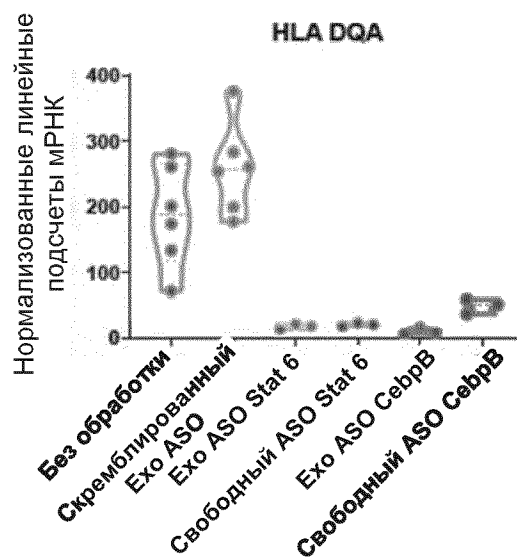
Фиг. 6G



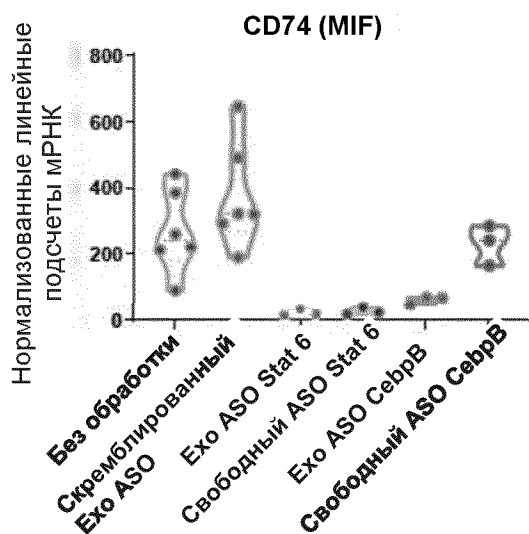
Фиг. 6H



Фиг. 6I

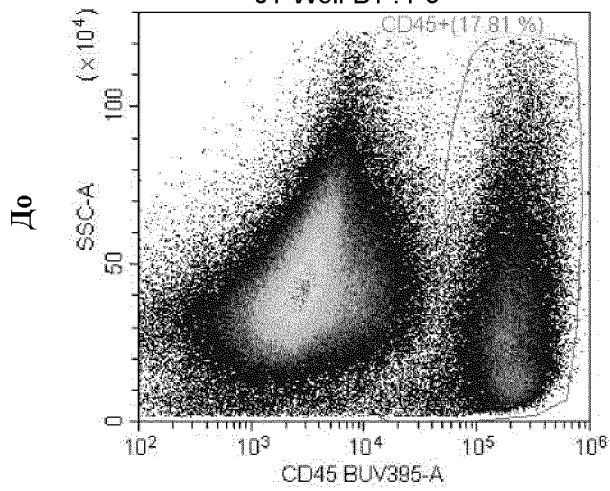


Фиг. 6J



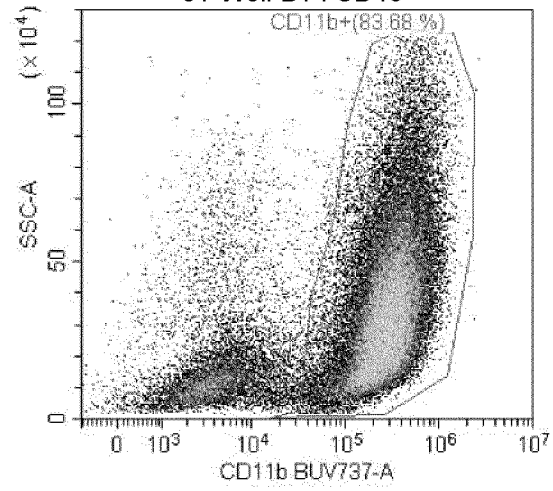
Фиг. 7А

01-Well-B1 : P3



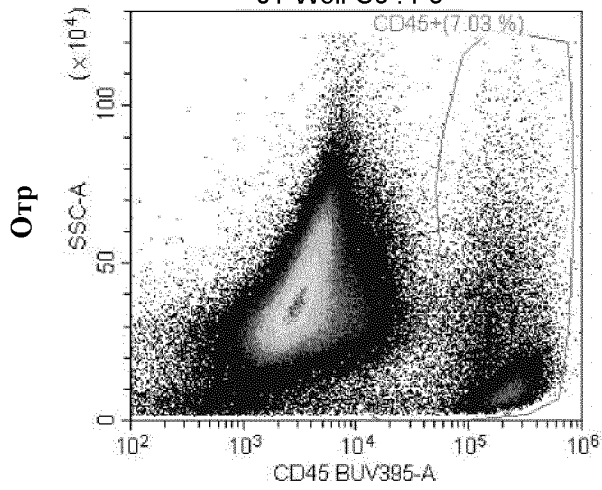
Фиг. 7D

01-Well-B1 : CD45+



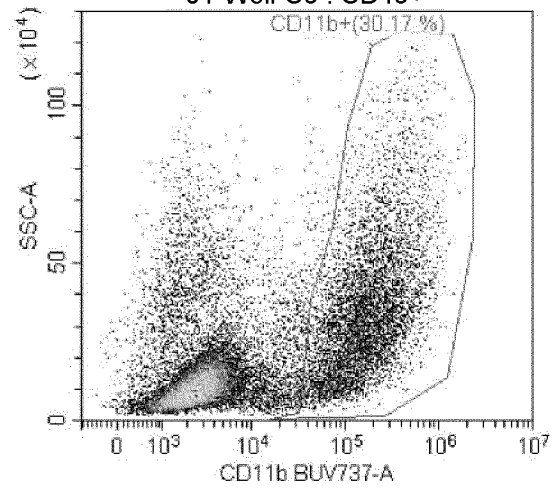
Фиг. 7B

01-Well-C5 : P3



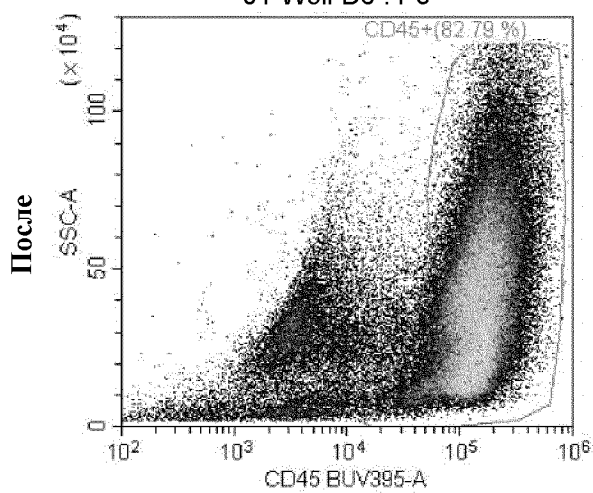
Фиг. 7E

01-Well-C5 : CD45+



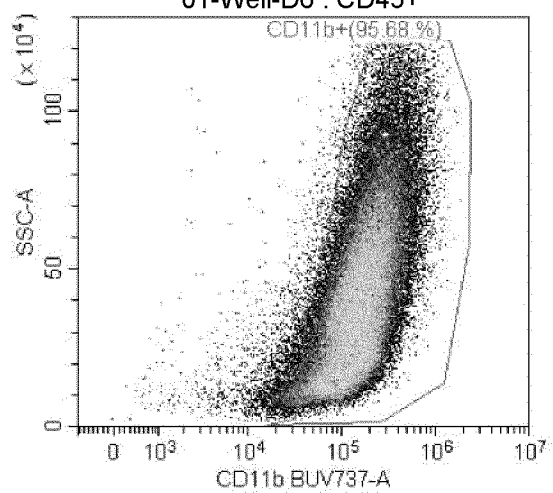
Фиг. 7C

01-Well-D6 : P3

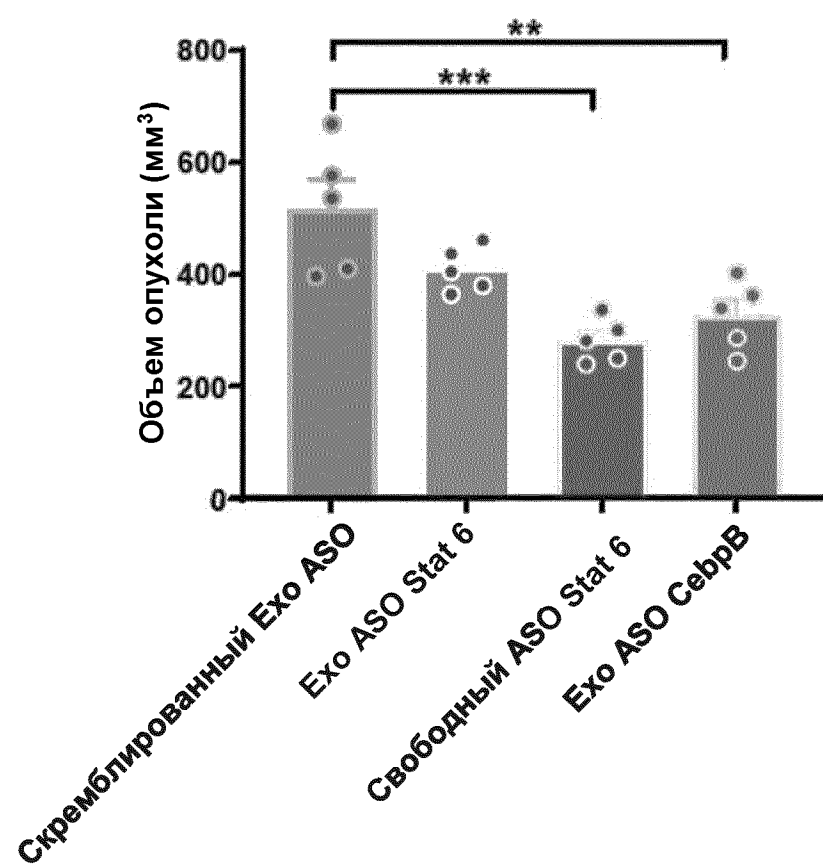


Фиг. 7F

01-Well-D6 : CD45+

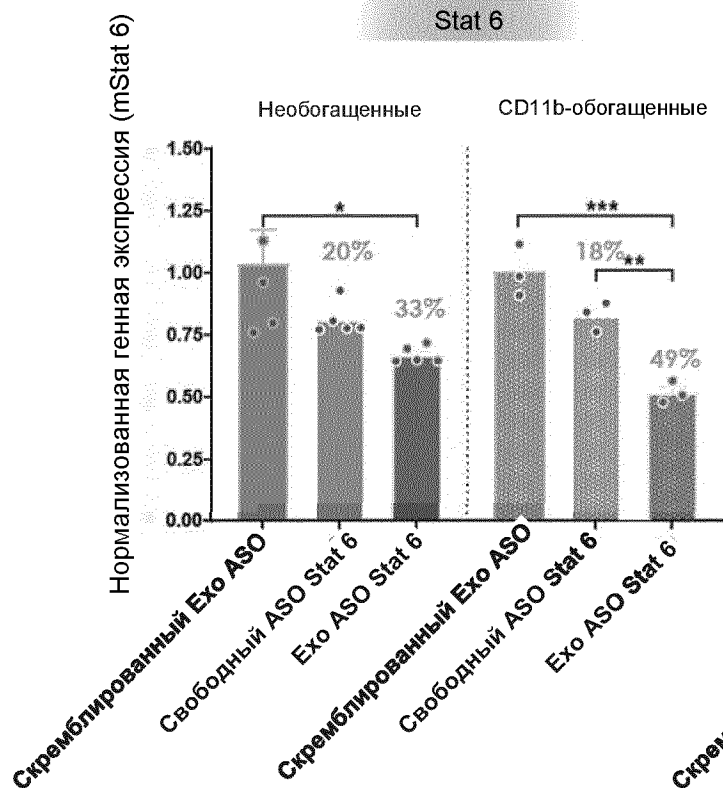


Фиг. 7G



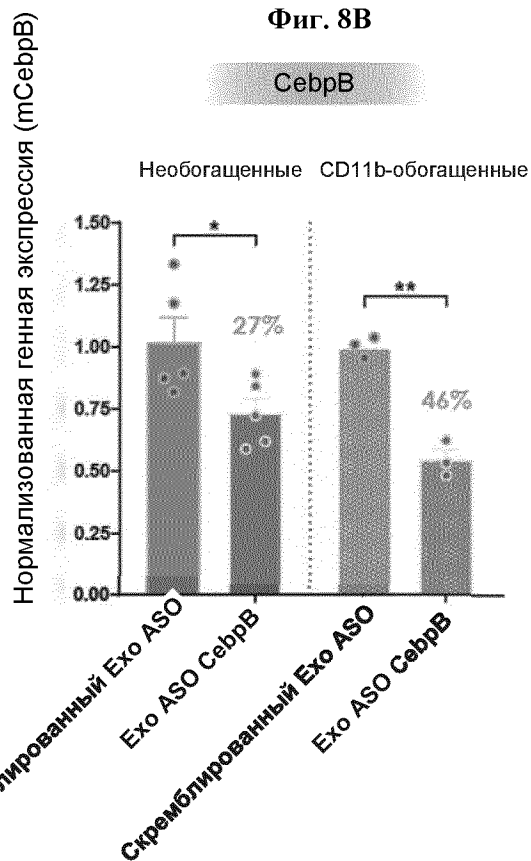
Фиг. 8А

Stat 6



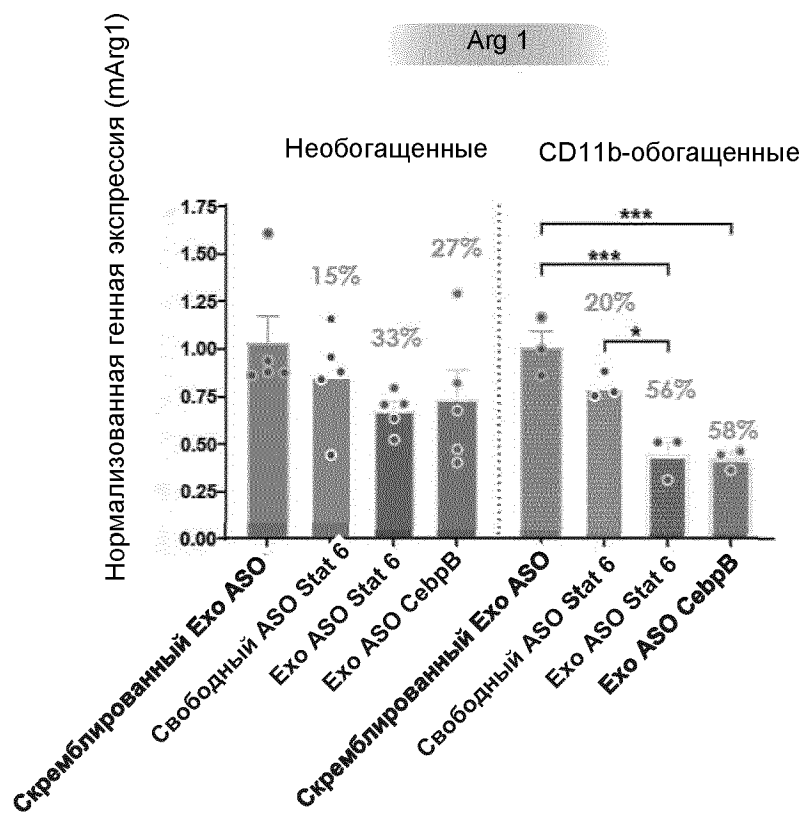
Фиг. 8В

CebpB

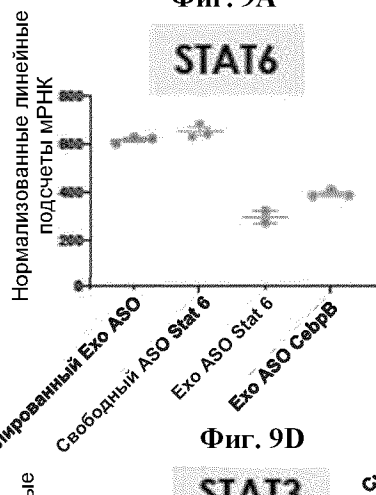


Фиг. 8С

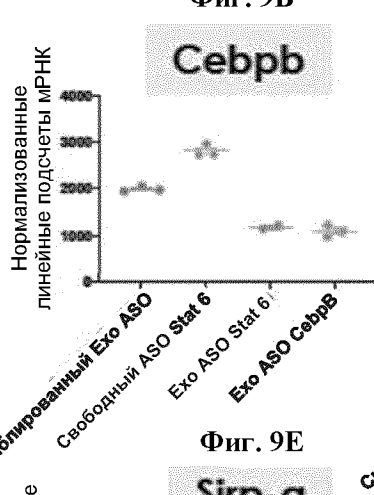
Arg 1



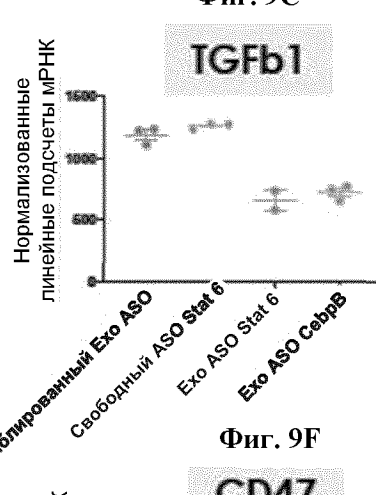
Фиг. 9А



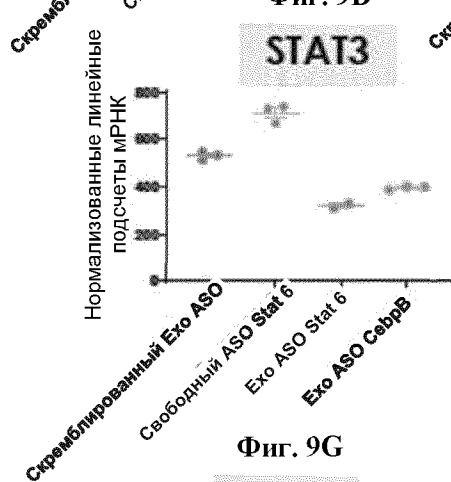
Фиг. 9В



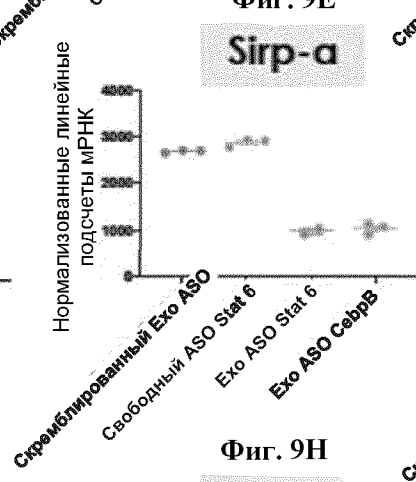
Фиг. 9С



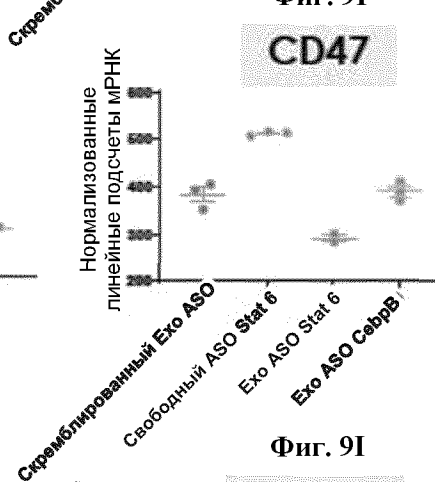
Фиг. 9D



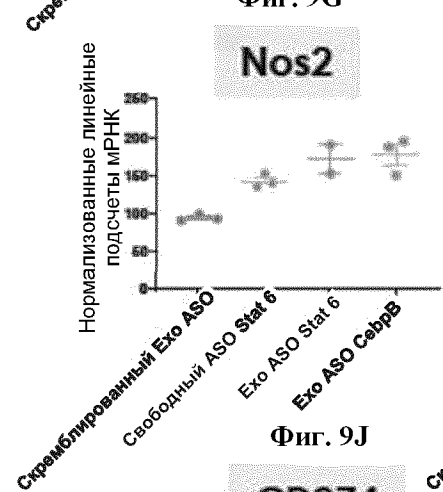
Фиг. 9Е



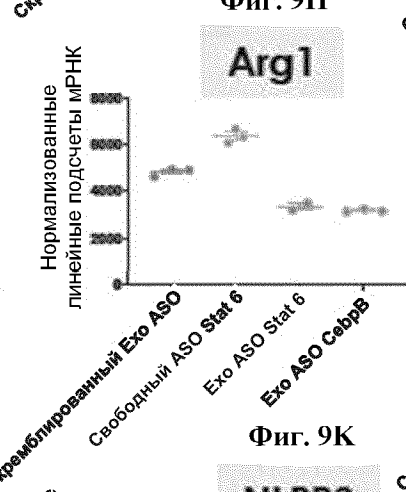
Фиг. 9F



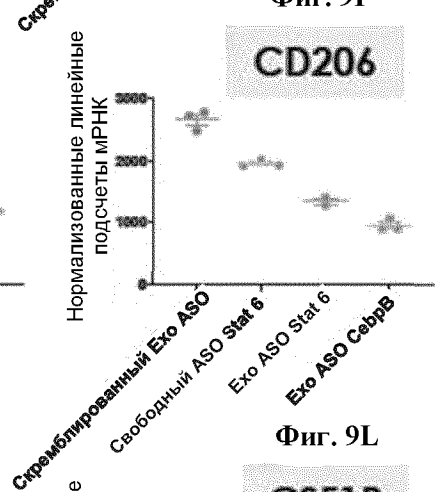
Фиг. 9G



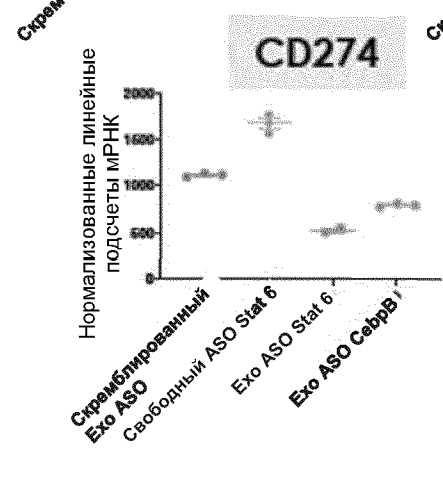
Фиг. 9H



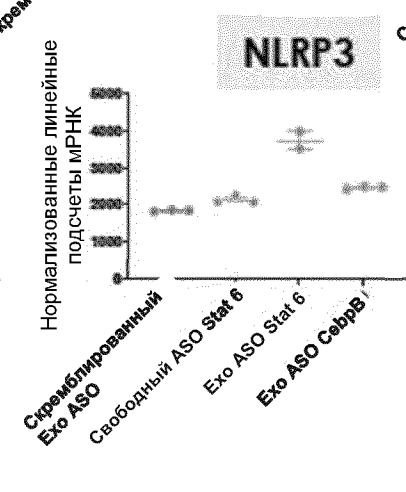
Фиг. 9I



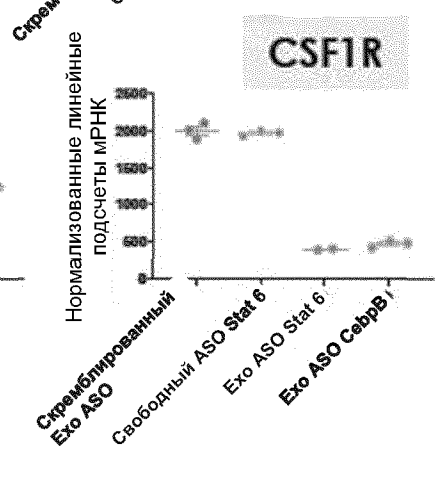
Фиг. 9J



Фиг. 9K

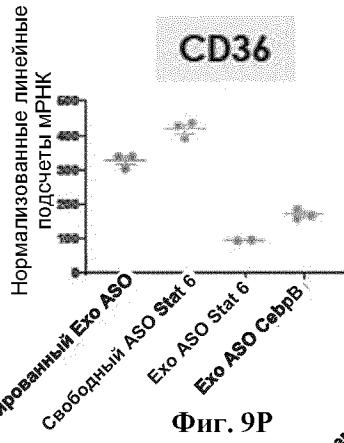


Фиг. 9L



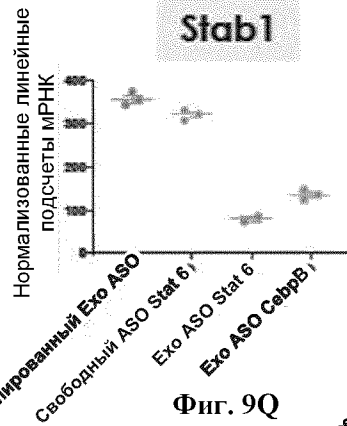
Фиг. 9M

CD36



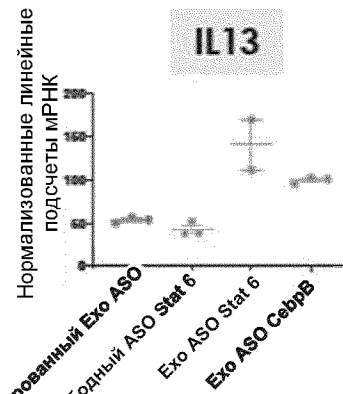
Фиг. 9N

Stab1



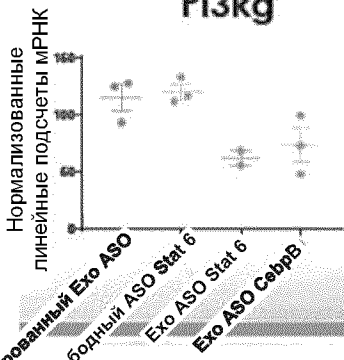
Фиг. 9O

IL13



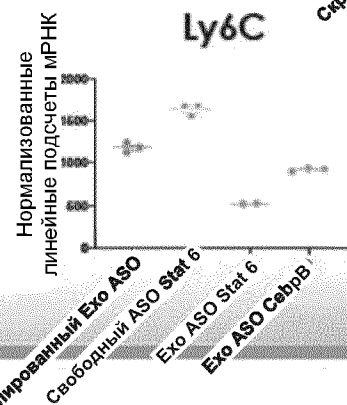
Фиг. 9P

PI3kg



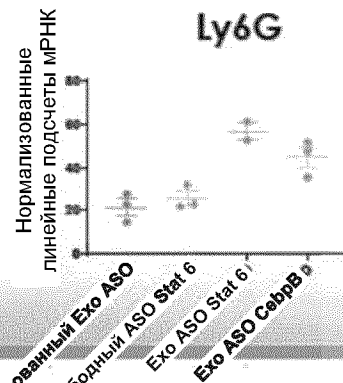
Фиг. 9Q

Ly6C

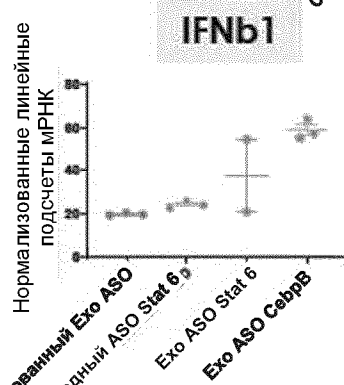


Фиг. 9R

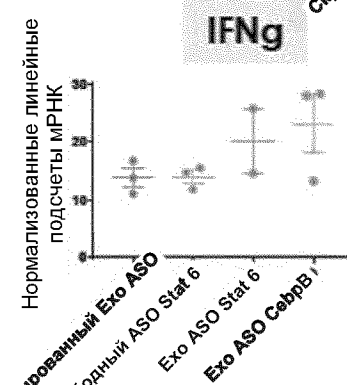
Ly6G



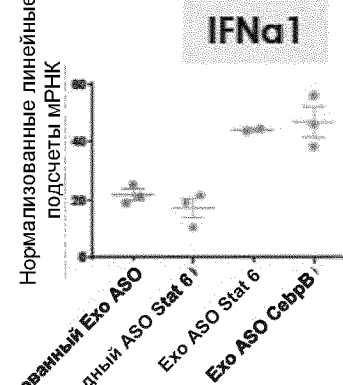
Фиг. 9S

IFN γ 1

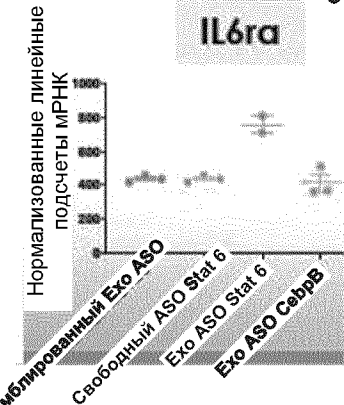
Фиг. 9T

IFN γ 

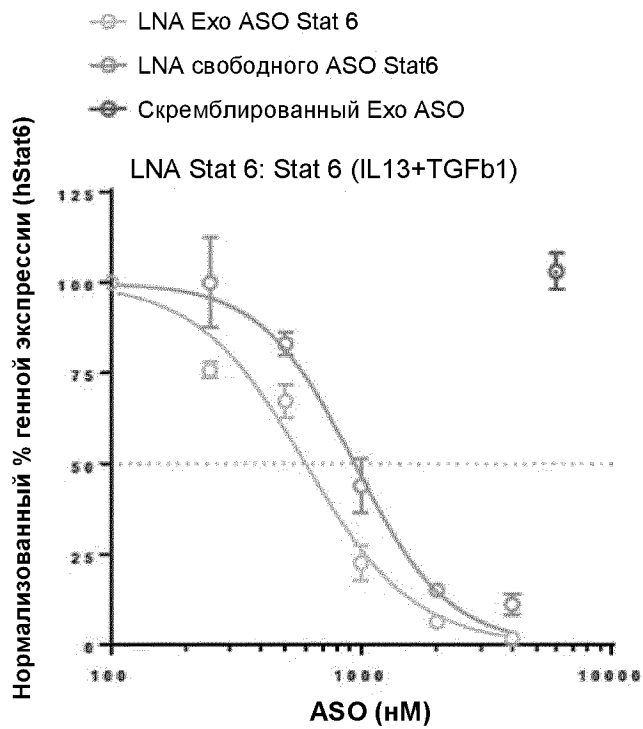
Фиг. 9U

IFN α 1

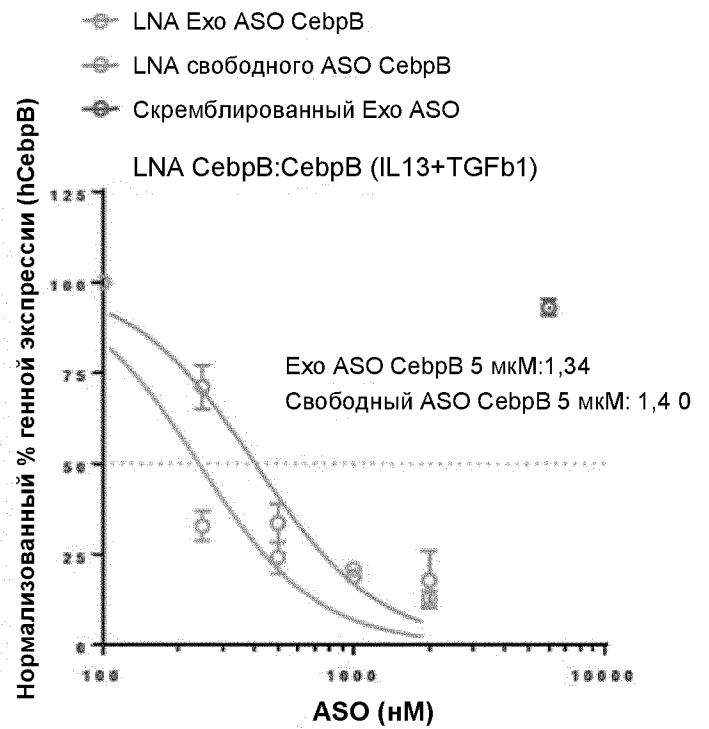
Фиг. 9V

IL6 α 

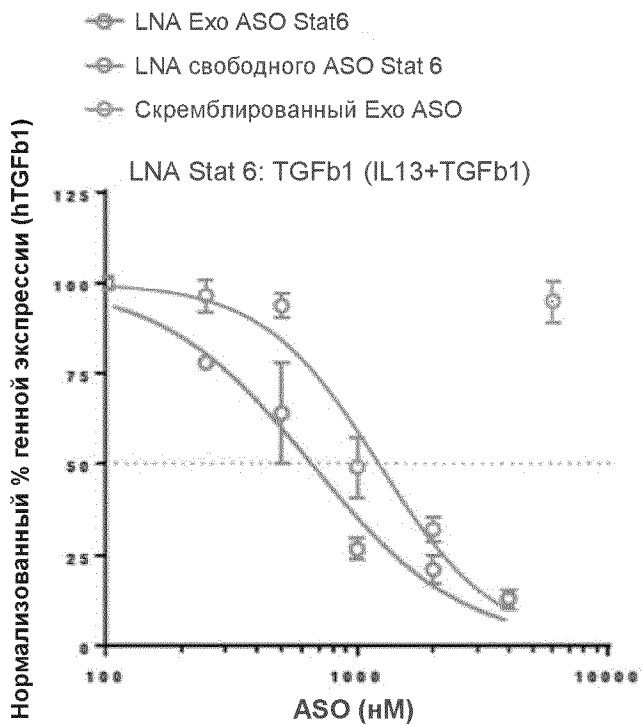
Фиг. 10А



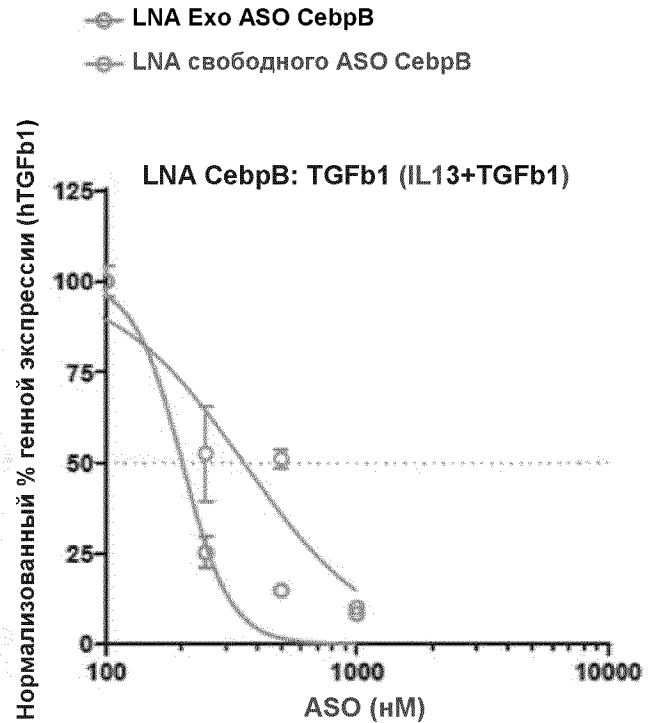
Фиг. 10В



Фиг. 10С

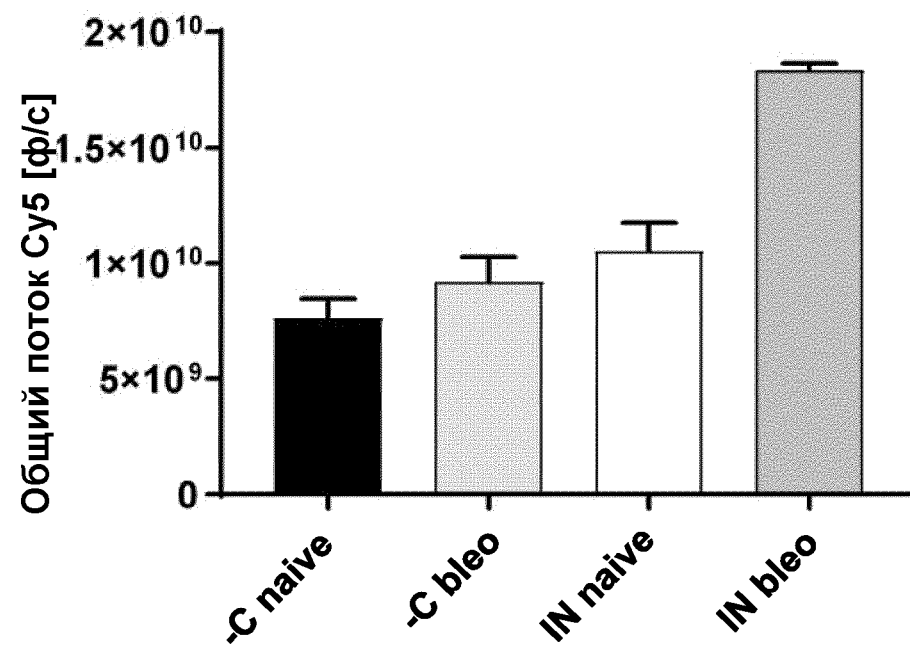


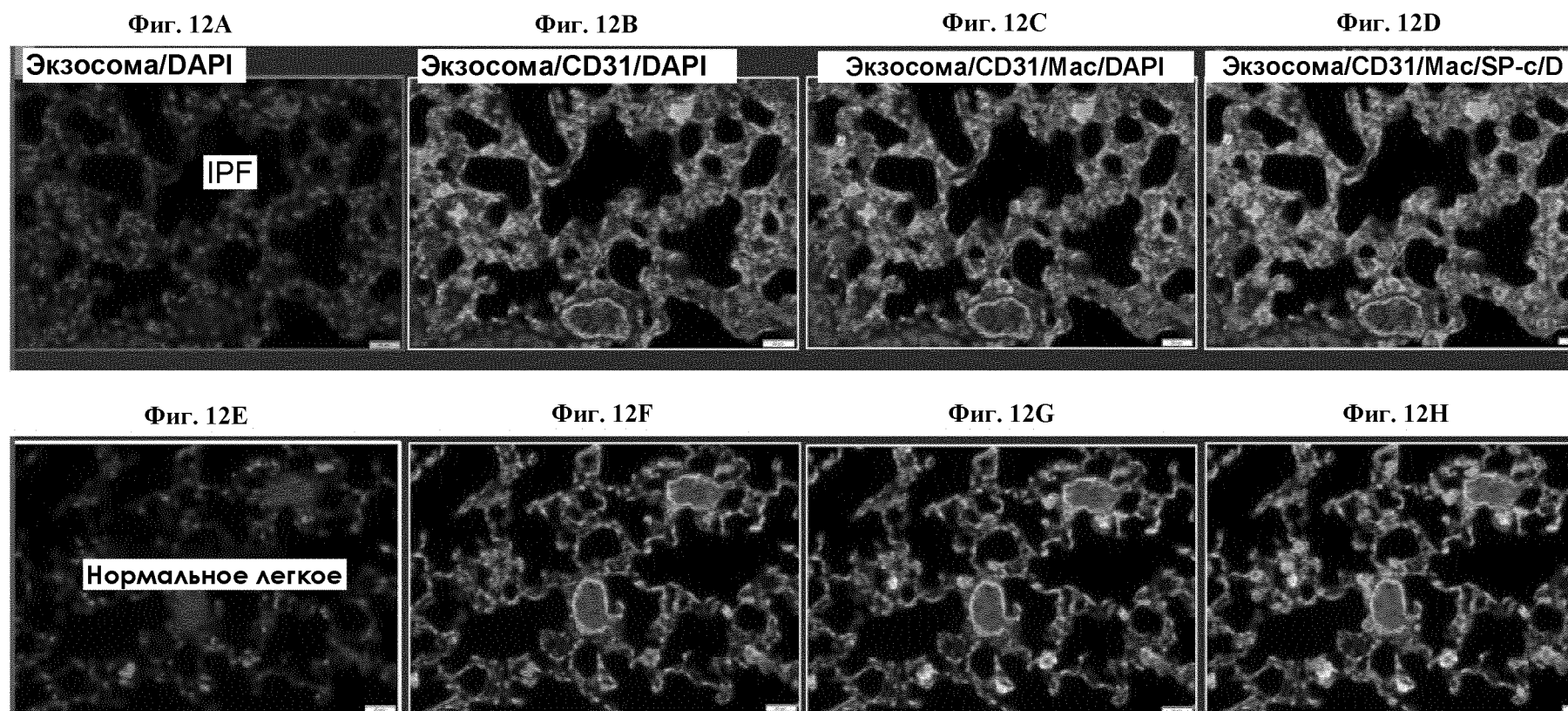
Фиг. 10D

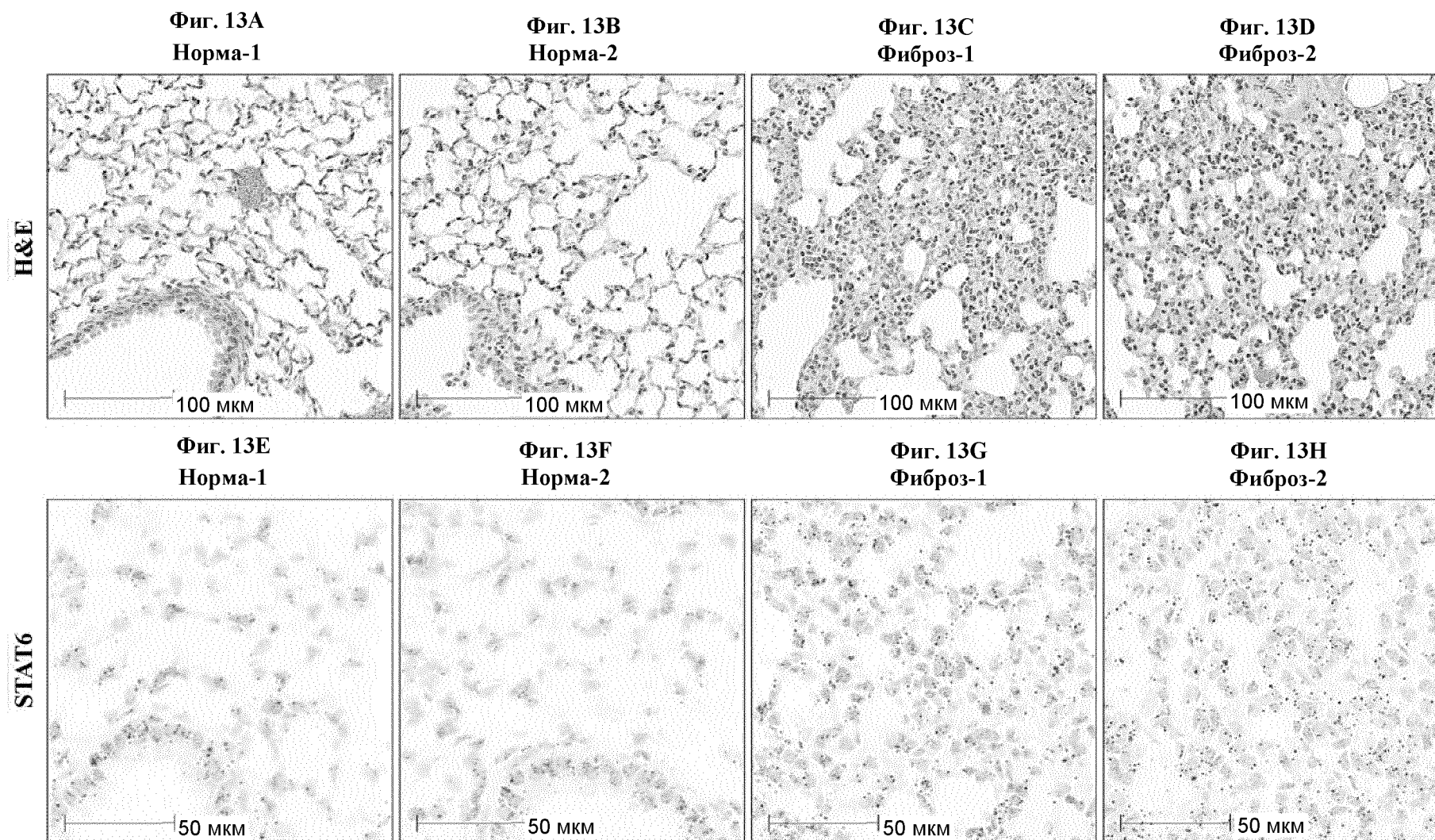


Фиг. 11

Интраназальные экзосомы в
TD2 легких и собственной
разработки



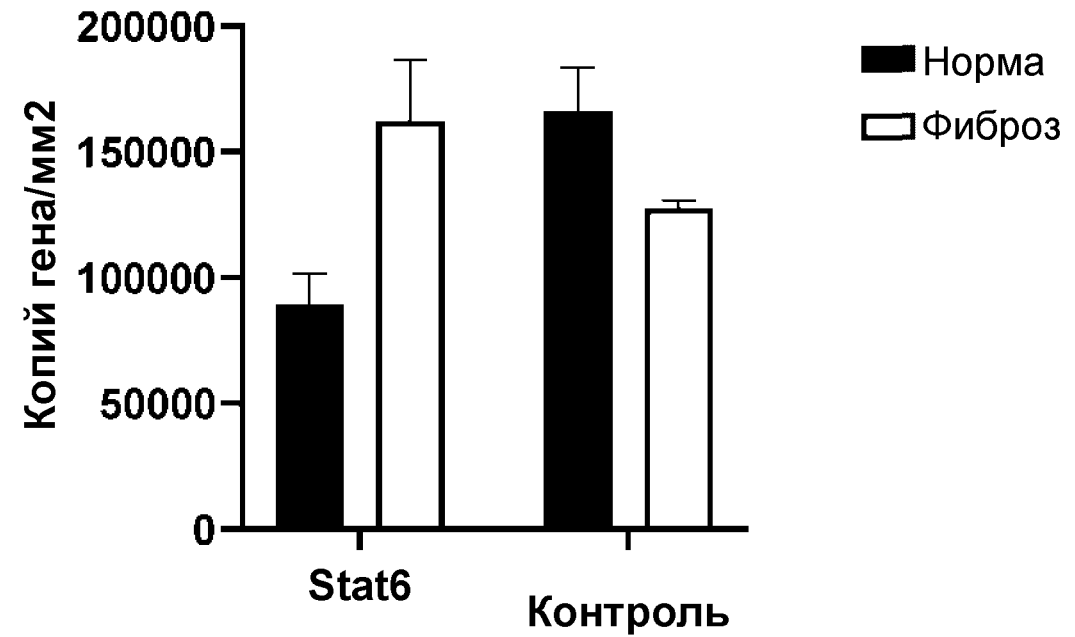




Фиг. 13I

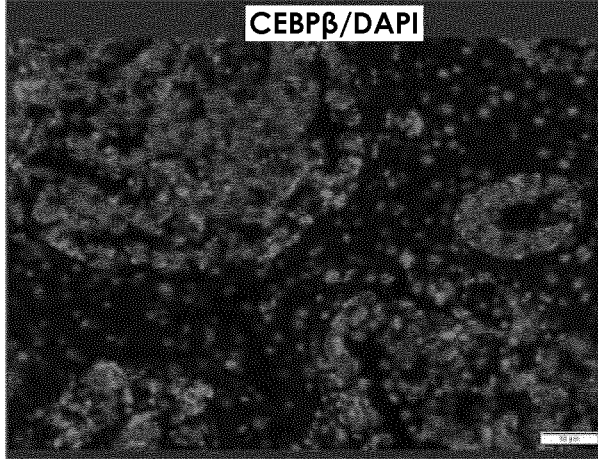
Нормальное легкое по сравнению с фиброзом

Оценка клеток	
0	0 точек
1+	≥ 1
2+	≥ 4
3+	≥ 10
4+	≥ 16



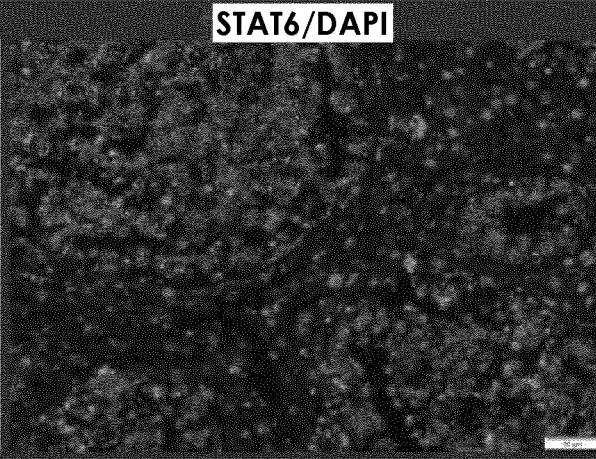
Фиг. 14А

CEBP β /DAPI



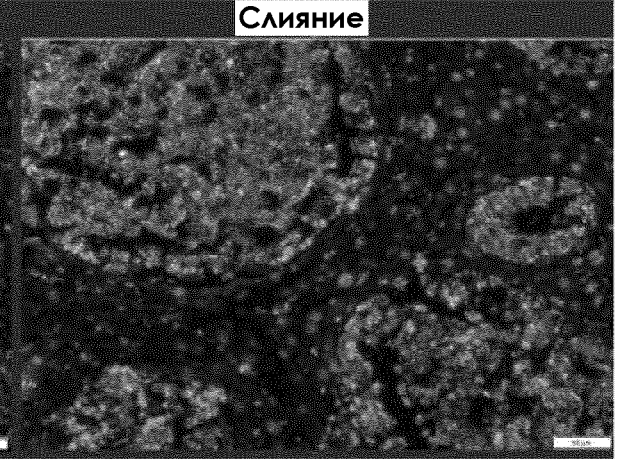
Фиг. 14С

STAT6/DAPI

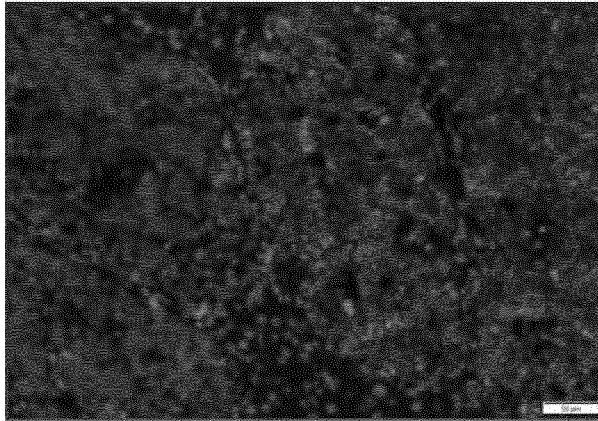


Фиг. 14Е

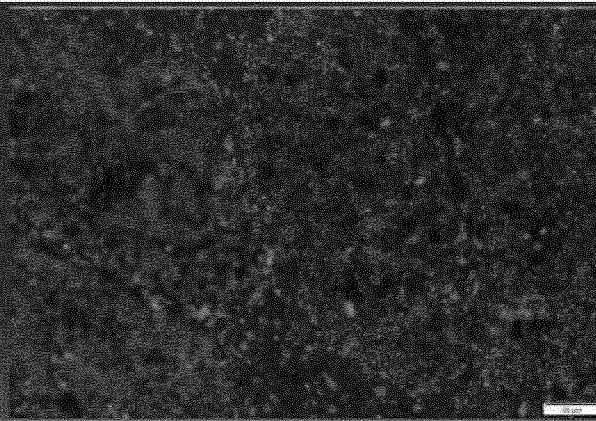
Слияние



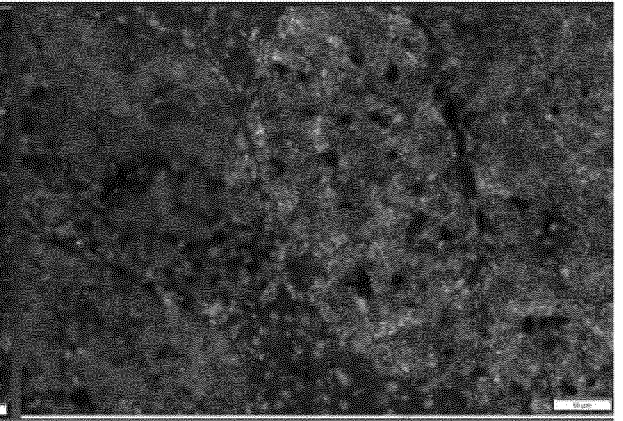
Фиг. 14В



Фиг. 14D

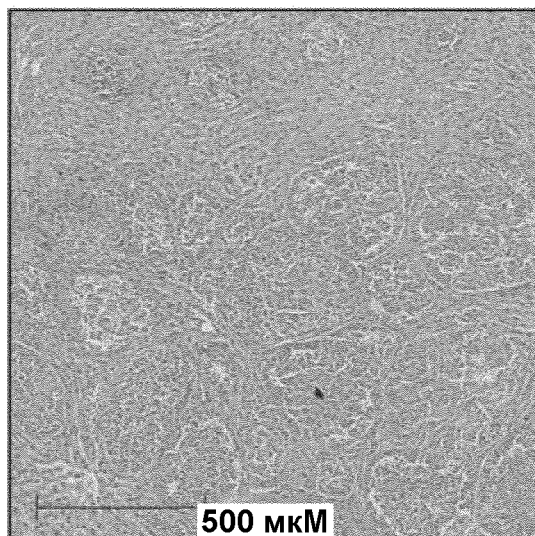


Фиг. 14F

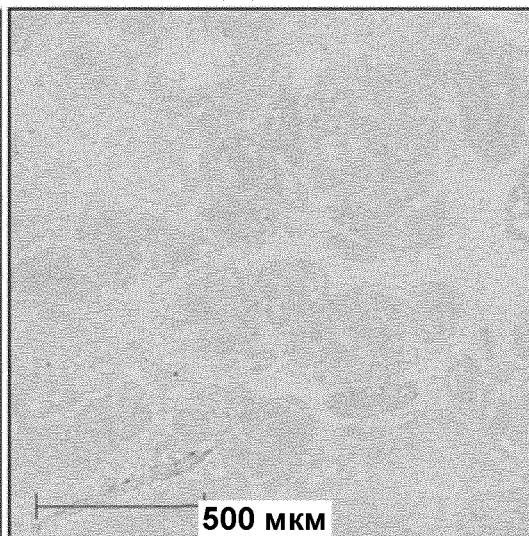


НЕБОЛЬШОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

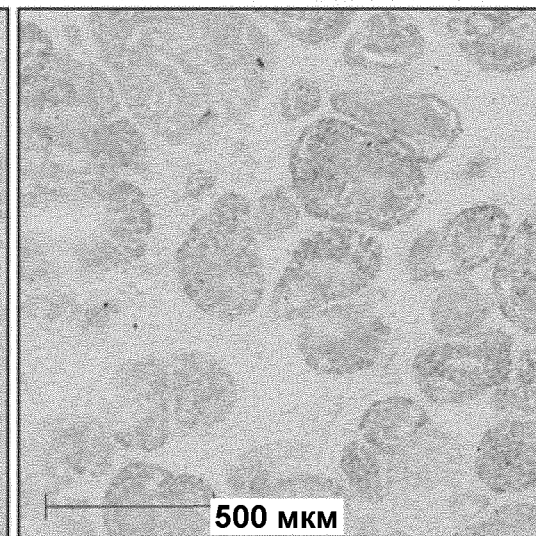
Фиг. 15А
Н&Е



Фиг. 15В
STAT6

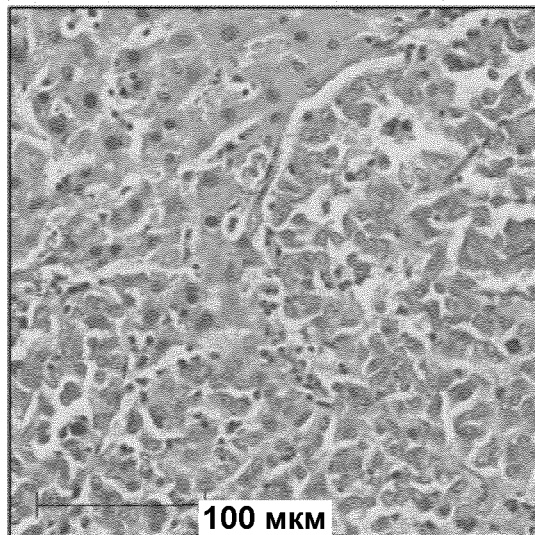


Фиг. 15С
РР1В (+)

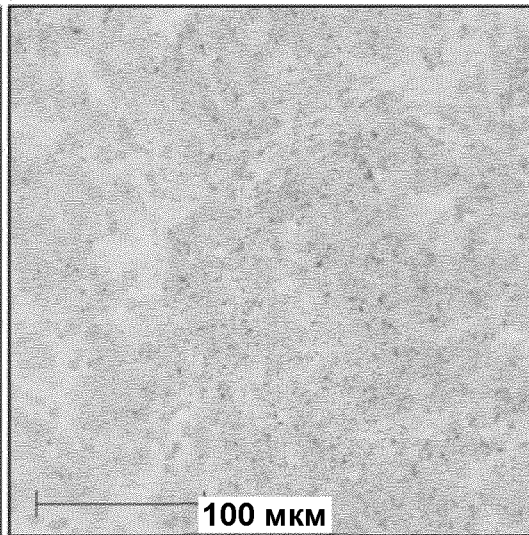


БОЛЬШОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

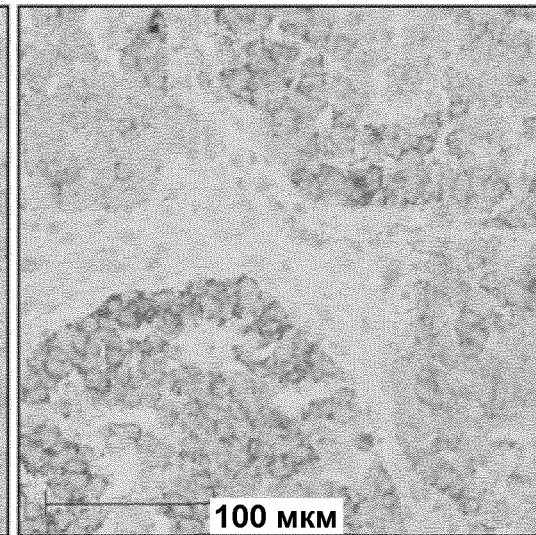
Фиг. 15D
Н&Е



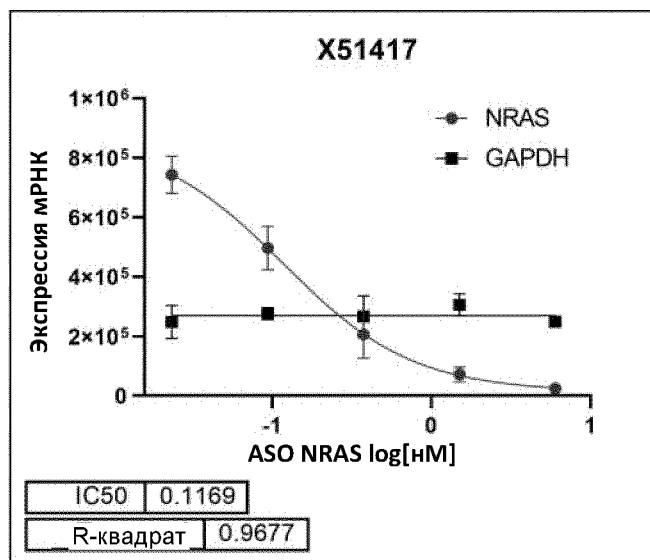
Фиг. 15Е
STAT6



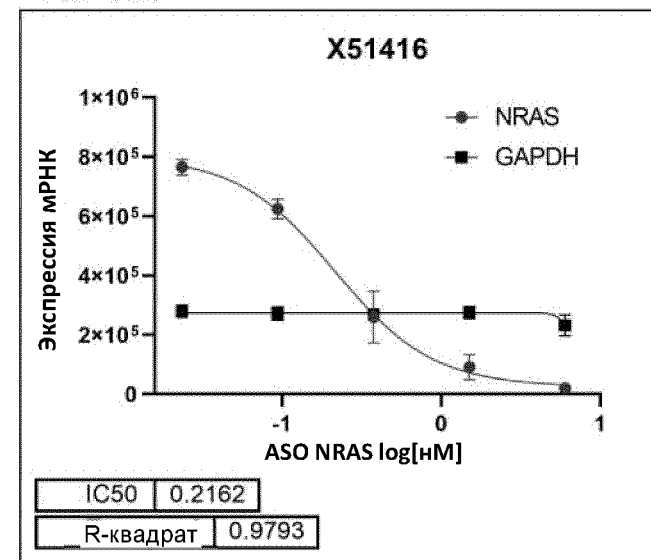
Фиг. 15F
РР1В (+)



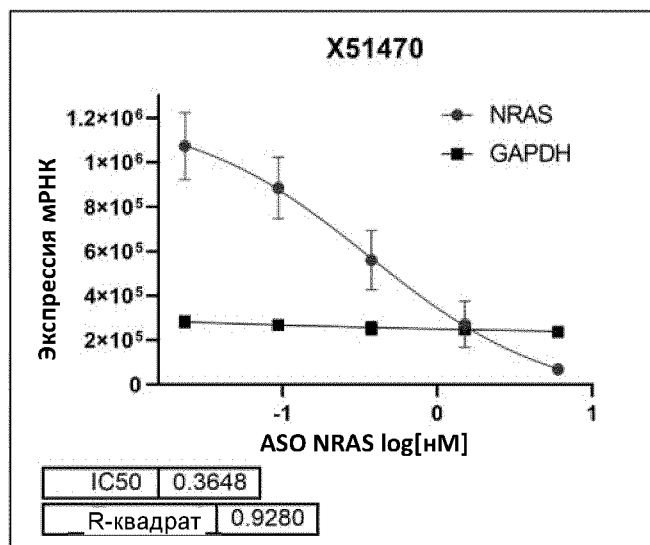
Фиг. 16А



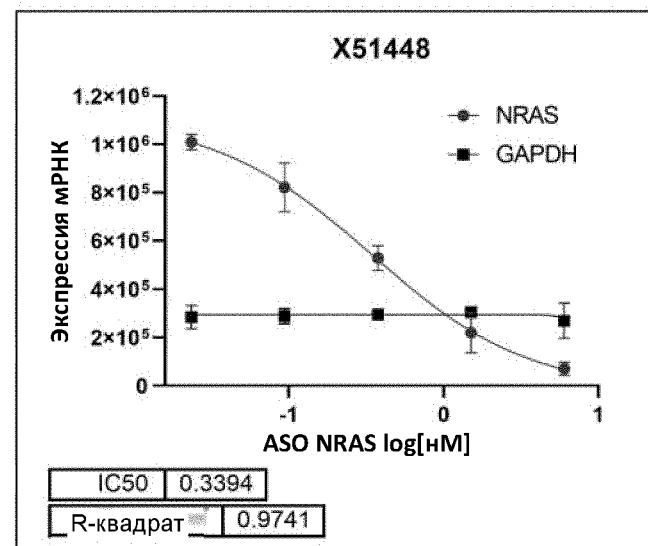
Фиг. 16В



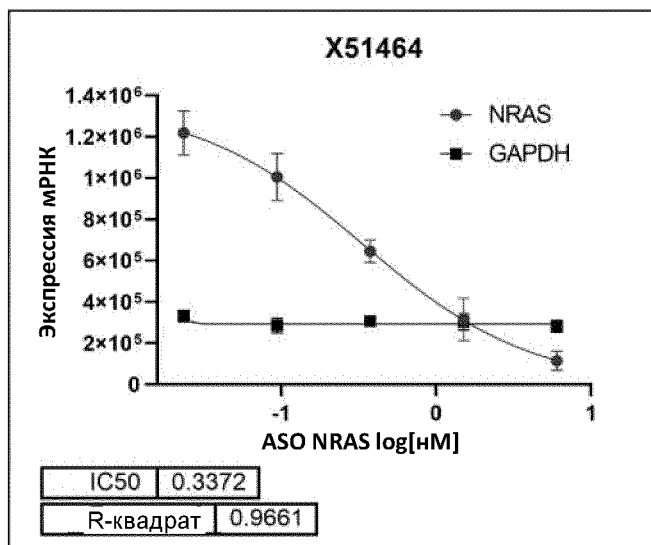
Фиг. 16С



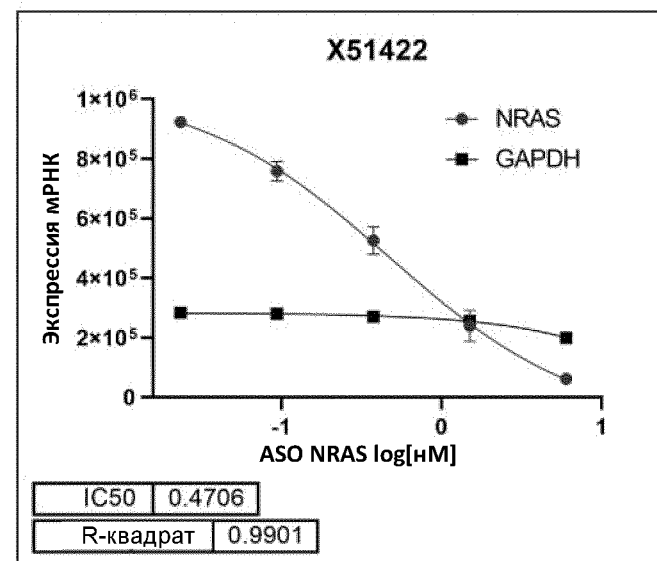
Фиг. 16D



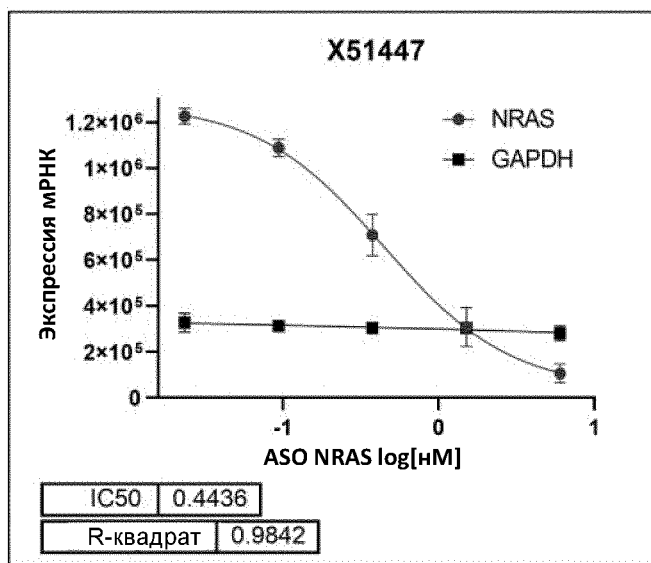
Фиг. 16Е



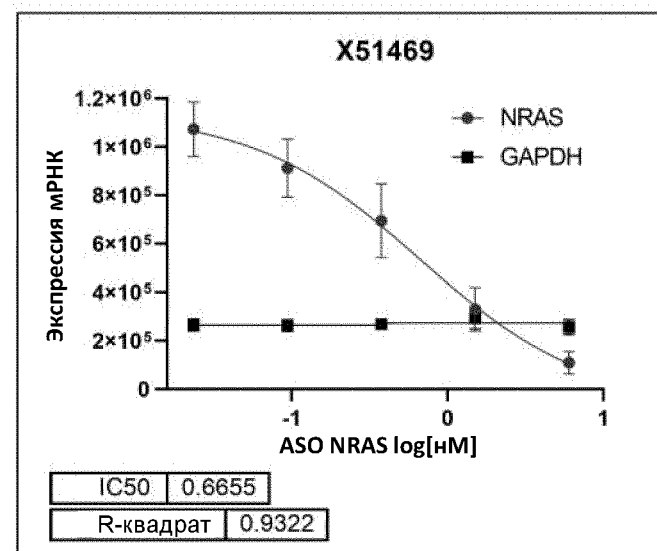
Фиг. 16F



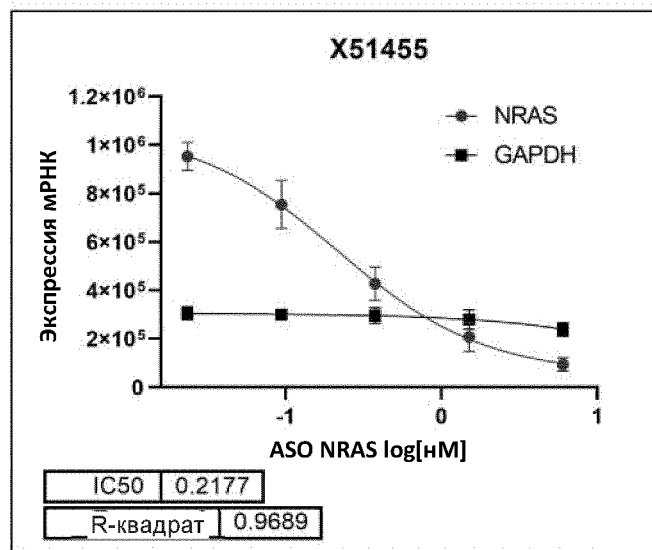
Фиг. 16G



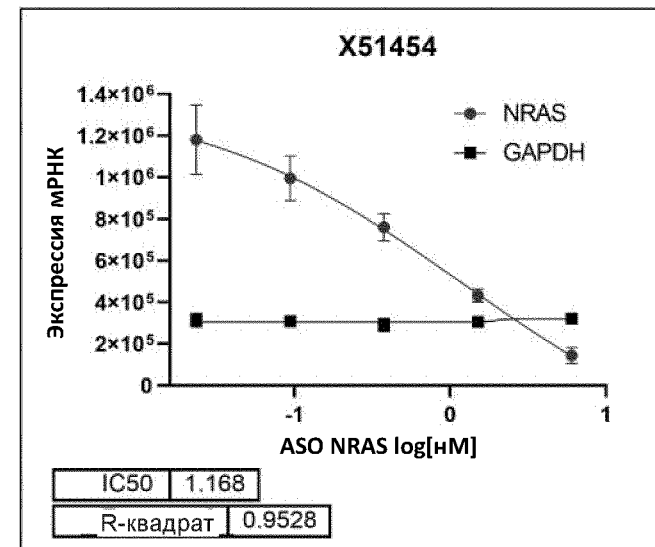
Фиг. 16H



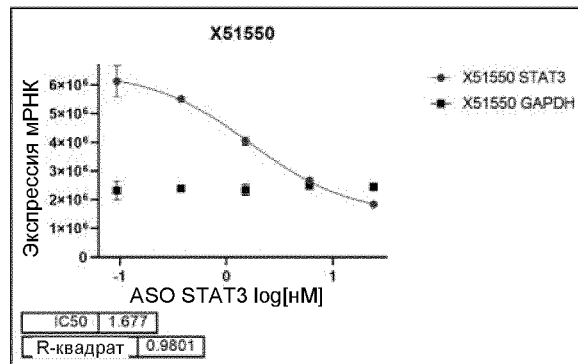
Фиг. 16I



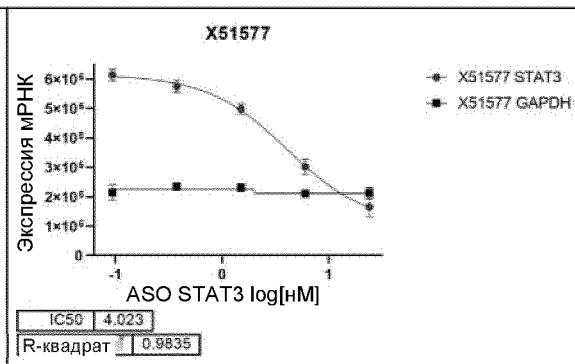
Фиг. 16J



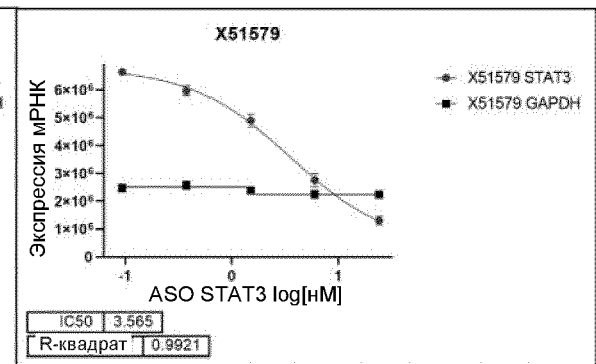
Фиг. 17А



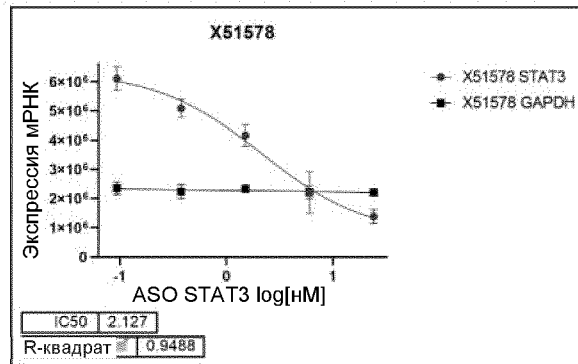
Фиг. 17В



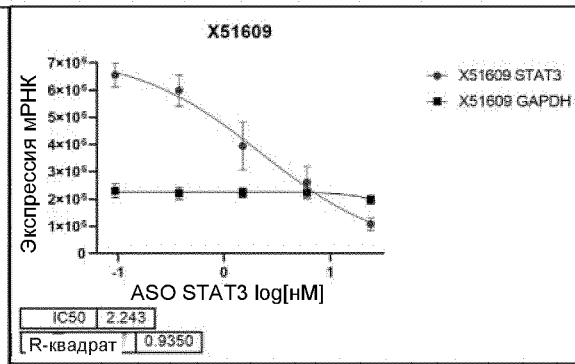
Фиг. 17С



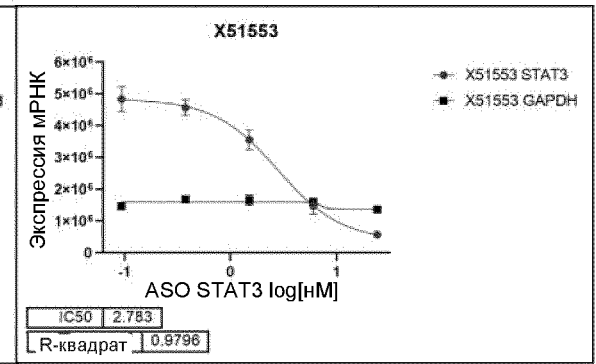
Фиг. 17D



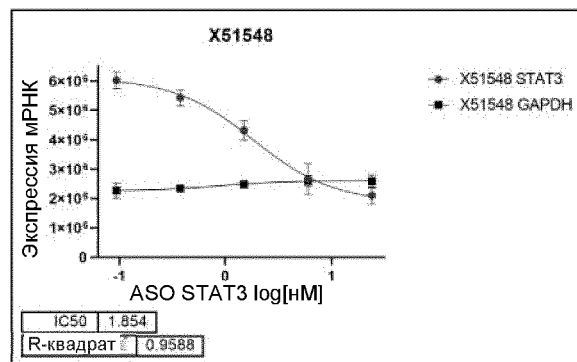
Фиг. 17Е



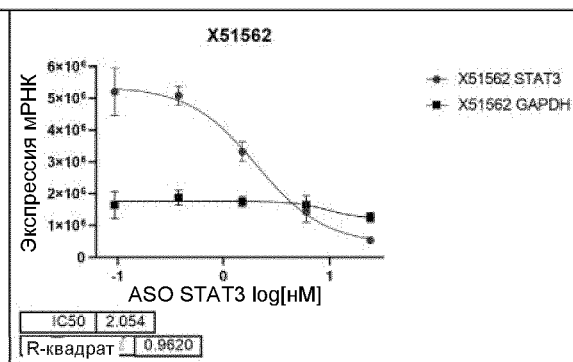
Фиг. 17F



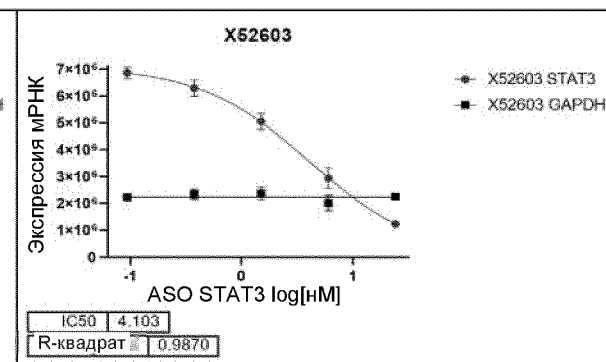
Фиг. 17G



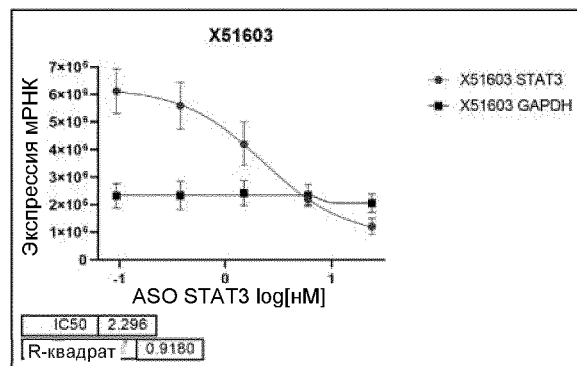
Фиг. 17H



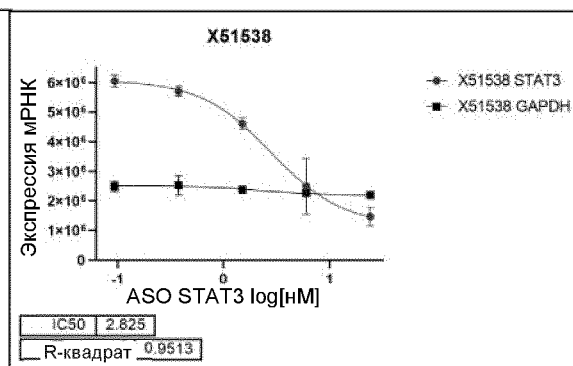
Фиг. 17I



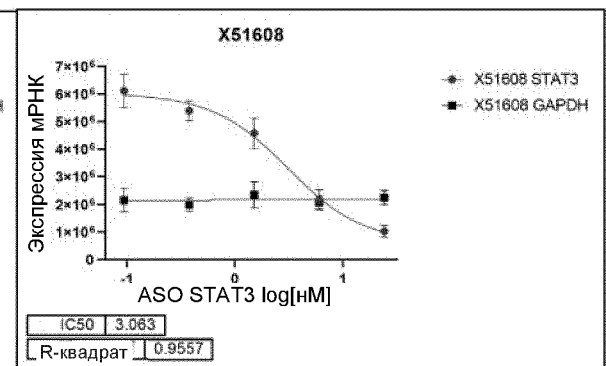
Фиг. 17J



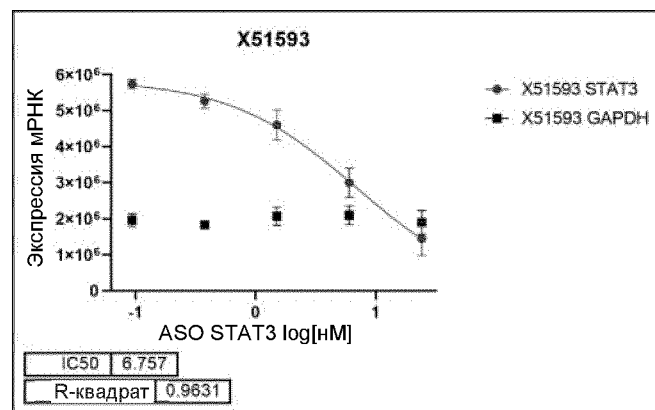
Фиг. 17K



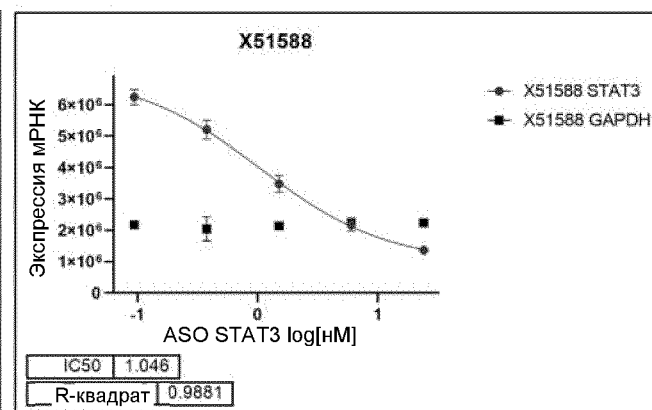
Фиг. 17L



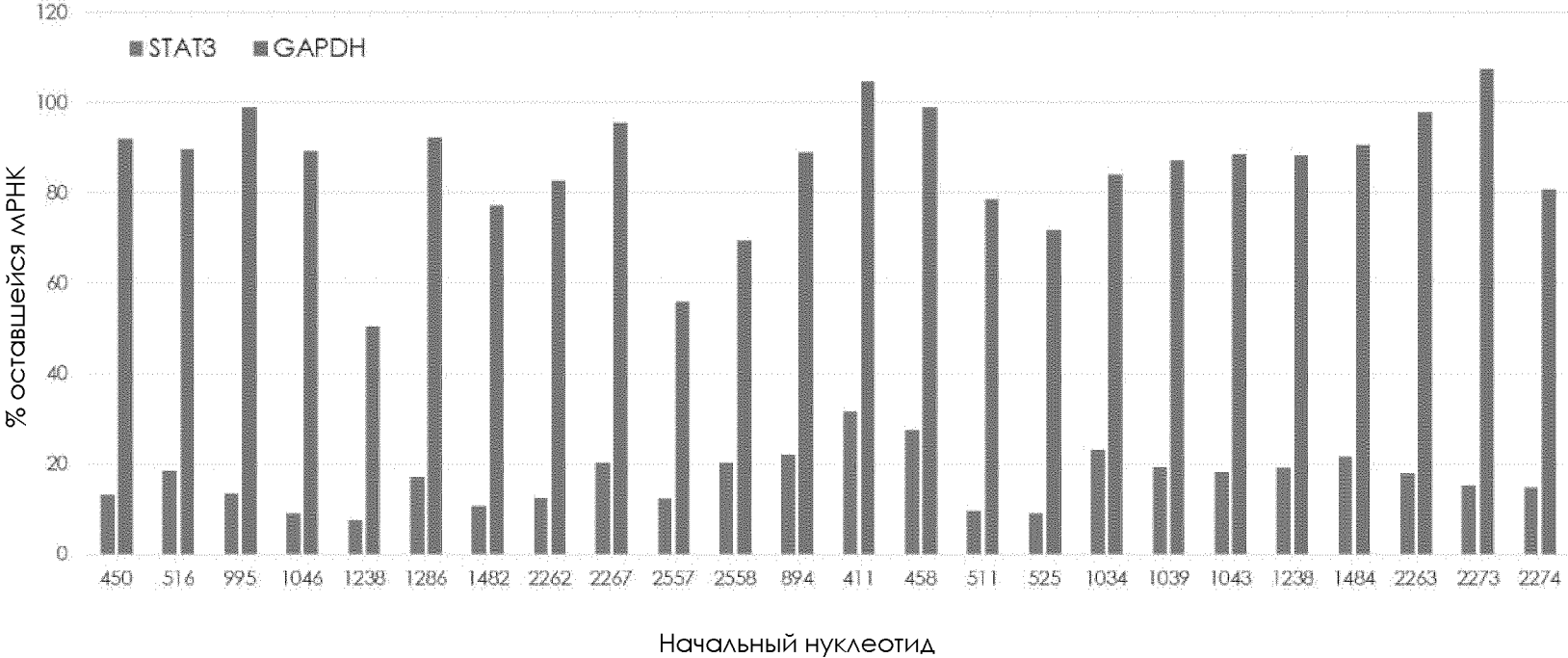
Фиг. 17М



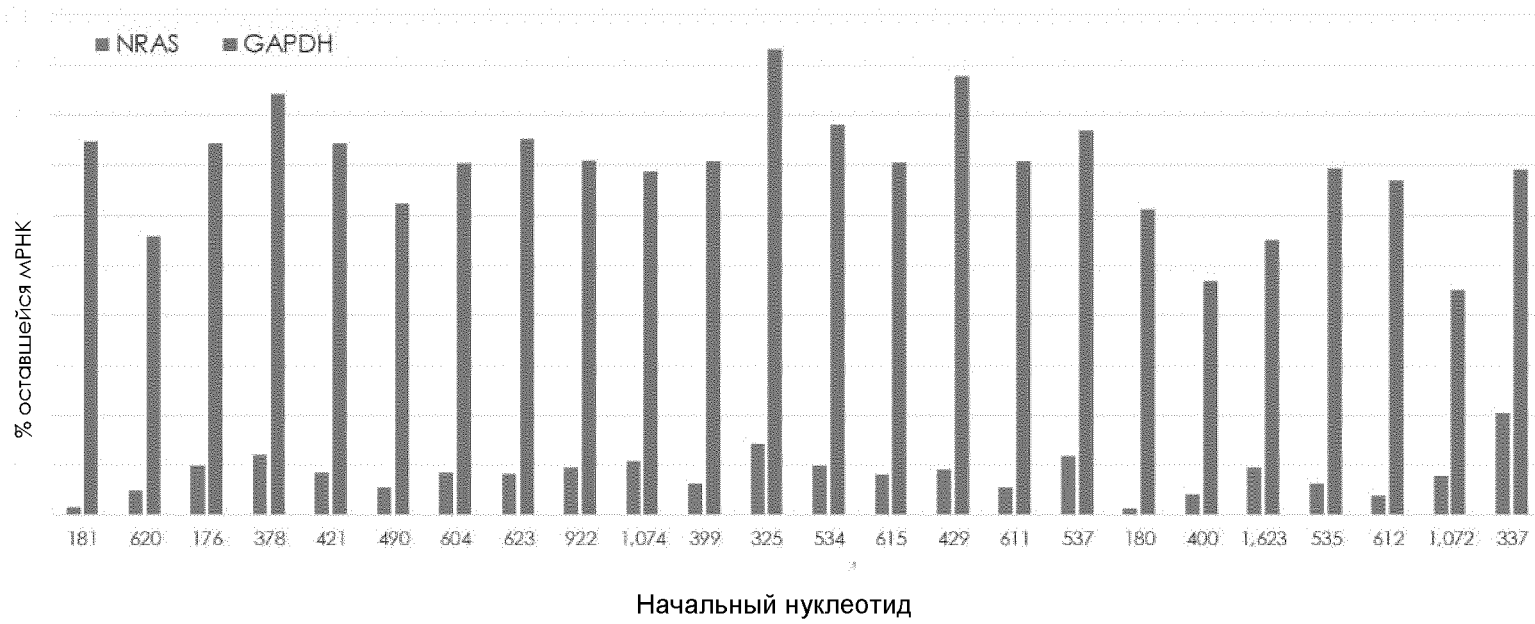
Фиг. 17N



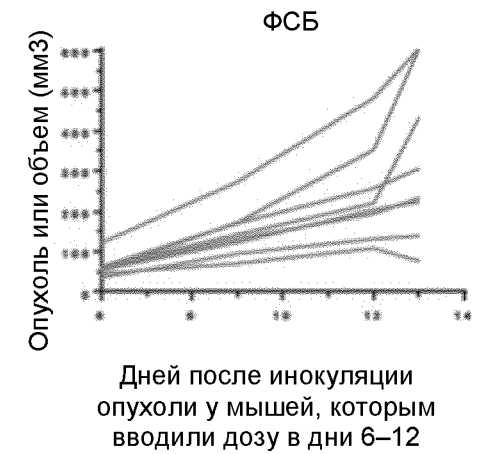
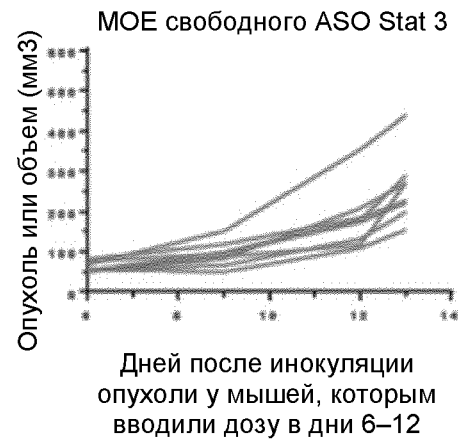
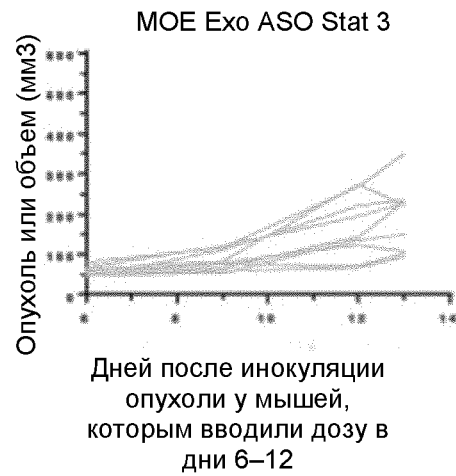
Фиг. 18



Фиг. 19

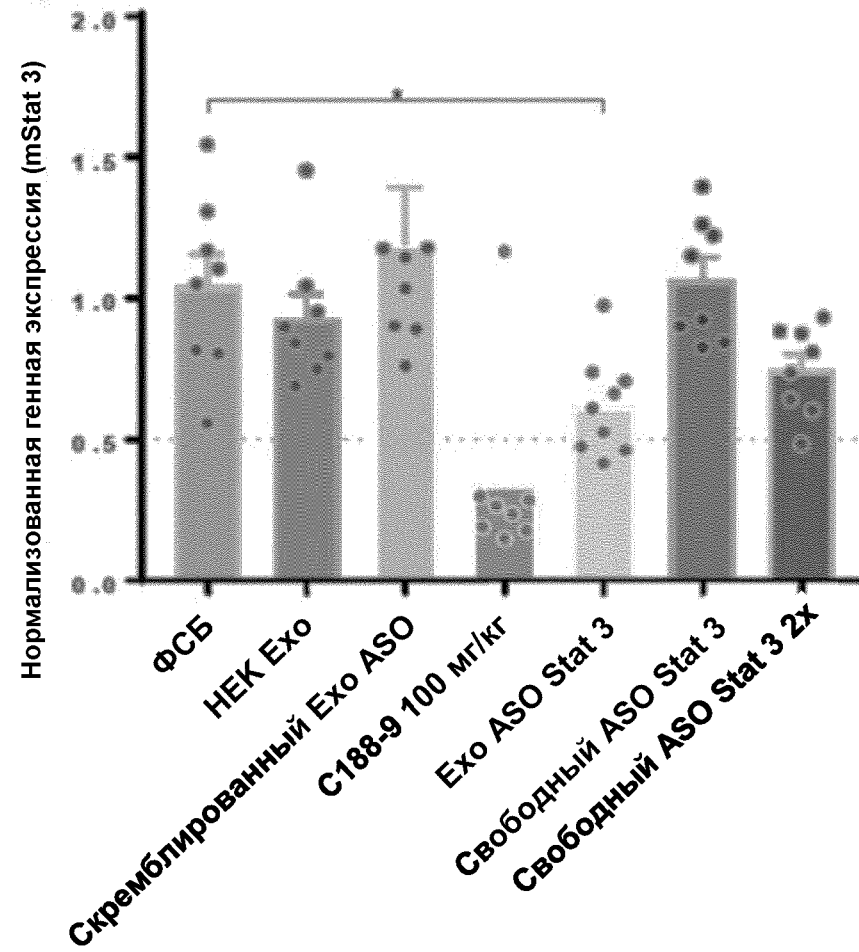


Фиг. 20

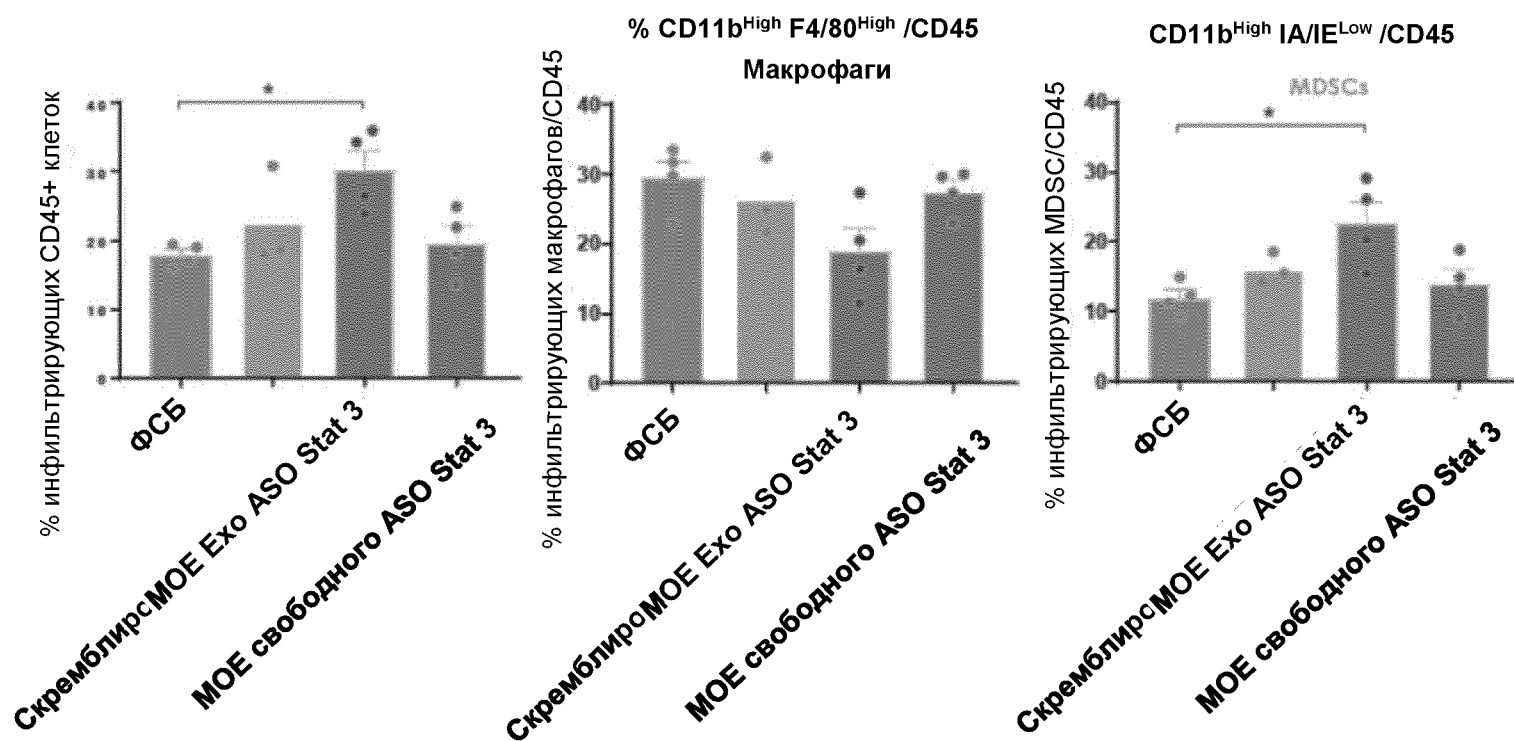


Stat 3

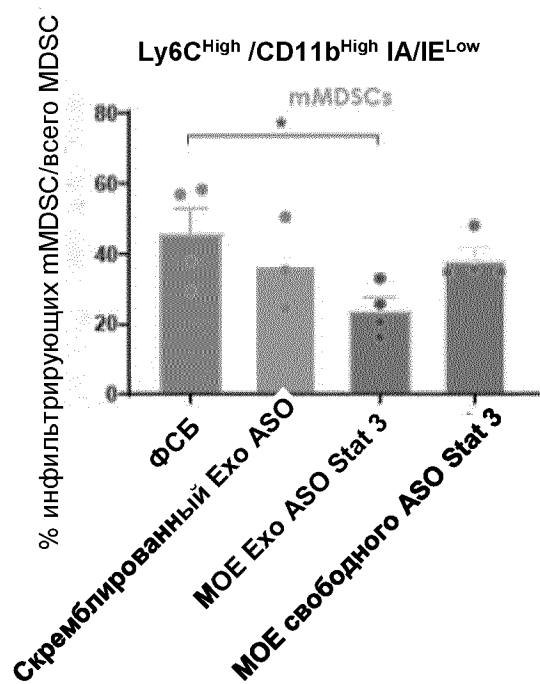
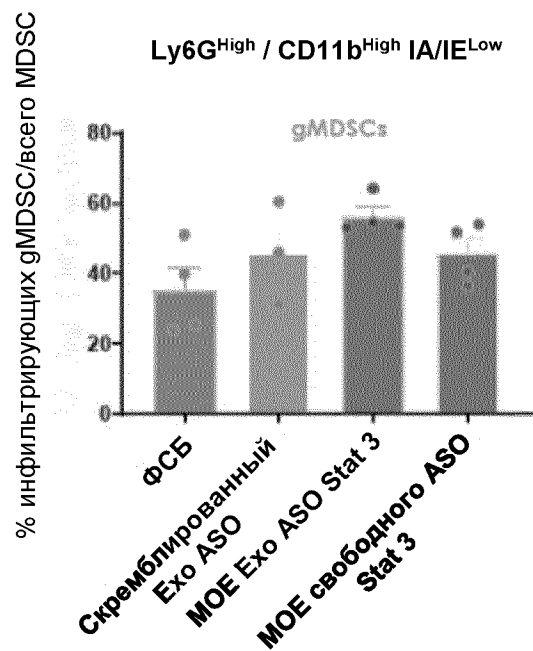
Фиг. 21



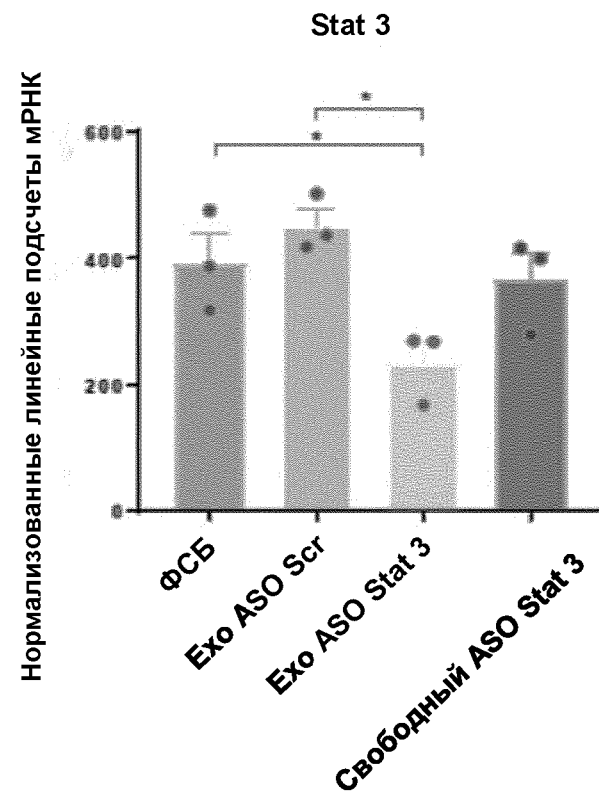
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

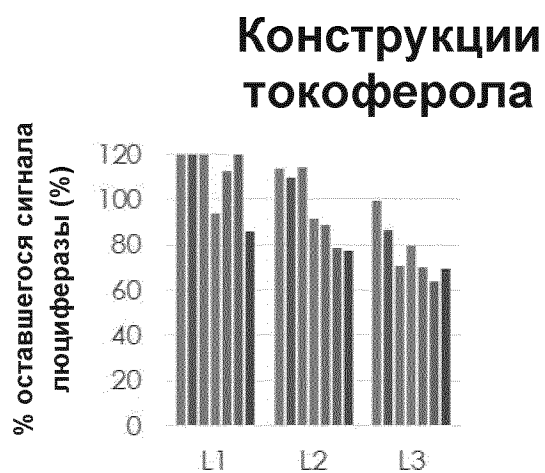
№	Липидный якорь	Связь	Спейсер 1	Связь	Спейсер 2	Связь	ASO	Эффективность загрузки	ASO на экзосому
C1	Холестерин-C6	п/о	C3	PS	Нет	Нет	FFLuc	43,44%	2606
C2					ТЭГ	PS		41,07%	2464
C3					HEG	PS		46,47%	2788
C4					Нет	Нет		43,85%	2631
C5					C3	PS		44,46%	2668
C6					HEG	PS		41,04%	2462
C7					Нет	Нет		40,07%	2404
C8					C3	PS		38,93%	2336
C9					Нет	Нет		27,04%	1623
T1	Холестерин-ТЭГ	п/о	C3	PS	Нет	Нет	FFLuc	29,24%	1754
T2					ТЭГ	PS		27,65%	1659
T3					HEG	PS		33,22%	1993
T4					Нет	Нет		31,50%	1890
T5					C3	PS		32,34%	1940
T6					HEG	PS		29,35%	1761
T7					HEG	Нет		31,79%	1907
T8					C3	PS		24,86%	1491
T9					Нет	Нет		19,34%	1161
L1	Токоферол-C8	п/о	ТЭГ	PS	HEG	PS	FFLuc	68,78%	4127
L2	Токоферола							42,73%	2564
L3	пальмитат-C6							37,45%	2247

Фиг. 26

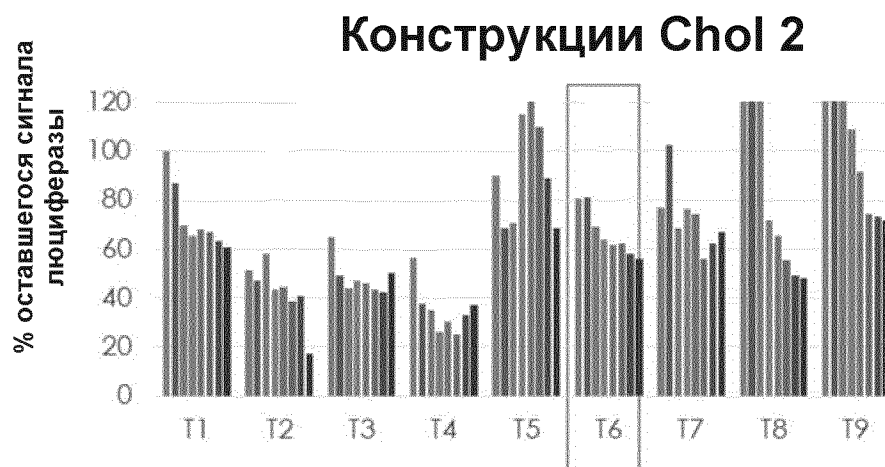
№	Липидный якорь	Связь	Спейсер 1	Связь	Спейсер 2	Связь	ASO	Эффективность загрузки	ASO на экзосому
C1	Холестерин-C6	п/о	C3	PS	Нет	Нет	FFLuc	80,39%	4824
C2					ТЭГ	PS		93,60%	5616
C3					HEG	PS		90,67%	5440
C4					Нет	Нет		88,08%	5285
C5					C3	PS		86,74%	5204
C6					HEG	PS		78,99%	4740
C7			HEG		Нет	Нет		80,85%	4851
C8					C3	PS		82,39%	4943
C9					Нет	Нет		Нет	Нет
T1	Холестерин-ТЭГ	п/о	C3	PS	Нет	Нет		76,65%	4599
T2					ТЭГ	PS		79,67%	4780
T3					HEG	PS		70,89%	4253
T4					Нет	Нет		68,17%	4090
T5			ТЭГ		C3	PS		67,03%	4022
T6					HEG	PS		58,82%	3529
T7			HEG		Нет	Нет	61,1 1%	3667	
T8			Нет		C3	PS	60,21%	3612	
T9					Нет	Нет	Нет	Нет	56,14%
L1	Токоферол-C8	п/о	ТЭГ	PS	HEG	PS	57,55%	3453	
L2	Токоферола						81,17%	4870	
L3	пальмитат-C6						73,33%	4400	



Фиг. 27А



Фиг. 27В



Фиг. 27С

Фиг. 28

SEQ ID NO	Начальный нуклеотид	антисмысловая последовательность (5'-3')	длина
62	152	CAAACAGCGTAACCCCT	17
63	225	CGTGGAGGACGATGATACTC	20
64	227	GACGTGGAGGACGATGATAC	20
65	235	AGCACCGCGACGTGGAGGAC	20
66	265	CTGACGATCGTGGAGACGAA	20
67	271	CATTGGCTGACGATCGTGGA	20
68	380	AGACTGCAGCCATTCGTTTG	20
69	383	GACAGACTGCAGCCATTCGT	20
70	385	TGGACAGACTGCAGCCATTC	20
71	418	ATGCTGAAGATGATCGACAG	20
72	479	GTAAAACCTGCCCCCTTGG	20
73	583	TAGGAGTAATCCGAGTTGAG	20
74	671	TCATTGCGGTTTCCGCAAGA	20
75	672	CTCATTGCGGTTTCCGCAAG	20
76	673	CCTCATTGCGGTTTCCGCAA	20
77	674	GCCTCATTGCGGTTTCCGCA	20
78	675	CTCATTGCGGTTTCCGC	17
79	676	CTCATTGCGGTTTCCG	16
80	678	GCCTCATTGCGGTTTC	16
81	939	CTTTAAGGCTCAACACGAGG	20
82	940	TCTTTAAGGCTCAACACGAG	20
83	1127	GGGTTTCTACCCACACTTTG	20
84	1130	TTGGGGTTTCTACCCACACT	20
85	1293	CACCTGTAAGGGCAAGTATG	20
86	1316	TTAGATGTGTGACGAAGATA	20
87	1317	TTAGATGTGTGACGAAGAT	20
88	1319	CATTTAGATGTGTGACGAAG	20
89	1365	GGTAAATCCATAGCACCAT	20
90	1404	TCCAGTGAGTTGTTTAGATG	20
91	1604	CACGGTCCCAAGGAGTCTAG	20
92	1605	TCACGGTCCCAAGGAGTCTA	20
93	1611	AGGAACTCACGGTCCCAAGG	20
94	1612	TAGGAACTCACGGTCCCAAG	20
95	1679	GTGGCCAATACAAGTCATTG	20

Фиг. 29

Описание	Смысловая	SEQ ID NO	Антисмысловая	SEQ ID NO
16_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CACCAGGGAACATCTCGGGG	201	CCCCGAGATGTTCCCTGGTG	236
17_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	ACCAGGGAACATCTCGGGGA	202	TCCCCGAGATGTTCCCTGGT	237
18_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CCAGGGAACATCTCGGGGAG	203	CTCCCCGAGATGTTCCCTGG	238
21_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GGGAACATCTCGGGGAGCCT	204	AGGCTCCCCGAGATGTTCCC	239
22_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GGAACATCTCGGGGAGCCTG	205	CAGGCTCCCCGAGATGTTCC	240
35_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GAGCCTGTTGGAAGCTGCA	206	TGCAGCTTCCAACAGGCTC	241
52_17mer_LNA_3-11-3	GCAGGCTTAGTCTGTCG	207	CGACAGACTAAGCCTGC	242
54_15mer_LNA_3-9-3	AGGCTTAGTCTGTCG	208	CGACAGACTAAGCCT	243
58_17mer_LNA_3-11-3	TTAGTCTGTCGGCTGCG	209	CGCAGCCGACAGACTAA	244
142_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GCTTGGAAGAAGGGTTACG	210	CGTAACCCCTTCTTCCAAGC	245
147_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GAAGAAGGGTTACGCTGTT	211	AACAGCGTAACCCCTTCTTC	246
148_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	AAGAAGGGTTACGCTGTTT	212	AAACAGCGTAACCCCTTCTT	247
149_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	AGAAGGGTTACGCTGTTTG	213	CAACAGCGTAACCCCTTCT	248
150_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GAAGGGTTACGCTGTTTGG	214	CCAACAGCGTAACCCCTTC	249
151_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	AAGGGTTACGCTGTTTGGC	215	GCCAAACAGCGTAACCCCTT	250
152_15mer_LNA_3-9-3	AGGGTTACGCTGTT	216	AACAGCGTAACCCCT	251
155_15mer_LNA_3-9-3	GGTTACGCTGTTTGG	217	CCAACAGCGTAACC	252
156_17mer_LNA_3-11-3	GTTACGCTGTTTGCCG	218	CGGCCAAACAGCGTAAC	253
156_15mer_LNA_3-9-3	GTTACGCTGTTTGGC	219	GCCAAACAGCGTAAC	254
157_17mer_LNA_3-11-3	TTACGCTGTTTGCCCG	220	CCGGCCAAACAGCGTAA	255
158_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	TACGCTGTTTGCCGGGCAG	221	CTGCCCGGCCAAACAGCGTA	256
159_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	ACGCTGTTTGCCGGGCAGA	222	TCTGCCCGGCCAAACAGCGT	257
160_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CGCTGTTTGCCGGGCAGAA	223	TTCTGCCCGGCCAAACAGCG	258
161_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GCTGTTTGCCGGGCAGAAA	224	TTTCTGCCCGGCCAAACAGC	259
162_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CTGTTTGCCGGGCAGAAAC	225	GTTTCTGCCCGGCCAAACAG	260
163_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	TGTTTGCCGGGCAGAAACT	226	AGTTTCTGCCCGGCCAAACA	261
164_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GTTTGCCGGGCAGAAACTC	227	GAGTTTCTGCCCGGCCAAAC	262
166_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	TTGGCCGGGCAGAAACTCCG	228	CGGAGTTTCTGCCCGGCCAA	263
167_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	TGGCCGGGCAGAAACTCCGC	229	GCGGAGTTTCTGCCCGGCCA	264
168_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GGCCGGGCAGAAACTCCGCT	230	AGCGGAGTTTCTGCCCGGCC	265
169_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GCCGGGCAGAAACTCCGCTG	231	CAGCGGAGTTTCTGCCCGGC	266
170_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CCGGGCAGAAACTCCGCTGA	232	TCAGCGGAGTTTCTGCCCGG	267
171_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	CGGGCAGAAACTCCGCTGAG	233	CTCAGCGGAGTTTCTGCCCG	268
172_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GGGCAGAAACTCCGCTGAGC	234	GCTCAGCGGAGTTTCTGCCCG	269
173_20mer_LNA-MOE_3-2-10-2-3	GGCAGAAACTCCGCTGAGCA	235	TGCTCAGCGGAGTTTCTGCC	270