

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290970** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.29

(22) Дата подачи заявки
2020.09.25

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ**

(31) **62/906,018; 62/906,485**

(32) **2019.09.25; 2019.09.26**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/052935**

(87) **WO 2021/062317 2021.04.01**

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

(72) Изобретатель:

**О'Нил Конлин, Бурдо Рэймонд,
Харрисон Рейн, Дозрти Майк, Нойес
Аарон (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям для хранения и введения внеклеточных везикул (например, экзосом), которые могут содержать каркасный белок и одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) экзогенных биологически активных фрагментов. Также в настоящем документе предложены способы получения экзосом и способы применения экзосом для лечения и/или предотвращения ряда медицинских нарушений.

A1

202290970

202290970

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573850EA/032

КОМПОЗИЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[1] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей (название: 4000_069PC02_Seqlisting_ST25, размер: 68 911 байт и дата создания: 24 сентября 2020 г.), поданного в настоящей заявке, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[2] Данная заявка РСТ испрашивает приоритет предварительных заявок США № 62/906018, поданной 25 сентября 2019 г.; и 62/906485, поданной 26 сентября 2019 г.; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Настоящее изобретение относится к композициям для хранения и введения внеклеточных везикул (ВВ), *например*, экзосом, которые могут содержать один или более экзогенных биологически активных фрагментов, а также к способам приготовления и применению таких композиций.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] ВВ, *например*, экзосомы, являются важными медиаторами межклеточной коммуникации. Они также являются важными биомаркерами в диагностике и прогнозировании многих заболеваний, включая рак. В качестве средств доставки лекарственных средств ВВ обладают преимуществами по сравнению с традиционными способами доставки лекарственных средств (*например*, пептидной иммунизацией, ДНК-вакцинами) в качестве нового способа лечения во многих терапевтических областях. Одной областью исследований является разработка композиций, которые могут стабильно содержать ВВ в течение длительного периода хранения перед введением пациенту без ущерба для эффективности ВВ. Известные составы имеют недостатки. Например, некоторые составы, *например* содержащие ТРИС-буфер, не предотвращают колебания рН при различных температурах (*например*, при замораживании или размораживании состава). Даже небольшие изменения рН могут вызывать агрегацию ВВ, тем самым уменьшая или предотвращая их функциональность. Кроме того, известные композиции включают посторонние компоненты, такие как экзогенно добавленные полипептиды, *например*, человеческий сывороточный альбумин или хелатирующие агенты.

[5] Соответственно, существует потребность в эффективных композициях для хранения и введения ВВ, которые преодолевают недостатки известных составов и, таким образом, могут лучше обеспечивать терапевтическое использование и другие применения технологий на основе ВВ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В настоящем документе предложены композиции для хранения и введения

внутриклеточных везикул, *например*, экзосом. Композиции по настоящему изобретению обеспечивают снижение агрегации ВВ, улучшенную стабильность ВВ, улучшенную целостность структуры ВВ, улучшенную стабильность сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ, и улучшенную стабильность пассивно загруженных или конъюгированных материалов, таких как низкомолекулярные лекарственные вещества или белки. Такие композиции можно замораживать, хранить при различных температурах в течение различных промежутков времени и размораживать без ущерба для стабильности ВВ, содержащихся в композиции. ВВ по настоящему изобретению могут включать биологически активные фрагменты, так что композиции можно использовать для лечения множества заболеваний или состояний, при которых введение ВВ, *например*, ВВ, модифицированных для включения биологически активных фрагментов, описанных в настоящем документе, оказывает благотворное влияние на субъекта.

[7] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (a) внутриклеточную везикулу; (b) сахарид; (c) хлорид натрия; (d) фосфат калия; и (e) фосфат натрия, при этом композиция находится в растворе при pH около 7,2. В некоторых аспектах внутриклеточная везикула представляет собой экзосому.

[8] В некоторых аспектах композиция может храниться в течение по меньшей мере около 4 часов, по меньшей мере около 5 часов, по меньшей мере около 6 часов, по меньшей мере около 7 часов, по меньшей мере около 8 часов, по меньшей мере около 9 часов, по меньшей мере около 10 часов, по меньшей мере около 11 часов, по меньшей мере около 12 часов, по меньшей мере около 15 часов, по меньшей мере около 20 часов, по меньшей мере около 24 часов, по меньшей мере около 2 суток, по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 4 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 6 дней или по меньшей мере около 7 дней при температуре 4°C.

[9] В некоторых аспектах композицию можно замораживать и размораживать, при этом размороженная композиция имеет pH около 7,2. В некоторых аспектах композиция имеет pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 или 7,4.

[10] В некоторых аспектах pI находится в диапазоне от около 1 до около 6,5.

[11] В некоторых аспектах композиция имеет (i) уменьшенное количество агрегатов, (ii) повышенную стабильность ВВ, (iii) улучшенную целостность структуры ВВ, (iv) повышенную стабильность сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ, и (v) улучшенную стабильность пассивно загруженных или конъюгированных материалов, таких как низкомолекулярные лекарственные вещества или белки.

[12] В некоторых аспектах сахарид содержит моносахарид, дисахарид, трисахарид, олигосахарид, полисахарид, сахарный спирт или любую их комбинацию. В некоторых аспектах сахарид имеет молекулярную массу от около 340,00 г/моль до около 380,00 г/моль. В некоторых аспектах сахарид содержит лактозу, глюкозу, сахарозу, трегалозу, декстрозу и/или их комбинации. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарный спирт с молекулярной массой от около 90,00 г/моль до около 190,00 г/моль. В некоторых аспектах сахарный спирт содержит глицерин, сорбит, маннит, ксилит и/или их

комбинации. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарозу или трегалозу. В некоторых аспектах сахарид присутствует в композиции в концентрации около 5% мас./об.

[13] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) внеклеточную везикулу и (ii) сахарид, который представляет собой сахарозу или трегалозу в концентрации около 5% мас./об. В некоторых аспектах композиция обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об.

[14] В некоторых аспектах композиция имеет проводимость от около 6 мСм/см до около 10 мСм/см. В некоторых аспектах проводимость составляет от 6 мСм/см до около 7 мСм/см, от около 7 мСм/см до около 8 мСм/см, от около 8 мСм/см до около 9 мСм/см или от около 9 мСм/см и до около 10 мСм/см. В некоторых аспектах проводимость составляет около 6 мСм/см, около 7 мСм/см, около 8 мСм/см, около 9 мСм/см или около 10 мСм/см.

[15] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит хлорид натрия. В некоторых аспектах хлорид натрия присутствует в композиции в концентрации от около 10 мМ до около 134 мМ. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет от около 10 мМ до около 130 мМ, от около 20 мМ до около 120 мМ, от около 30 мМ до около 110 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 50 мМ до около 90 мМ, от около 60 мМ до около 80 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 95 мМ, от около 45 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 70 мМ, от около 45 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 60 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ или от около 51 мМ до около 54 мМ. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ или около 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет около 39 мМ, около 40 мМ, около 41 мМ, около 42 мМ, около 43 мМ, около 44 мМ, около 45 мМ, около 46 мМ, около 47 мМ, около 48 мМ, около 49 мМ или около 50 мМ.

[16] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит фосфатный буфер. В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит по меньшей мере одно фосфатное соединение, включающее фосфат калия, фосфат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, дикалийфосфат и/или их комбинацию.

[17] В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 2, около 1: около 3, около 1: около 4 или около 1: около 5. В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 3. В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 2.

[18] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) внеклеточную везикулу, (ii) фосфат калия

и (iii) фосфат натрия в растворе, причем соотношение фосфата калия и фосфата натрия составляет от около 1 до около 3 или от около 1 до около 2.

[19] В некоторых аспектах раствор имеет pH от 7,1 до 7,3.

[20] В некоторых аспектах фосфат калия присутствует в композиции в концентрации от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 19 мМ, от около 3 мМ до около 18 мМ, от около 4 мМ до около 17 мМ, от около 5 мМ до около 16 мМ или от около 5 мМ до около 15 мМ.

[21] В некоторых аспектах концентрация фосфата калия составляет около 4,5 мМ, около 4,6 мМ, около 4,7 мМ, около 4,8 мМ, около 4,9 мМ, около 5,0 мМ, около 5,1 мМ, около 5,2 мМ, около 5,3 мМ, около 5,4 мМ или около 5,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация фосфата калия составляет 5,15 мМ.

[22] В некоторых аспектах концентрация фосфата калия составляет около 15,0 мМ, около 15,1 мМ, около 15,2 мМ, около 15,3 мМ, около 15,4 мМ, около 15,5 мМ, около 15,6 мМ, около 15,7 мМ, около 15,8 мМ, около 15,9 мМ, около 16,0 мМ, около 16,1 мМ, около 16,2 мМ, около 16,3 мМ, около 16,4 мМ или около 16,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация фосфата калия составляет 15,4 мМ.

[23] В некоторых аспектах фосфат калия представляет собой одноосновный фосфат калия.

[24] В некоторых аспектах фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации от около 10 мМ до около 30, от около 11 мМ до около 29 мМ, от около 12 мМ до около 28 мМ, от около 13 мМ до около 27 мМ или от около 14 мМ до около 26 мМ.

[25] В некоторых аспектах композиция по п. 39, в которой фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации около 14,5 мМ, около 14,6 мМ, около 14,7 мМ, около 14,8 мМ, около 14,9 мМ, около 15,0 мМ, около 15,1 мМ, около 15,2 мМ, около 15,3 мМ, около 15,4 мМ или около 15,5 мМ.

[26] В некоторых аспектах концентрация фосфата натрия составляет 14,9 мМ.

[27] В некоторых аспектах фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации около 26,5 мМ, около 26,6 мМ, около 26,7 мМ, около 26,8 мМ, около 26,9 мМ, около 27,0 мМ, около 27,1 мМ, около 27,2 мМ, около 27,3 мМ, около 27,4 мМ или около 27,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация фосфата натрия составляет 27,1 мМ.

[28] В некоторых аспектах фосфат натрия представляет собой гептагидрат двухосновного фосфата натрия.

[29] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит антиоксидант. В некоторых аспектах антиоксидант содержит D-метионин, L-метионин, аскорбиновую кислоту, эриторбиновую кислоту, аскорбат натрия, тиоглицерин, цистеин, ацетилцистеин, цистин, дитиоэритреитол, глутатион, токоферолы, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), бисульфат натрия, дитионит натрия, А-токоферол, γ -токоферол, пропил галлат, аскорбилпальмитат, метабисульфит натрия, тиомочевину, тиосульфат натрия, пропилгаллат и тиогликолят натрия.

[30] В некоторых аспектах композиция не является лиофилизированной.

[31] В некоторых аспектах композиция не содержит хелатирующего агента.

[32] В некоторых аспектах композиция не содержит альбумина.

[33] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая (a) сахарозу в концентрации около 5% мас./об., (b) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ; (c) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ; и (d) гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 15 мМ; при этом композиция находится в растворе при pH 7,2 и проводимости 8,8 мСм/см.

[34] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая (a) сахарозу в концентрации около 5% мас./об., (b) хлорид натрия в концентрации около 40 мМ; (c) одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ; и (d) гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ; при этом композиция находится в растворе при pH 7,2 и проводимости 7,2 мСм/см.

[35] В некоторых аспектах композицию можно хранить при температуре от около -20°C до около -80 °C, при этом стабильность внеклеточной везикулы не снижается. В некоторых аспектах композиция может храниться в течение около одной недели, около двух недель, около трех недель, около четырех недель, около одного месяца, около двух месяцев, около трех месяцев, около четырех месяцев, около пяти месяцев, около шести месяцев, около семи месяцев, около восьми месяцев, около девяти месяцев, около десяти месяцев, около 11 месяцев, около 12 месяцев, около года, около двух лет, около трех лет, около четырех лет или около пяти лет.

[36] В некоторых аспектах внеклеточная везикула представляет собой экзосому.

[37] В некоторых аспектах внеклеточная везикула дополнительно содержит каркасный белок. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой каркас X. В некоторых аспектах полезная нагрузка связана с каркасным белком. В некоторых аспектах полезная нагрузка связана с каркасным белком линкером. В некоторых аспектах линкер представляет собой полипептид. В некоторых аспектах линкер представляет собой неполипептидный фрагмент. В некоторых аспектах каркас X представляет собой каркасный белок, способный закреплять полезную нагрузку на внешней поверхности внеклеточной везикулы.

[38] В некоторых аспектах каркасный белок содержит отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN).

[39] В некоторых аспектах каркасный белок содержит белок PTGFRN или его фрагмент. В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-7 и 33. В некоторых аспектах каркасный белок содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1.

[40] В некоторых аспектах внеклеточная везикула содержит биологически

активный фрагмент. В некоторых аспектах каркасный белок слит с биологически активным фрагментом. В некоторых аспектах каркасный белок не слит с биологически активным фрагментом.

[41] В некоторых аспектах биологически активный фрагмент содержит агонист STING. В некоторых аспектах агонист STING содержит CL656. В некоторых аспектах агонист STING представляет собой изомер А, изомер В, изомер С или изомер D CL656. В некоторых аспектах агонист STING не слит с каркасным белком.

[42] В некоторых аспектах биологически активным фрагментом является IL-12. В некоторых аспектах биологически активный фрагмент представляет собой CD40L. В других аспектах биологически активным фрагментом является FTL3L.

[43] В некоторых аспектах биологически активный фрагмент слит с каркасным белком.

[44] В некоторых аспектах композицию можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, чрескожным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, внутриопухолевым, внутримышечным путем, или в виде ингаляционного средства.

[45] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ приготовления фармацевтической композиции, включающий объединение: (а) внеклеточной везикулы; (b) сахара; (с) хлорида натрия; (d) фосфата калия; и (е) фосфата натрия. В некоторых аспектах внеклеточная везикула представляет собой экзосому.

[46] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ приготовления фармацевтической композиции, включающий объединение внеклеточной везикулы и сахара, который представляет собой сахарозу или трегалозу, в концентрации около 5% мас./об., при этом композиция проявляет улучшенную стабильность по сравнению с композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1 до 4%.

[47] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ приготовления фармацевтической композиции, включающий комбинирование внеклеточной везикулы и фосфатного соединения, где фосфатное соединение включает фосфат калия и фосфат натрия в соотношении, обеспечивающем рН от 7,1 до 7,3.

[48] В некоторых аспектах проводимость композиции можно регулировать. В некоторых аспектах проводимость композиции составляет от около 7,1 до около 7,3 мСм/см. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена проводимость 7,23 мСм/см.

[49] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой рак, фиброз, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, глазное заболевание, болезнь Помпе, лизосомную болезнь накопления, муковисцидоз, кистозный фиброз, мышечную дистрофию Дюшенна и Беккера,

транстретиновый амилоидоз, гемофилию А, гемофилию В, дефицит аденозиндезаминазы, врожденный амавроз Лебера, X-сцепленную аденолейкодистрофию, метахроматическую лейкодистрофию, дефицит ОТС, болезнь накопления гликогена 1А, синдром Криглера-Наджара, первичную гипероксалурию 1 типа, острую перемежающуюся порфирию, фенилкетонурию, семейную гиперхолестеринемию, мукополисахаридоз VI типа, дефицит α 1-антитрипсина и гиперхолестеринемию. В некоторых аспектах рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичка, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак яичников, лимфому, рак печени, глиобластому, меланому, миелому, лейкемию, рак поджелудочной железы или их комбинацию.

[50] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта.

[51] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено применение композиции, описанной в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[52] На ФИГ. 1А показано схематическое изображение экзосомы, содержащей белок X и биологически активный фрагмент, в соответствии с аспектом настоящего изобретения. Показаны поверхностные белки CD9, CD81 и TSG101, а также липидный домен сфингомиелина. Далее показаны экзосомальные компоненты мРНК, микроРНК и метаболиты.

[53] На ФИГ. 1В показан график, показывающий дзета-потенциал (в мВ) нативных (черные квадраты) экзосом и экзосом, содержащих белок X (кружки), в соответствии с аспектом настоящего изобретения. Ось X соответствует pH. Ось Y соответствует дзета-потенциалу в мВ.

[54] На ФИГ. 2А показан график, показывающий Z-среднее значение (в нм) нативных экзосом (черный квадрат) и экзосом с белком X (круг) при различных значениях pH в соответствии с аспектом настоящего изобретения. Ось X соответствует pH. Ось Y соответствует среднему значению Z в нм.

[55] На ФИГ. 2В показано схематическое изображение, показывающее стабильный диапазон pH (квадрат со скругленными углами) ВВ в соответствии с аспектом изобретения. Показанный стабильный диапазон pH составляет от 7 до 8. Стрелки указывают результат изменения pH на ВВ, если pH слишком низкий (агрегация ВВ) или слишком высокий (гидролиз липидов).

[56] На ФИГ. 2С показано увеличенное изображение криогенной трансмиссионной электронной микрофотографии, показывающей белок X ВВ в соответствии с аспектом настоящего изобретения. Экзосомы витрифицируются в воде, а не сушат. На этом изображении показаны экзосомы в воде без кристаллов льда. Теоретическая изоэлектрическая точка (pI) белка X ВВ отмечена как 6.2. Размер ВВ, содержащих белок

X, составляет ~100 нм.

[57] На ФИГ. 2D показана фотография микроцентрифужных пробирок, содержащих различные композиции, в соответствии с аспектами настоящего изобретения. Пробирка А содержит сахарозу+буфер, который трижды замораживали и размораживали. Пробирка В содержит только буфер, который трижды замораживали и размораживали. Пробирка С содержит только воду Milli-Q, которую трижды замораживали и размораживали. Пробирки показывают наличие как изменения цвета, так и помутнения. Также показано, что соль обеспечивает некоторую степень защиты по сравнению с образцом в чистой воде.

[58] На ФИГ. 3А показан график, показывающий распределение концентрации агониста STING (в мкМ) в экзосомах по сравнению с концентрацией агониста STING в супернатантах при хранении содержащих экзосомы буферов при температурах -80 °С, 4 °С и 22 °С в течение периода от 0 до 12 часов в соответствии с аспектом изобретения. На этом графике показаны временные точки 0-12 часов на ФИГ. 3В. Ось X соответствует времени в часах. Ось Y соответствует концентрации агониста STING в мкМ.

[59] На ФИГ. 3В показан график, показывающий распределение концентрации агониста STING (в мкМ) в экзосомах по сравнению с концентрацией агониста STING в супернатантах при хранении содержащих экзосомы буферов при температурах -80 °С, 4 °С и 22 °С в течение периода от 12 до 72 часов в соответствии с аспектом изобретения. Ось X соответствует времени в часах. Ось Y соответствует концентрации агониста STING в мкМ.

[60] На ФИГ. 3С показан график, показывающий влияние введения забуференного фосфатом солевого раствора, нативных экзосом в буфере и экзосом, содержащих агонист STING в буфере, на экспрессию генов у мышей C57BL/6 через 4 часа после введения, согласно аспекту настоящего изобретения. Буферы, содержащие экзосомы, хранили при 4°С и 22°С в течение 24 или 72 часов. Ось X соответствует различным протестированным образцам. Ось Y соответствует уровню нормализованной экспрессии генов.

[61] На ФИГ. 3D показан график, показывающий внутриопухолевые концентрации свободного агониста STING (пунктирная линия, внизу) и агониста STING, инкапсулированного в экзосомы (сплошная линия, вверху) в опухолях меланомы B16-F10 у мышей C57BL/6 с течением времени, в соответствии с аспектом изобретения. Ось X соответствует времени в минутах. Ось Y соответствует концентрации агониста STING в нМ.

[62] На ФИГ. 4А-4С показаны схематические изображения процесса получения агонистов STING, инкапсулированных в экзосомы, в соответствии с аспектом изобретения. На ФИГ. 4А показана нагрузка агонистов STING в экзосому путем насыщения буферного раствора, содержащего экзосомы, агонистом STING, так что часть STING диффундирует в экзосому. На ФИГ. 4В показана очистка экзосом (т.е. удаление агониста STING, который не диффундировал в экзосомы). На ФИГ. 4С показано уравнивание экзосом, содержащих агонист STING (т.е. пассивная диффузия

агонистов STING из экзосом в окружающий буфер).

[63] На ФИГ. 5 показан график, показывающий содержание IL-12 (в нг/мл), связанного с экзосомами. Ось X соответствует времени (в днях), в течение которого экзосомы хранятся. Ось Y соответствует содержанию IL-12 в нг/мл. Слева направо столбцы представляют (1) контроль, без пероксида; (2) контроль, 0,05% пероксида; (3) тиосульфат, без пероксида; (4) тиосульфат, 0,05% пероксида; (5) аскорбат, без пероксида; (6) аскорбат, 0,05% пероксида; (7) глутатион, без пероксида; (8) глутатион, 0,05% пероксида; (9) метионин, без пероксида; (10) метионин, 0,05% пероксида.

[64] На ФИГ. 6 показан график, показывающий диаметр (в нм) экзосом через различные промежутки времени. Ось X соответствует времени (в днях), в течение которого экзосомы хранятся. Ось Y соответствует диаметру экзосом (в нм). Слева направо столбцы представляют (1) контроль; (2) контроль и пероксид водорода; (3) тиосульфат; (4) тиосульфат и пероксид водорода; (5) аскорбат; (6) аскорбат и пероксид водорода; (7) глутатион; (8) глутатион и пероксид водорода; (9) метионин; (10) метионин и пероксид водорода.

[65] На ФИГ. 7 показан график, показывающий PDI раствора экзосом через различные промежутки времени. Ось X соответствует времени (в днях), в течение которого экзосомы хранятся. Ось Y соответствует индексу полидисперсности.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[66] Настоящее изобретение относится к композициям для хранения и введения ВВ, *например*, экзосом, которые могут содержать один или более биологически активных фрагментов, в которых стабильность и целостность ВВ и полезной нагрузки сохраняются в течение различных периодов времени и температур, включая замораживание и размораживание. Несколько биологически активных фрагментов могут быть присоединены (или связаны) к одному или более каркасным фрагментам на внешней поверхности ВВ (*например*, экзосом). В данном документе описаны неограничивающие примеры различных аспектов.

Определения

[67] Для облегчения понимания настоящего описания сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены на протяжении всего подробного описания.

[68] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают в себя ссылки на одно или более; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или более 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.

[69] 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», используемый в такой фразе, 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).

[70] Понятно, что всякий раз, когда аспекты описываются в настоящем документе с использованием формулировки «содержащий», в противном случае также предоставляются аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[71] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в данном описании.

[72] Единицы, префиксы и символы обозначают в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записывают слева направо в направлении от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записывают слева направо в направлении от аминогруппы к карбоксильной группе. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание в целом.

[73] В контексте настоящего документа термин «около» применяют для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «около» используют 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 (больше или меньше).

[74] Используемый в данном документе термин «**внеклеточная везикула**» или «**ВВ**» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая окружает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы представляют собой все связанные с мембраной везикулы (*например*, экзосомы, нановезикулы, микровезикулы), 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, низкомолекулярные вещества и/или их комбинации. В некоторых аспектах ВВ содержит несколько (*например*, две или более) полезных нагрузок или другие экзогенные биологически активные фрагменты. В некоторых аспектах внеклеточная везикула может дополнительно содержать один или более каркасных фрагментов. 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. Описанные в данном документе ВВ были модифицированы и, следовательно, не включают встречающиеся в природе ВВ.

[75] Используемый в данном документе термин «**экзосома**» относится к внеклеточной везикуле 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 некоторых аспектах экзосома содержит несколько (*например*, два или более) экзогенных биологически активных фрагментов (*например*, как описано в настоящем документе). В некоторых аспектах экзосома дополнительно содержит один или более каркасных фрагментов. 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 ВВ (*например*, экзосомы) по настоящему изобретению продуцируются клетками, которые экспрессируют один или более трансгенных продуктов. Экзосомы по настоящему изобретению модифицированы и, следовательно, не включают встречающиеся в природе экзосомы.

[76] Используемый в данном документе термин «**нановезикула**» относится к внеклеточной везикуле диаметром от 20 до 250 нм (*например*, от 30 до 150 нм), которая образуется из клетки (*например*, клетки-продуцента) путем прямой или косвенной манипуляции таким образом, что нановезикула не будет 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 некоторых аспектах нановезикула содержит несколько (*например*, по меньшей мере два) экзогенных биологически активных фрагментов. В некоторых аспектах нановезикула дополнительно содержит один или более каркасных фрагментов. Нановезикулы, однажды полученные из клетки-продуцента, могут быть выделены из клетки-продуцента на основе ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. Используемые в данном изобретении нановезикулы были модифицированы и, следовательно, не включают встречающиеся в природе нановезикулы.

[77] В контексте данного документа термин «**ВВ со сконструированной поверхностью**, *например*, экзосомы» (*например*, сконструированные с помощью каркаса X ВВ, *например*, экзосомы), относится к ВВ (*например*, экзосоме) с мембраной или поверхностью, модифицированной по своему составу таким образом, что мембрана или поверхность сконструированной ВВ (*например*, экзосомы) отличается от мембраны или поверхности ВВ до модификации или встречающейся в природе ВВ. Конструирование может происходить на поверхности ВВ (*например*, экзосомы) или в мембране ВВ (*например*, экзосомы), так что поверхность ВВ, *например*, экзосомы, изменяется. Например, мембрану модифицируют по своему составу белка, липида, низкомолекулярного вещества, углевода и *т. д.* Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, предварительно или одновременно модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав можно изменить с помощью генной инженерии или получить из клетки, предварительно модифицированной с помощью генной инженерии. В некоторых аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, содержит несколько (*например*, по меньшей мере два) экзогенных биологически активных фрагментов. В некоторых аспектах экзогенные биологически активные фрагменты могут содержать экзогенный белок (*т.е.* белок, который ВВ, *например*, экзосома, не экспрессирует в природе) или его фрагмент или вариант, который может быть экспонирован на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или может быть точкой прикрепления (присоединения) фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В других аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосома, содержит более высокую экспрессию (*например*, большее количество) природного белка экзосомы (*например*, каркаса X) или его фрагмента или варианта, который может быть экспонирован на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или может представлять собой точку прикрепления (присоединения) фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, *например*, экзосомы.

[78] Термин «модифицированный», когда он используется в контексте ВВ, *например*, экзосом, описанных в настоящем документе, относится к изменению или конструированию ВВ, *например*, экзосомы и/или ее клетки-продуцента, таким образом, 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, низкомолекулярного вещества, углевода и т. д. по сравнению с мембраной встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы (*например*, мембрана содержит более высокую плотность или большее количество природных белков экзосомы, и/или мембрана содержит несколько (*например*, по меньшей мере две) биологически активных фрагментов, которые в природе не встречаются в экзосомах. Используемые в данном документе биологически активные фрагменты, которые в природе не встречаются в экзосомах, также описывают как «экзогенные биологически активные фрагменты». В некоторых аспектах такие модификации мембраны изменяют внешнюю поверхность ВВ, *например*, экзосомы (*например*, ВВ со сконструированной поверхностью, *например* экзосомы, описанные в настоящем документе).

[79] Используемый в данном документе термин «**каркасный фрагмент**» относится к молекуле, которую можно использовать для закрепления полезной нагрузки или любого другого экзогенного биологически активного фрагмента, представляющего интерес для ВВ, *например*, экзосомы, либо на поверхности просвета, либо на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит синтетическую молекулу. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит неполипептидный фрагмент. В других аспектах каркасный фрагмент содержит липид, углевод или белок, который естественным образом присутствует в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах каркасный фрагмент содержит липид, углевод или белок, который естественным образом не присутствует в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах каркасный фрагмент представляет собой каркас X. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент содержит каркас X и другой каркасный фрагмент. Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают: аминопептидазу N (CD13); неприлизин, также известный как мембранная металлоэндопептидаза (ММЕ); член семейства эктонуклеотидов пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (ENPP1); нейропилин-1 (NRP1); CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин, LAMP2 и LAMP2B.

[80] Используемый в данном документе термин «**каркас X**» относится к белкам экзосом, которые недавно были идентифицированы на поверхности экзосом. *См., например*, патент США № 10195290, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры каркасных белков X включают: отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 («белок PTGFRN»); базигин («белок BSG»); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF2»); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF3»); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF8»); интегрин бета-1 («белок ITGB1»), интегрин альфа-4 («белок ITGA4»), тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 («белок SLC3A2») и класс белков-переносчиков АТФ («белок АТФ1А1», «белок АТФ1А2», «белок АТФ1А3», «белок АТФ1А4», «белок АТФ1В3», «белок АТФ2В1», «белок АТФ2В2», «белок АТФ2В3»,

«белок АТР2В»). В некоторых аспектах каркасный белок X может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, способный прикреплять другой фрагмент на внешней поверхности или на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркас X может прикреплять фрагмент (*например*, полезную нагрузку) на внешней поверхности или поверхности просвета экзосомы.

[81] Используемый в данном документе термин «**каркас Y**» относится к белкам экзосом, которые были недавно идентифицированы на поверхности просвета экзосом. *См.*, *например*, международную публикацию № WO/2019/099942, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры каркасных белков Y включают: миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы С («белок MARCKS»); белок 1, подобный миристоилированному богатому аланином субстрату протеинкиназы С, («белок MARCKSL1») и кислоторастворимый белок головного мозга 1 («белок BASP1»). В некоторых аспектах каркасный белок Y может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, способный прикреплять фрагмент на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосом). В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент (*например*, агониста STING и/или фрагмент IL-12) в просвете ВВ, *например*, экзосомы.

[82] Используемый в данном документе термин «**фрагмент**» белка (*например*, терапевтический белок или каркас X) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче природной последовательности, с N- и/или C-концевой делецией, или любой части белка с делецией по сравнению с встречающимся в природе белком. Используемый в данном документе термин «**функциональный фрагмент**» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка X сохраняет способность прикреплять фрагмент на поверхности просвета или на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Является ли фрагмент функциональным фрагментом, можно оценить любыми известными способами для определения содержания белка в ВВ, *например*, экзосоме, включая вестерн-блоттинг, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, такими как, *например*, GFP. В некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка X сохраняет 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, *например*, способности прикреплять фрагмент встречающегося в природе каркасного белка X.

[83] Используемый в настоящем документе термин «**вариант**» молекулы (*например*, функциональной молекулы, антигена или каркаса X) относится к молекуле, которая имеет определенную структурную и функциональную идентичность с другой молекулой при сравнении методом, известным в данной области техники. Например, вариант белка может включать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки считывания или

перестановку в другом белке.

[84] В некоторых аспектах вариант каркаса X содержит вариант, имеющий по меньшей мере около 70% идентичности с полноразмерными зрелыми белками-переносчиками PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или ATP или фрагментами (*например*, функциональными фрагментами) белков-переносчиков PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или ATP. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов PTGFRN имеют по меньшей мере около 70%, 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% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с PTGFRN в соответствии с SEQ ID NO: 1 или его функциональным фрагментом.

[85] «**Консервативная аминокислотная замена**» представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин и гистидин), кислотные боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин и изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменена 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.

[86] Термин «процентная идентичность последовательности» или «процентная идентичность» между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в окне сравнения, с учетом добавлений или удалений (*т. е.* гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающим положением является любое положение, в котором как в целевой, так и в эталонной последовательности представлен идентичный нуклеотид или аминокислота. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогично, гэпы, представленные в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[87] Процентное значение идентичности последовательностей рассчитывают путем

определения числа положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно осуществить при помощи программного обеспечения, легко доступного как для применения в режиме онлайн, так и для загрузки на компьютер. 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.

[88] 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.

[89] Построение выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. Выравнивание последовательностей можно получить из множественного выравнивания последовательностей. Одной подходящей программой для построения множественного выравнивания последовательностей является *ClustalW2*, доступная на веб-сайте www.clustal.org. Другой подходящей программой является *MUSCLE*, доступная на веб-сайте www.drive5.com/muscle/. Программы *ClustalW2* и *MUSCLE* альтернативно доступны, *например*, от EBI.

[90] 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.

[91] Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих типах областей. В одном аспекте варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые вызывают молчащие замены, добавления или делеции, но которые не меняют свойства или активность кодируемого полипептида. В другом аспекте варианты нуклеотидов продуцируются молчащими заменами из-за вырожденности генетического кода. В других аспектах варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, удалены или добавлены в любой комбинации. Полинуклеотидные варианты могут быть созданы по множеству причин, *например* с целью оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (изменение кодонов человеческой мРНК на другие, *например* на те, которые подходят для бактериального хозяина типа *E. coli*).

[92] 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.

[93] 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.)

[94] 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 PL-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.

[95] Как указано выше, варианты полипептидов включают, *например*, модифицированные полипептиды. Модификации включают, *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-карбоксихлирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксиглирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (публикация Mei et al., Blood 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых аспектах каркас X модифицируют в любом удобном месте.

[96] Используемые в данном документе термины «**связанный с**», «**конъюгированный с**» и «**прикрепленный к**» используются взаимозаменяемо и относятся к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первым фрагментом и вторым фрагментом, *например*, каркасом X и экзогенным биологически активным фрагментом, соответственно, *например* каркасным фрагментом, экспрессируемый во внеклеточной везикуле или на ней, и антигеном, *например*, каркасом X (*например*, белком PTGFRN), соответственно, на поверхности просвета или на внешней поверхности внеклеточной везикулы.

[97] Термин «**инкапсулированный**» или грамматически отличные формы этого термина (*например*, инкапсуляция или инкапсулирование) относится к состоянию или процессу наличия первого фрагмента (*например*, экзогенного биологически активного фрагмента, *например*, агониста STING) внутри второго фрагмента (*например*, ВВ, *например*, экзосомы) без химического или физического связывания двух фрагментов. В некоторых аспектах термин «**инкапсулированный**» может использоваться взаимозаменяемо с термином «**в просвете**». Неограничивающие примеры инкапсулирования первого фрагмента (*например*, экзогенного биологически активного

фрагмента, *например*, антигена, адъюванта или иммуномодулятора) во второй фрагмент (*например*, ВВ, *например*, экзосому) описаны в другом месте настоящего документа.

[98] Используемый в настоящем документе термин «**клетка-продуцент**» относится к клетке, используемой для получения ВВ, *например*, экзосомы. Клетка-продуцент может быть клеткой, культивируемой *in vitro*, или клеткой *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 ВJ, 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. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, применимые в настоящем изобретении, не несут антиген на молекуле ГКГС класса I или класса II, экспонированной на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, но вместо этого могут нести антиген в просвете ВВ, *например*, экзосомы, или на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, путем прикрепления к каркасу X.

[99] Используемые в данном документе термины «**выделять**», «**выделенный**» и «**выделение**» или «**очищать**», «**очищенный**» и «**очищение**», а также «**экстрагированный**» и «**экстрагировать**» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию препарата (*например*, множество известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желаемых ВВ, которые подверглись одному или более процессам очистки, *например*, отбору или обогащению препарата желаемых ВВ. В некоторых аспектах выделение или очистка в данном контексте представляет собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) ВВ из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых аспектах выделенная композиция ВВ не обладает обнаруживаемой нежелательной активностью или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или количестве, или ниже его. В других аспектах выделенная композиция ВВ имеет количество и/или концентрацию желаемых ВВ на уровне или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других аспектах выделенная композиция ВВ обогащена по сравнению с исходным материалом (*например*, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может быть на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых аспектах изолированные препараты ВВ практически не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах выделенные препараты ВВ являются свободными на 100%, свободными на 99%, свободными на 98%, свободными на 97%, свободными на 96%,

свободными на 95%, свободными на 94%, свободными на 93%, свободными на 92%, свободными на 91% или свободными на 90% от загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. По существу отсутствие остаточных биологических продуктов может также означать, что композиция ВВ не содержит поддающихся обнаружению клеток-продуцентов и что поддаются обнаружению только ВВ.

[100] Используемый в настоящем документе термин **«иммуномодулятор»** относится к агенту, который действует на мишень (*например*, клетку-мишень), контактирующую с внеклеточной везикулой, и регулирует иммунную систему. Неограничивающие примеры иммуномодулятора, который можно ввести в ВВ (*например*, экзосому) и/или клетку-продуцент, включают агенты, такие как модуляторы ингибиторов контрольных точек, лиганды ингибиторов контрольных точек, цитокины, их производные или любую их комбинацию. Иммуномодулятор также может включать агонист, антагонист, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, такой как миРНК, микроРНК, днкРНК, мРНК, ДНК или низкомолекулярное вещество.

[101] Используемый в данном документе термин **«полезная нагрузка»** относится к агенту, который воздействует на мишень (*например*, на клетку-мишень), контактирующую с ВВ. Неограничивающими примерами полезной нагрузки, которая может быть включена в ВВ, *например*, экзосому, является биологически активная молекула, например, терапевтическая молекула, адъювант и/или иммуномодулятор. Полезные нагрузки, которые могут быть введены в ВВ, *например*, экзосому, и/или клетки-продуценты, включают 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, дц ДНК, днкРНК и миРНК), аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, нарушающий трансляцию), полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарственные вещества и токсины). В конкретных аспектах полезная нагрузка содержит экзогенный биологически активный фрагмент (*например*, описанный в настоящем документе). В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах полезная нагрузка «пассивно нагружается» на или в ВВ, *например*, экзосому. Используемый в данном документе термин «пассивно нагруженный» относится к ассоциации между ВВ, *например*, экзосомой, и полезной нагрузкой, присутствующей в одном и том же растворе. При пассивной нагрузке полезная нагрузка будет связана с ВВ, например, за счет естественной диффузии и/или притяжения.

[102] Используемый в настоящем документе термин **«нацеливающий фрагмент»** относится к агенту, который может изменять распределение внеклеточных везикул

(например, экзосом, нановезикул) *in vivo* или *in vitro* (например, в смешанной культуре клеток разных видов). Нацеливающий фрагмент может быть биологической молекулой, такой как белок, пептид, липид или углевод, или синтетической молекулой. Например, нацеливающий фрагмент может представлять собой антитело (например, нанотело анти-CD19, нанотело анти-CD22), синтетический полимер (например, ПЭГ), природный лиганд (например, CD40L, альбумин), рекомбинантный белок (например, XTEN), но не ограничиваясь этим. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представлен на поверхности ВВ. Целевой фрагмент может быть представлен на поверхности ВВ путем слияния с каркасным белком (например, каркасом X) (например, в виде генетически кодируемой слитой молекулы). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент может быть представлен на поверхности ВВ посредством химической реакции, при которой нацеливающий фрагмент прикрепляется к поверхностной молекуле ВВ. Неограничивающим примером является ПЭГилирование. В некоторых аспектах раскрытые в настоящем документе ВВ (например, экзосомы) могут дополнительно содержать нацеливающий фрагмент (в дополнение к полезной нагрузке). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, описанный выше, может быть объединен с функциональным фрагментом, таким как низкомолекулярное вещество (например, STING, ASC), лекарственное средство и/или терапевтический белок (например, антитела к CD3/анти-CD19, антитело к мезотелину/проапоптотические белки).

[103] Используемый в данном документе термин «**биологически активная молекула**» относится к агенту, который обладает активностью в биологической системе (например, клетке или человеке), включая, но не ограничиваясь ими, белок, полипептид или пептид, включая, но не ограничиваясь, структурный белок, фермент, цитокин (такой как интерферон и/или интерлейкин), антибиотик, поликлональное или моноклональное антитело или его эффективная часть, такая как Fv-фрагмент, причем антитело или его часть могут быть природными, синтетическими или гуманизированными, пептидный гормон, рецептор, сигнальная молекула или другой белок; нуклеиновая кислота, как определено ниже, включая, помимо прочего, олигонуклеотид или модифицированный олигонуклеотид, антисмысловый олигонуклеотид или модифицированный антисмысловый олигонуклеотид, кДНК, геномную ДНК, искусственную или естественную хромосому (например, искусственную хромосому дрожжей) или ее часть, РНК, включая мРНК, тРНК, рРНК или рибозим, или пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК); вирус или вирусоподобные частицы; нуклеотид или рибонуклеотид, или его синтетический аналог, который может быть модифицирован или не модифицирован; аминокислота или ее аналог, который может быть модифицирован или немодифицирован; непептидный (например, стероидный) гормон; протеогликан; липид; или углевод. В некоторых аспектах антисмысловые олигонуклеотиды включают фосфородиамидат-морфолино-олигомер (ФМО) или пептид-конъюгированный фосфородиамидат-морфолино-олигомер (ФФМО). В некоторых аспектах биологически активный фрагмент включает терапевтическую молекулу (например, антиген), нацеливающий фрагмент (например, антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент), адъювант, иммуномодулятор или любую их комбинацию. В некоторых аспектах биологически активный фрагмент содержит макромолекулу (*например*, белок, антитело, фермент, пептид, ДНК, РНК или любую их комбинацию). В некоторых аспектах биологически активный фрагмент содержит низкомолекулярное вещество (*например*, антисмысловый олигомер (АСО), миРНК, STING, фармацевтическое лекарственное средство или любую их комбинацию). В некоторых аспектах биологически активные фрагменты являются экзогенными по отношению к экзосоме, *т.е.* не обнаруживаются в экзосоме в природе.

[104] Используемый в данном документе термин «**терапевтическая молекула**» относится к любой молекуле, которая может лечить и/или предотвращать заболевание или расстройство у субъекта (*например*, человека). В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит антиген. Используемый в данном документе термин «**антиген**» относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает иммунный ответ (клеточный или гуморальный).

[105] Используемый в данном документе термин «**антитело**» охватывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью синтетически полученный, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, гомологичный связывающему домену иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывает и распознает антиген. Использование термина «антитело» включает целые антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и, кроме того, включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, антитела мыши-примата, антитела примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например*, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, фрагменты Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает биспецифические антитела и мультиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, scFab, scFab-Fc, нанотело или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антитело-агонист, блокирующее антитело, нацеливающее антитело, его фрагмент или их комбинацию. В некоторых аспектах антитело-агонист представляет собой агонист CD40L. В некоторых аспектах блокирующее антитело связывает целевой белок, выбранный из белка запрограммированной смерти 1 (PD-1), лиганда белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), белка 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами, и любой их комбинации. В некоторых аспектах нацеливающее антитело связывается с CD3 и/или CD19.

[106] Термины «**индивидуум**», «**субъект**», «**хозяин**» и «**пациент**» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему,

для которого требуется диагностика, лечение или терапия, в особенности людям. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, применимы как для терапии человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых аспектах субъект представляет собой млекопитающее, а в других аспектах субъект представляет собой человека. Используемый в данном документе термин «субъект-млекопитающее» включает всех млекопитающих, в том числе 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.).

[107] Используемый в данном документе термин «**по существу свободный**» означает, что образец, содержащий ВВ, *например*, экзосомы, содержит менее 10% макромолекул 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.

[108] Используемый в данном документе термин «**макромолекула**» означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

[109] Используемый в настоящем документе термин «**обычный белок экзосомы**» означает белок, который, как ранее было известно, обогащенный в экзосомах, включая, помимо прочего, CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин LAMP2 и LAMP2B, их фрагменты, или пептид, который связывается с ними.

[110] «**Введение**», как используется в настоящем документе, означает введение композиции, содержащей ВВ, *например*, экзосому, раскрытую в настоящем документе, субъекту фармацевтически приемлемым путем. Пути введения могут быть внутривенными, *например*, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия. Дополнительные пути введения включают, *например*, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. ВВ, *например*, экзосомы, можно вводить как часть фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один эксципиент.

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

патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, *например*, активацию или ингибирование Т-клетки, *например*, эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4⁺-клетки, CD8⁺-Т-клетки или Treg-клетки, или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, *например*, NK-клетки. Соответственно, иммунный ответ может включать гуморальный иммунный ответ (*например*, опосредованный В-клетками), клеточный иммунный ответ (*например*, опосредованный Т-клетками) или как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. В некоторых аспектах иммунный ответ представляет собой «ингибирующий» иммунный ответ. Ингибирующий иммунный ответ - это иммунный ответ, который блокирует или ослабляет 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).

[112] Термины «лечить», «лечение» или «осуществление лечения» в контексте данного документа относится, *например*, к снижению тяжести заболевания или состояния; сокращению продолжительности течения болезни; нормализации или устранению одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием; обеспечению благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или состоянием без обязательного излечения заболевания или состояния. 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.

[113] Термины «предотвращать» или «предотвращение» в контексте данного описания относятся к уменьшению или снижению частоты возникновения или серьезности конкретного исхода. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения.

Фармацевтические композиции

[114] В настоящем документе предложены композиции для хранения и введения внеклеточных везикул, *например*, экзосом. Как отмечалось выше, композиции по настоящему изобретению обеспечивают множество преимуществ, включая, помимо прочего: снижение агрегации ВВ и улучшенную стабильность ВВ, улучшенную целостность структуры ВВ, улучшенную стабильность сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ, и улучшенную стабильность пассивно загруженных или конъюгированных материалов, таких как низкомолекулярные лекарственные вещества или белки. Описанные в данном документе композиции можно замораживать, хранить при различных температурах в течение различных промежутков времени и размораживать

без ущерба для стабильности ВВ, содержащихся в композиции.

[115] Различные компоненты и соображения, касающиеся составления композиций по настоящему изобретению, изложены ниже.

И.А. Композиции ВВ

[116] В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу, при этом фармацевтическая композиция стабильна при замораживании и/или хранении и/или пригодна для введения млекопитающему, *например*, человеку. Нестабильность биологического препарата при хранении может быть вызвана агрегацией, дезаминированием, изомеризацией, гидролизом, окислением и/или денатурацией. Эти структурные модификации могут происходить из-за различных факторов: свойств биологического препарата и/или других факторов, включая температуру, рН и ионную силу биологических препаратов и элементов, входящих в состав биологического препарата.

[117] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция по настоящему изобретению составлена стабильной, так что композиция не требует хелатирующего агента и/или альбумина, *например*, рекомбинантного альбумина человека.

[118] Человеческий альбумин является наиболее распространенным белком в крови и присутствует в количестве около 40 г/л. Его роль в крови заключается в перемещении множества более мелких объектов, таких как металлы, гормоны, жирные кислоты и токсины. Однако он также составляет около 75% коллоидного онкотического (или коллоидно-осмотического) давления крови, а единственный свободный цистеин альбумина (в положении 34) составляет большую часть восстанавливающих эквивалентов, присутствующих в крови. Все эти свойства являются функциональными признаками при использовании альбумина в составе.

[119] Альбумин исторически использовался в различных составах. Первоначально использовался человеческий сывороточный альбумин, полученный из плазмы, но в отрасли произошел сдвиг в сторону использования химически определенного (рекомбинантного) сывороточного альбумина человека. Рекомбинантные продукты имеют преимущества благодаря таким факторам, как: отсутствие продуктов животного происхождения, надежность поставок, высокая чистота, отсутствие протеаз хозяина, высокая гомогенность, высокое содержание свободных тиолов, отсутствие известных или неизвестных патогенов человека, согласованность между партиями и наличие установленного регуляторного пути.

[120] Сообщалось, что альбумин в составе предотвращает поверхностную адсорбцию, агрегацию, фибрилляцию и окисление, а также улучшает растворимость, образование лиофилизированного осадка и/или свойства растворения АФИ из лиофилизированного осадка. Несмотря на эти известные преимущества, настоящее изобретение обеспечивает стабильную фармацевтическую композицию, не содержащую альбумина, содержащую внеклеточную везикулу.

[121] Хелатирующие агенты - это ингредиенты, которые связываются с ионами

металлов и играют решающую роль в стабильности и эффективности фармацевтических составов. Процесс хелатирования стабилизирует ионы металлов, предотвращая их химическую реакцию с любыми другими веществами. Настоящую композицию можно охарактеризовать тем, что она не содержит хелатирующего агента.

[122] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе композиции имеют рI в диапазоне от около 1 до около 6,5. Диапазон рI раскрытых в настоящее время ВВ, где сверхэкспрессируется поверхностная макромолекула, например, PTGFRN, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивает коллоидно-стабильные анионные экзосомы при физиологических значениях рН. В некоторых аспектах поверхностная молекула может представлять собой полипептид, олигонуклеотид или углевод. В некоторых аспектах рI выше 6,5 может привести к тому, что ВВ, например, экзосомы, будут иметь либо нейтральный заряд (нестабильный), либо катионный заряд в пригодных диапазонах рН, что может привести к токсичности или ограниченному биораспределению.

[123] В некоторых аспектах композиции по настоящему изобретению приготовлены в жидком состоянии и могут быть заморожены для хранения путем снижения температуры композиций до температуры замерзания и температуры ниже точки замерзания. Замораживание композиций путем дегидратации или лиофилизации не предполагается. В некоторых аспектах композиция не является лиофилизированной.

II.B. Композиция I (рН)

[124] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает рН, при котором можно стабильно получать ВВ. рН может находиться в диапазоне от около 7,0 до около 7,4, *например*, от около 7,1 до около 7,3, *например*, около 7,2. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит (а) внеклеточную везикулу; (b) сахарид; (с) хлорид натрия; (d) фосфат калия; и (е) фосфат натрия. В некоторых аспектах композиция находится в растворе при рН около 7,2. ВВ описанные в данном документе в другом месте, сахарид может представлять собой моносахарид, дисахарид, трисахарид или любые другие сахариды; хлорид натрия показан ниже; а фосфаты калия и натрия показаны ниже.

[125] В некоторых аспектах композиция до замораживания и после замораживания остается такой же. Например, композиция до замораживания и после замораживания имеет рН около 7,1. В некоторых аспектах композиция до замораживания и после замораживания имеет рН около 7,2. В некоторых аспектах композиция до замораживания и после замораживания имеет рН около 7,3. В некоторых аспектах композиция до замораживания и после замораживания имеет рН около 7,4.

[126] В некоторых аспектах рН композиции можно регулировать путем изменения концентрации фосфатов. В некоторых аспектах рН композиции можно регулировать путем изменения концентрации фосфата калия. В некоторых аспектах рН композиции может быть увеличен путем добавления или повышения концентрации фосфата калия. В некоторых аспектах концентрация фосфата калия выше, чем концентрация фосфата натрия.

[127] В некоторых аспектах соотношение одноосновной и двухосновной форм фосфата натрия и фосфата калия можно использовать для регулирования рН фармацевтической композиции. В некоторых аспектах одноосновный фосфат натрия и/или одноосновный фосфат калия можно использовать для повышения рН фармацевтической композиции. В некоторых аспектах двухосновный фосфат натрия и/или двухосновный фосфат калия можно использовать для снижения рН фармацевтической композиции. В некоторых аспектах диапазоны рН для описанных композиций составляют от около 6,8 до около 7,6. Следовательно, если рН композиции ниже желаемого, рН можно изменить, изменив соотношение одноосновной и двухосновной формы соли (т.е. калия или натрия). В некоторых аспектах соотношение одноосновной и двухосновной форм фосфата натрия и фосфата калия можно использовать для регулирования рН композиции до тех пор, пока рН композиции не будет находиться в диапазоне от 7,0 до 7,4, *например*, от 7,1 до 7,3, *например*, 7,2. В некоторых аспектах верхний предел рН обусловлен разрушением липидов описанных ВВ, например, экзосом, которые подвергаются гидролизу, более известному как омыление. В некоторых аспектах соли калия стабилизируют рН при замораживании.

[128] В некоторых аспектах сахарид для фармацевтической композиции при рН около 7,2 содержит моносахарид. В некоторых аспектах сахарид содержит дисахарид. В некоторых аспектах сахарид содержит трисахарид. В некоторых аспектах сахарид содержит олигосахарид. В некоторых аспектах сахарид содержит полисахарид. В некоторых аспектах сахарид содержит сахарный спирт. В некоторых аспектах сахарид содержит любую комбинацию сахаридов, описанных в настоящем документе.

[129] В некоторых аспектах сахарид содержит лактозу. В некоторых аспектах сахарид содержит глюкозу. В некоторых аспектах сахарид содержит сахарозу. В некоторых аспектах сахарид содержит трегалозу. В некоторых аспектах сахарид содержит декстрозу. В некоторых аспектах сахарид содержит любую комбинацию сахаридов, описанных в настоящем документе.

[130] В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарный спирт. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарный спирт с молекулярной массой от около 90,00 г/моль до около 190,00 г/моль. В некоторых аспектах сахарид имеет молекулярную массу от около 180,00 г/моль до около 380,00 г/моль.

[131] В некоторых аспектах сахарный спирт содержит глицерин. В некоторых аспектах сахарный спирт содержит сорбит. В некоторых аспектах сахарный спирт содержит маннит. В некоторых аспектах сахарный спирт содержит ксилит. В некоторых аспектах сахарный спирт включает любую комбинацию сахарных спиртов, описанных в настоящем документе.

[132] В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарозу или трегалозу. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит сахарозу. В других аспектах фармацевтическая композиция содержит трегалозу. В некоторых аспектах концентрация сахарозы составляет около 5% мас./об.

И.С. Композиция II (сахароза)

[133] Настоящее изобретение также относится к подходящей концентрации сахарозы или трегалозы в фармацевтической композиции, содержащей внеклеточную везикулу. Подходящее количество сахарозы или трегалозы в композиции стабилизирует композицию и/или уменьшает любые агрегаты. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит (i) внеклеточную везикулу и (ii) сахарид, который представляет собой сахарозу или трегалозу в концентрации около 5% мас./об.

[134] Сахарид, описанный в настоящем документе, *например*, сахароза или трегалоза, в концентрации 5% мас./об. может обеспечить превосходную стабильность композиции, содержащей 1% мас./об. сахарозы. В частности, фармацевтические композиции, содержащие (i) внеклеточную везикулу, *например*, экзосому, и (ii) сахарид, который представляет собой сахарозу или трегалозу в концентрации около 5% мас./об., обеспечивают преимущества, включая, помимо прочего, : (i) снижение агрегации ВВ, (ii) улучшенную стабильность ВВ, (iii) улучшенную целостность структуры ВВ, (iv) улучшенную стабильность сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ, и (v) улучшенную стабильность пассивно загруженных или конъюгированных материалов, таких как низкомолекулярные лекарственные вещества или белки. В некоторых аспектах композиция имеет пониженную агрегацию по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об., *например*, 1%. В некоторых аспектах композиция обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об., *например*, 1%. В некоторых аспектах композиция обладает улучшенной целостностью структуры ВВ по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об., *например*, 1%.

[135] В некоторых аспектах композиция обладает улучшенной стабильностью сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ, по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об., *например*, 1%.

[136] В некоторых аспектах композиция обладает улучшенной стабильностью пассивно загруженных или конъюгированных материалов, таких как низкомолекулярные лекарственные средства или белки, по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об. *например*, 1%.

[137] В других аспектах композиция обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации выше 5,5% масс./об., 6% масс./об., 7% масс./об., 8% масс./об., 9% мас./об. или 10% мас./об.

[138] Композиция может дополнительно содержать хлорид натрия, фосфат калия, хлорид натрия или любую их комбинацию, описанную в данном документе в другом месте.

мере около 2,3 мг/мл или от по меньшей мере около 0,5 мг/мл до по меньшей мере около 2,1 мг/мл.

[145] В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 3,0 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,92 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,9 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,8 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,7 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,6 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,5 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,4 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,34 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,3 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,2 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,1 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация хлорида натрия составляет по меньшей мере около 2,0 мг/мл.

[146] В некоторых аспектах композиция II дополнительно содержит фосфатный буфер, содержащий фосфатное соединение. Неограничивающие примеры фосфатных соединений включают фосфат калия, фосфат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, дикалийфосфат и/или их комбинацию. В некоторых аспектах фосфатное соединение представляет собой фосфат калия. В других аспектах фосфатное соединение представляет собой фосфат натрия.

II.E. Фосфаты

[147] В некоторых аспектах композиция I или композиция II дополнительно содержит фосфат калия, *например*, одноосновный фосфат калия. В некоторых аспектах фосфат калия, *например*, одноосновный фосфат калия, присутствует в композиции в концентрации от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 20 мМ, от около 3 мМ до около 20 мМ, от около 4 мМ до около 20 мМ, от около 5 мМ до около 20 мМ, от около 6 мМ до около 20 мМ, от около 7 мМ до около 20 мМ, от около 8 мМ до около 20 мМ, от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до от около 19 мМ, от около 3 мМ до около 18 мМ, от около 4 мМ до около 17 мМ, от около 5 мМ до около 16 мМ или от около 5 мМ до около 15 мМ.

[148] В некоторых аспектах концентрация фосфата калия, *например*, одноосновного фосфата калия, составляет около 4,5 мМ, около 4,6 мМ, около 4,7 мМ, около 4,8 мМ, около 4,9 мМ, около 5,0 мМ, около 5,1 мМ, около 5,2 мМ, около 5,3 мМ, около 5,4 мМ или около 5,5 мМ. В некоторых аспектах фосфат калия присутствует в композиции в концентрации от около 2 мМ до около 19 мМ. В некоторых аспектах фосфат калия присутствует в композиции в концентрации от около 3 мМ до около 18 мМ. В некоторых аспектах фосфат калия присутствует в композиции в концентрации от около

натрия в соотношении около 1: около 5. В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 3. В некоторых аспектах фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 2.

[160] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) внеклеточную везикулу, (ii) фосфат калия и (iii) фосфат натрия в растворе, причем молярное соотношение фосфата калия и фосфата натрия составляет от около 1 до около 3 или от около 1 до около 2.

II.F. Сахариды

[161] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей внеклеточную везикулу, сахарид, хлорид натрия, фосфат калия и фосфат натрия. Как отмечено выше, сахарид может представлять собой моносахарид, дисахарид, трисахарид или любые другие сахариды. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарозу. В некоторых аспектах сахарид представляет собой трегалозу.

[162] В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%, по меньшей мере от около 2% до по меньшей мере около 9%, по меньшей мере от около 3% до по меньшей мере около 8%, от по меньшей мере около 4% до по меньшей мере около 7%, от по меньшей мере около 4% до по меньшей мере около 6%, от по меньшей мере около 3% до по меньшей мере около 7%, от по меньшей мере около 5% до по меньшей мере около 10%, от по меньшей мере около 5% до по меньшей мере около 9%, от по меньшей мере около 5% до по меньшей мере около 8% или от по меньшей мере около 5% до по меньшей мере около 7%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 1%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 2%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 3%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 4%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 5%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 6%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 7%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере до по меньшей мере около 8%. В некоторых аспектах сахарид, *например*, сахароза или трегалоза, присутствует в

аналогичной композицией, содержащей менее чем около 2% сахарозы.

II.G. Проводимость

[169] В некоторых аспектах композиция I или композиция II по настоящему изобретению имеет проводимость от около 6 мСм/см +/- 10% до около 10 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет от 6 мСм/см +/- 10% до около 7 мСм/см +/- 10%, от около 7 мСм/см +/- 10% до около 8 мСм/см +/- 10%, от около 8 мСм/см +/- 10% до около 9 мСм/см +/- 10% или от около 9 мСм/см +/- 10% и до около 10 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 6 мСм/см +/- 10%, около 7 мСм/см +/- 10%, около 8 мСм/см +/- 10%, около 9 мСм/см +/- 10% или около 10 мСм/см +/- 10%.

[170] В некоторых аспектах композиция имеет проводимость от около 6 мСм/см +/- 10% до около 10 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 6 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 7 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 8 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 9 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет около 10 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет 7,23 мСм/см +/- 10%. В некоторых аспектах проводимость составляет 8,8 мСм/см +/- 10%.

II.H. Антиоксиданты

[171] В некоторых аспектах композиция I или композиция II по настоящему изобретению дополнительно содержит антиоксидант. В некоторых аспектах антиоксидант содержит D-метионин, L-метионин, аскорбиновую кислоту, эриторбиновую кислоту, аскорбат натрия, тиоглицерин, цистеин, ацетилцистеин, цистин, дитиоэритреитол, глутатион, токоферолы, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), бисульфат натрия, дитионит натрия, А-токоферол, γ-токоферол, пропил галлат, аскорбилпальмитат, метабисульфит натрия, тиомочевину, тиосульфат натрия, пропилгаллат, витамин С, N-ацетилцистеин, селен и тиогликолят натрия. В некоторых аспектах антиоксидантом является метионин. В других аспектах антиоксидант представляет собой D-метионин. В других аспектах антиоксидант представляет собой L-метионин.

[172] В некоторых аспектах композиции I или II антиоксидант содержит тиосульфат или его соль. В некоторых аспектах тиосульфат или его соль содержат тиосульфат натрия.

[173] В некоторых аспектах композиция, описанная в настоящем документе, содержит антивосстановитель. В некоторых аспектах антивосстановитель содержит ЭДТА, ЭГТА, CuSO_4 , S-аденозилметионин, цистеин или любую их комбинацию.

II.I. Ингибиторы протеазы

[174] В некоторых аспектах композиция, описанная в настоящем документе, содержит ингибитор протеазы. Белки, такие как тиоредоксин, могут восстанавливать белки с дисульфидными связями. Добавление ингибиторов, таких как ЭДТА, ЭГТА и

CuSO₄, может снизить активность, особенно металлопротеаз, таких как гексокиназа. ЭГТА/ЭДТА ингибирует хелатирование двухвалентных катионов. Соответственно, в некоторых аспектах композиция дополнительно содержит ингибитор протеазы, выбранный из ЭДТА, ЭГТА, CuSO₄ и любой их комбинации. В некоторых аспектах температуру снижают для снижения активности протеазы.

II.J. Характеристики композиций

[175] Композиции по настоящему изобретению были составлены таким образом, чтобы ВВ композиций были стабильными в условиях колебаний температуры, *например*, при замораживании и/или размораживании и/или введении субъекту. Тем не менее, не желая ограничиваться рамками, следует отметить, что комбинация описанных в настоящем документе сахаридов, *например*, сахарозы в концентрации около 5% мас./об., с фосфатом калия и фосфатом натрия в определенных соотношениях, описанных в настоящем документе, обеспечивает превосходную стабильность композиции и содержащихся в ней ВВ. Например, в некоторых аспектах композиции по настоящему изобретению можно хранить в течение различных промежутков времени и при различных температурах, при этом стабильность внеклеточной везикулы, *например*, экзосомы, не снижается. Кроме того, в некоторых аспектах раскрытые в настоящем документе композиции могут быть приготовлены в виде жидкости при температуре окружающей среды, а затем заморожены путем помещения композиций в морозильную камеру при температуре -80°C, а затем разморожены. Соответственно, в некоторых аспектах композицию можно хранить в виде жидкости до замораживания, композицию можно хранить в виде твердого вещества во время замораживания и композицию можно хранить в виде жидкости после размораживания без ущерба для стабильности ВВ, как описано ниже.

[176] В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости перед замораживанием. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости перед замораживанием при температуре от около 25°C до около 1°C, при этом стабильность ВВ, *например*, экзосомы, не снижается. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости до замораживания при температуре от около 25°C до около 1°C без ущерба для стабильности ВВ, *например*, экзосомы.

[177] В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости перед замораживанием в течение по меньшей мере около 4 часов, по меньшей мере около 10 часов, по меньшей мере около 12 часов, по меньшей мере около 15 часов, по меньшей мере около 20 часов, по меньшей мере около 24 часа. В некоторых аспектах композиция хранится в виде жидкости перед замораживанием в течение от около 4 часов до около 12 часов, от около 5 часов до около 12 часов, от около 6 часов до около 12 часов, от около 4 часов до около 24 часов, от около 6 часов до около 24 часов, от около 12 часов до около 24 часов или от около 4 часов до около 16 часов. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости до замораживания менее 36 часов, менее 30 дней, менее 24 часов, менее 23 часов, менее 22 часов, менее 21 часа, менее 20 часов, менее 19 часов,

менее 18 часов, менее 17 часов, менее 16 часов, менее 15 часов, менее 14 часов, менее 13 часов, менее 12 часов, менее 11 часов, менее 10 часов, менее 9 часов, менее 8 часов, менее 7 часов, менее 6 часов, менее 5 часов или менее 4 часов.

[178] В некоторых аспектах композиция может храниться в виде жидкости при температуре около 4°C перед замораживанием в течение около одной недели. В некоторых аспектах композиция может быть стабильной до недели при 4°C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде жидкости при температуре около 4°C перед замораживанием в течение около одной недели, а затем вводить нуждающемуся в этом субъекту.

[179] В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде замороженного твердого вещества в течение длительного времени перед размораживанием. В некоторых аспектах композицию можно хранить в твердом виде при нулевых и отрицательных температурах, *например*, при температурах от около 0°C до -80°C, при этом стабильность ВВ, *например*, экзосомы, не снижается. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде замороженного твердого вещества при температуре от примерно 0°C до -80°C. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде замороженного твердого вещества при температуре от около 0°C до -50°C. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде замороженного твердого вещества при температуре от примерно 0°C до -20°C. В некоторых аспектах композиция может храниться в виде замороженного твердого вещества при температуре от примерно 0°C до -15°C. В некоторых аспектах композиция может храниться до 6 месяцев при -80°C. В некоторых аспектах композиция может быть стабильной в течение одного года при -80°C. В некоторых аспектах композиция может быть стабильной в течение двух лет при -80°C.

[180] Описанные в настоящем документе композиции можно хранить в виде замороженных твердых веществ в течение различных периодов времени, а затем размораживать для подготовки к введению нуждающимся в этом субъектам. В некоторых аспектах размороженные жидкости могут храниться в течение различной продолжительности и при различных температурах до введения без ущерба для стабильности ВВ, *например*, экзосом. В некоторых аспектах композицию можно размораживать и хранить в виде жидкости при температуре от около 1°C до около 25 °C, при этом стабильность ВВ, *например*, экзосомы, не снижается.

[181] В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 1 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 2 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 3 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 4 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 5 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 6 °C. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре

около 7 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 8 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 9 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 10 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 11 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 12 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 13 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 14 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 15 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 16 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 17 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 18 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 19 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 20 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 21 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 22 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 23 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 24 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при температуре около 25 °С. В некоторых аспектах композицию можно хранить в виде размороженной жидкости при 4°С в течение около одной недели. В некоторых аспектах композиция может быть стабильной в виде размороженной жидкости до недели при 4°С.

[182] В некоторых аспектах композицию можно хранить, а затем непосредственно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах композицию можно хранить до 24 часов при 25°С, а затем непосредственно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах композицию можно хранить до 3 дней при 4°С, а затем непосредственно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах композицию можно хранить до 7 дней при 4°С, а затем непосредственно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах композицию можно хранить до 6 месяцев при -80°С, размораживать и затем непосредственно вводить нуждающемуся в этом субъекту.

II.K. Примеры композиций

[183] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например,*

5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 40 мМ до около 60 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 4 мМ до около 6 мМ; и

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 10 мМ до около 20 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах проводимость композиции составляет около 7,2 +/- 10%. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[184] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации около 5% масс./об.,

Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 15 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах проводимость композиции составляет около 7,2 +/- 10%. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[185] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 10 мМ до около 20 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 20 мМ до около 40 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах проводимость композиции составляет около 8,8 +/- 10%. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[186] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации около 5% масс./об.,

Хлорид натрия в концентрации около 40 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах проводимость композиции составляет около 8,8 +/- 10%. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[187] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 1 мМ до около 20 мМ;
 гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 20 мМ до около 40 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[188] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации около 5% масс./об.,

Хлорид натрия в концентрации около 40 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации около 11 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 32 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[189] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 60 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 1 мМ до около 20 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 10 мМ до около 40 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

[190] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 40 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 15 мМ;

гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ, при этом рН композиции составляет около 7,2. В некоторых аспектах композиция находится в растворе, *например*, в форме жидкого состава.

II.K.1. Примерная композиция 02

[191] В некоторых аспектах композиция по настоящему изобретению содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[192] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации около 5% мас./об.,

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[193] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации около 40 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[194] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от около 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[195] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 30 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[196] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ, при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[197] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет от около 7,0 до около 7,4.

[198] В некоторых аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., *например*, 5% масс./об.;

Хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,

при этом рН композиции составляет около 7,2.

[199] В определенных аспектах композиция содержит:

Внеклеточные везикулы;

Сахарозу в концентрации около 5% мас./об.,

Хлорид натрия в концентрации около 40 мМ;

Одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ;

Гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ,

при этом рН композиции составляет около 7,2.

[200] В некоторых аспектах внеклеточные везикулы содержат агонист STING. В некоторых аспектах агонист STING содержит циклический динуклеотидный (ЦДН) агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING. В некоторых аспектах агонист STING содержит цГМФ, циклический ди-ГМФ (ц-ди-ГМФ), цАМФ, циклический ди-АМФ (ц-ди-АМФ), циклический-ГМФ-АМФ (цГАМФ), циклический ди-ИМФ (ц-ди-ИМФ), циклический АМФ-ИМФ(цАИМФ) и любой его аналог, как известно, стимулируют или усиливают иммунный или воспалительный ответ у пациента. В некоторых аспектах ЦДН содержит связи 2'2', 2'3', 2'5', 3'3' или 3'5' связи, соединяющие циклические динуклеотиды, или любую их комбинацию.

[201] В некоторых аспектах композиция является лиофилизированной.

П.К.1. Примерная композиция 03.

[202] В определенных аспектах композиция содержит:

(а) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[203] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[204] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[205] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[206] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы;
- (b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[207] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы;
- (b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[208] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы;
- (b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[209] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы;
- (b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[210] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[211] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[212] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[213] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

[214] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[215] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[216] В некоторых аспектах внеклеточная везикула содержит фрагмент IL-12. В некоторых аспектах фрагмент IL-12 описан в настоящем документе. В некоторых аспектах фрагмент IL-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, 12 или 13 (таблица 1A). В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[217] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие фрагмент IL-12, при этом фрагмент IL-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, 12 или 13;

(b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;

- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[218] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие фрагмент IL-12, при этом фрагмент IL-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, 12 или 13;

- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[219] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие фрагмент IL-12, при этом фрагмент IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13;

- (b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[220] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие фрагмент IL-12, при этом фрагмент IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13;

- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[221] В некоторых аспектах внеклеточная везикула содержит АСО. В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6 (SEQ ID NO: 23; таблица 1B). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193. В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO: 144). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO: 145).

В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCCCTTGACTTTTGCATAG(SEQ ID NO: 193). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCAAGATCCC GGATTCGGTC (SEQ ID NO: 185).

[222] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;

(b) Сахарозу;

(c) Хлорид натрия;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2;

при этом концентрация сахарозы выбрана из около 73 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ; и

концентрация хлорида натрия выбрана из около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ.

[223] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО;

(b) Сахарозу;

(c) Хлорид натрия;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2;

при этом концентрация сахарозы выбрана из около 73 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ; и

концентрация хлорида натрия выбрана из около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ. В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193.

[224] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО;
- (b) Сахарозу;
- (c) Хлорид натрия;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ;
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2;

при этом концентрация сахарозы выбрана из около 2,5%, около 2,6%, около 2,7%, около 2,8%, около 2,9%, около 3,0%, около 3,1%, около 3,2%, около 3,3%, около 3,4%, около 3,5%, около 3,6%, около 3,7%, около 3,8%, около 3,9%, около 4,0%, около 4,1%, около 4,2%, около 4,3%, около 4,4%, около 4,5%, около 4,6%, около 4,7% , около 4,8%, около 4,9% и около 5,0%; и

концентрация хлорида натрия выбрана из около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ. В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193.

[225] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;
- (b) Сахарозу в концентрации от около 73 мМ до около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ;
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[226] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;
- (b) Сахарозу в концентрации от около 2,5% до около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ;
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[227] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) Сахарозу в концентрации от около 73 мМ до около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;

- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[228] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) Сахарозу в концентрации от около 2,5% до около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[229] В определенных аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;
- (b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[230] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;
- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[231] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;
- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 100 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[232] В некоторых аспектах композиция содержит:

- (a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит

непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;

- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 150 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[233] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, при этом АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6;

- (b) Сахарозу в концентрации около 2,5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[234] В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-93.

[235] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

- (b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[236] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[237] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

- (b) Сахарозу в концентрации около 4,5%;
- (c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[238] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

(b) Сахарозу в концентрации около 4%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[239] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

(b) Сахарозу в концентрации около 3,5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[240] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

(b) Сахарозу в концентрации около 3%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[241] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

(b) Сахарозу в концентрации около 2,5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[242] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO: 144);

(b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[243] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO: 144);

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[244] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO: 145);

(b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[245] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO: 145);

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[246] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCCCTTGTACTTTTGCATAG (SEQ ID NO: 193);

(b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;

(c) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[247] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCCCTTGTACTTTTGCATAG (SEQ ID NO: 193);

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

- (с) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (е) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[248] В определенных аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCAAGATCCC GGATTCGGTC (SEQ ID NO: 185);

- (b) Сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (с) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (е) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[249] В некоторых аспектах композиция содержит:

(a) Внеклеточные везикулы, содержащие АСО, где АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCAAGATCCC GGATTCGGTC (SEQ ID NO: 185);

- (b) Сахарозу в концентрации около 5%;
- (с) Хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) Одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (е) Двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

[250] В некоторых аспектах композиция является лиофилизированной.

Внеклеточные везикулы, например, экзосомы

[251] В настоящем документе описаны модифицированные ВВ, *например*, экзосомы, способные регулировать иммунную систему субъекта. ВВ, *например*, экзосомы, применимые в настоящем изобретении, были сконструированы таким образом, чтобы продуцировать по меньшей мере один экзогенный биологически активный фрагмент. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит два экзогенных биологически активных фрагмента. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит три экзогенных биологически активных фрагмента. В других аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит четыре экзогенных биологически активных фрагмента. В других аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит пять или более экзогенных биологически активных фрагментов. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более экзогенных биологически активных фрагментов.

[252] Как описано *выше*, ВВ, *например*, экзосомы, описанные в настоящем документе, представляют собой внеклеточные везикулы диаметром примерно от 20 до 300 нм. В некоторых аспектах ВВ, *например* экзосома, по настоящему изобретению имеет диаметр в пределах 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, описанными *ниже*.

[253] В некоторых аспектах ВВ, *например* экзосома, по настоящему изобретению содержит билипидную мембрану («мембрану ВВ, *например*, экзосомы»), имеющую внутреннюю поверхность и внешнюю поверхность. В некоторых аспектах внутренняя поверхность обращена к внутреннему ядру (*то есть* просвету) ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах внешняя поверхность может находиться в контакте с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или клетки-мишени.

[254] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стеролы, холестерин и фосфатидилсерин.

[255] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, содержит внутреннюю мембрану и внешнюю мембрану. Состав внутренней и внешней мембран

можно определить с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники, *см., например*, Kuipers et al., Biochim Biophys Acta 1985 819:170. В некоторых аспектах состав внешней мембраны составляет приблизительно 70-90% холинфосфолипидов, приблизительно 0-15% кислых фосфолипидов и приблизительно 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутренней мембраны составляет приблизительно 15-40% холинфосфолипидов, приблизительно 10-50% кислых фосфолипидов и приблизительно 30-60% фосфатидилэтаноламина.

[256] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, содержит один или более полисахаридов, таких как гликан.

[257] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы, дополнительно содержит один или более каркасных фрагментов, которые способны закреплять множество экзогенных биологически активных фрагментов на ВВ, *например* экзосоме, (*например*, либо на поверхности просвета, либо на внешней поверхности). В некоторых аспектах каркасные фрагменты закрепляют или связывают по меньшей мере один из множества экзогенных биологически активных фрагментов с ВВ. В некоторых аспектах каркасные фрагменты закрепляют или связывают каждую из множества (*например*, по меньшей мере двух) экзогенных биологически активных фрагментов с ВВ. В некоторых аспектах каркасные фрагменты представляют собой полипептиды («белки экзосомы»). В других аспектах каркасные фрагменты представляют собой неполипептидные фрагменты. В некоторых аспектах белки экзосомы включают различные мембранные белки, такие как трансмембранные белки, цельные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах экзосом. Они могут включать различные белки CD, транспортеры, интегрины, лектины и кадгеринины. В некоторых аспектах каркасный фрагмент (*например*, белок экзосомы) содержит каркас X. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент (*например*, белок экзосомы) содержит более одного фрагмента каркаса X.

[258] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, описанная в настоящем документе, способна доставлять одну или более полезных нагрузок (*например*, биологически активный фрагмент) к мишени. Соответственно, в некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит одну, две, три, четыре, пять или более различных полезных нагрузок. Полезная нагрузка - это агент, воздействующий на цель (*например*, на целевую клетку), которая контактирует с ВВ. Контактное взаимодействие может происходить *in vitro* или в организме субъекта. Неограничивающие примеры полезных нагрузок, которые могут быть введены в ВВ, включают 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), РНК-связывающие белки, такие как MS2, аминокислоты (*например*, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, нарушающий трансляцию),

полипептиды (*например*, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (*например*, низкомолекулярные лекарственные вещества и токсины). В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит экзогенный биологически активный фрагмент (*например*, описанный в настоящем документе).

III.A. Полезная нагрузка, например биологически активный фрагмент

[259] В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит биологически активный фрагмент. В некоторых аспектах полезная нагрузка содержит терапевтическую молекулу. В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит антиген, способный индуцировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых аспектах антиген включает опухолевый антиген. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают: альфа-фетопротеин (АФП), карциноэмбриональный антиген (КЭА), антиген эпителиальной опухоли (АЭО), муцин 1 (MUC1), Tn-MUC1, муцин 16 (MUC16), тирозиназу, меланомоассоциированный антиген (MAGE), опухолевой белок p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD47, CD80, CD86, лиганд белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганд белка запрограммированной смерти 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, сMET, EGFR, мезотелин, VEGFR, рецептор альфа-фолиевой кислоты, CE7R, IL-3, раково-тестикулярный антиген (РТА), MART-1 gp100, ФНО-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд, Brachyury (преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME)), или их комбинации. В дополнительных аспектах антиген может включать неоантиген. Используемый в данном документе термин «неоантиген» относится к антигенам, кодируемым опухолеспецифическими мутантными генами. В некоторых аспектах антиген получают из бактерии, вируса, грибка, простейших или любой их комбинации. В некоторых аспектах антиген получают из онкогенного вируса. В дополнительных аспектах антиген получают из группы, включающей: вирус герпеса человека 4 (вирус Эпштейна-Барра), вирус гриппа А, вирус гриппа В, цитомегаловирус, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, ВИЧ-1, ВИЧ-2, короновирусы (*например*, MERS-CoV и SARS CoV), филовирусы (*например*, Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Plasmodia species* (*например*, *vivax* и *falciparum*), Chikungunya virus, вирус папилломы человека (ВПЧ), гепатит В, гепатит С, вирус герпеса человека 8, вирус простого герпеса 2 (HSV2), *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Actinobacter sp.*, коагулазонегативные стафилококки (CoNS), *Mycoplasma sp.* или их комбинации.

[260] В некоторых аспектах антиген получают от *Mycobacterium tuberculosis* для индукции клеточного и/или гуморального иммунного ответа. В некоторых аспектах антиген содержит один или более эпитопов *Mycobacterium tuberculosis* (антиген TB). Различные антигены связаны с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*, включая ESAT-6, TB10.4, CFP10, Rv2031 (hspX), Rv2654c (TB7.7) и Rv1038c (EsxJ). См., *например*, Lindestam et al., J. Immunol. 188(10):5020-31 (2012), который включен в настоящий документ во всей своей полноте.

[261] В некоторых аспектах антиген содержит аутоантиген. Используемый в данном документе термин «**аутоантиген**» относится к антигену, который экспрессируется клеткой или тканью-хозяином.

[262] В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах биологически активный фрагмент представляет собой антитело, нацеленное на белки клеточной поверхности. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, scFab, scFab-Fc, нанотело или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антитело-агонист, блокирующее антитело, нацеливающее антитело, его фрагмент или их комбинацию. В некоторых аспектах антитело-агонист представляет собой агонист CD40L. В некоторых аспектах блокирующее антитело связывает целевой белок, выбранный из белка запрограммированной смерти 1 (PD-1), лиганда белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1), белка 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами, и любой их комбинации. В некоторых аспектах нацеливающее антитело связывается с CD3 и/или CD19. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит антитело к IL12 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD40L или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит VITES, *например*, антитело к CD3, и противораковый агент, *например*, антитело к CD19.

[263] В некоторых аспектах терапевтическая молекула содержит фрагмент антитела *например*, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb, или Fd, нацеленные на антигены, включая CD33, ICAM4, CD40, CDLEC9A, DEC205 и TfR, и любую их комбинацию.

[264] В некоторых аспектах терапевтическая молекула представляет собой фактор свертывания крови, включая FVIII.

[265] В некоторых аспектах терапевтическая молекула представляет собой нацеливающий пептид, включая пептиды с цистеиновым узлом.

[266] В некоторых аспектах терапевтическая молекула представляет собой фермент, включающий нуклеазы Cas9 и цинковых пальцев, CD39, CD73 и глюкозилцерамидазу лизосомальной кислоты.

[267] В некоторых аспектах терапевтическая молекула представляет собой систему димеризации белка, включая FRB-FKBP.

[268] Как описано *выше*, ВВ, *например* экзосомы, по настоящему изобретению могут содержать адъювант. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), описанные в настоящем документе, содержат один, два, три, четыре, пять или более различных адъювантов. Используемый в данном документе термин «**адъювант**» относится к любому веществу, которое усиливает терапевтический эффект полезной нагрузки (*например*, усиливает иммунный ответ на антиген). Соответственно, ВВ, *например*, экзосомы,

описанные в настоящем документе, способны усиливать иммунный ответ на антиген по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 100% или более по сравнению с эталоном (*например*, соответствующей ВВ без адъюванта или средства доставки, отличного от ВВ, содержащего антиген и адъювант). Неограничивающие примеры адъювантов включают: агониста стимулятора генов интерферона (STING), агониста толл-подобного рецептора (TLR), медиатора воспаления и их комбинации.

[269] В некоторых аспектах адъювант индуцирует активацию цитозольного паттерн-распознающего рецептора. Неограничивающие примеры цитозольного паттерн-распознающего рецептора включают: стимулятор генов интерферона (STING), ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-1), белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), белок, содержащий нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, богатый лейцином повтор и пириновый домен (NLRP), инфламсомы или их комбинации. В некоторых аспектах адъювант представляет собой агонист STING. Стимулятор генов интерферона (STING) представляет собой цитозольный датчик циклических динуклеотидов, который обычно вырабатывается бактериями. После активации он приводит к выработке интерферонов типа I и запускает иммунный ответ. В конкретных аспектах агонист STING содержит циклический динуклеотидный агонист STING или нециклический динуклеотидный агонист STING.

[270] Циклические пуриновые динуклеотиды, такие как, помимо прочего, цГМФ, циклический ди-ГМФ (ц-ди-ГМФ), цАМФ, циклический ди-АМФ (ц-ди-АМФ), циклический-ГМФ-АМФ (цГАМФ), циклический ди-ИМФ (ц-ди-ИМФ), циклический АМФ-ИМФ(цАИМФ) и любой его аналог, как известно, стимулируют или усиливают иммунный или воспалительный ответ у пациента. ЦДН могут содержать связи 2'2', 2'3', 2'5', 3'3' или 3'5' связи, соединяющие циклические динуклеотиды, или любую их комбинацию.

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

[272] 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.

[273] Неограничивающие примеры агонистов STING, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают: DMXAA, агонист STING-1, ML RR-S2 ЦДН, ML RR-S2с-ди-ГМФ, ML-RR-S2 цГАМФ, 2'3'-ц-ди-АМ(PS)2, 2'3'-цГАМФ, 2'3'-сGAMPdFHS, 3'3'-цГАМФ, 3'3'-сGAIMPdFSH, цАИМФ, цАИМ(PS)2, 3'3'-цАИМФ, 3'3'-сAIMPdFSH, 2'2'-цГАМФ, 2'3'-цГАМ(PS)2, 3'3'-цГАМФ и их комбинации. Неограничивающие примеры агонистов STING можно найти в патенте США № 9695212, WO 2014/189805 A1, WO 2014/179335 A1, WO 2018/100558 A1, патенте США № 10011630 B2, WO 2017/027646 A1, WO 2017/161349 A1 и WO 2016/096174 A1, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

[274] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, содержит соединение или его фармацевтически приемлемую соль, раскрытые в WO 2016/096174, WO 2016/096174A1, WO 2014/093936, WO 2014/189805, WO 2015/077354, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также Cell reports 11, 1018-1030 (2015).

[275] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, содержит ц-ди-АМФ, ц-ди-ГМФ, ц-ди-ИМФ, ц-АМФ-ГМФ, ц-АМФ-ИМФ и ц-ГМФ-ИМФ, описанные в WO 2013/185052 и Sci. Transl. Med. 283,283ra52 (2015), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[276] В некоторых аспектах агонист STING, применимый по настоящему изобретению, содержит соединение или его фармацевтически приемлемую соль, раскрытые в WO 2014/189806, WO 2015/185565, WO 2014/179760, WO 2014/179335, WO 2015/017652, WO 2016/096577, WO 2016/120305, WO 2016/145102, WO 2017/027646, WO 2017/075477, WO 2017/027645, WO 2018/100558, WO 2017/175147 или WO 2017/175156, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте.

[277] В некоторых аспектах агонистом STING, применимый для настоящего изобретения, является CL606, CL611, CL602, CL655, CL604, CL609, CL614, CL656, CL647, CL626, CL629, CL603, CL632, CL633, CL659 или его фармацевтически приемлемая соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL606 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL611 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL602 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL655 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL604 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL609 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой

CL614 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL647 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL626 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL629 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL603 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL632 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL633 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL659 или его фармацевтически приемлемую соль.

[278] В некоторых аспектах агонист STING, применимый для настоящего изобретения, представляет собой CL656 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый в настоящем изобретении, представляет собой изомер А CL656 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый в настоящем изобретении, представляет собой изомер В CL656 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый в настоящем изобретении, представляет собой изомер С CL656 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах агонист STING, применимый в настоящем изобретении, представляет собой изомер D CL656 или его фармацевтически приемлемую соль.

[279] Агонисты STING по настоящему изобретению также могут быть модифицированы для увеличения или контроля инкапсуляции агониста во внеклеточной везикуле или экзосоме. Эта модификация может включать добавление липид-связывающей метки путем обработки агониста химическим веществом или ферментом, или путем физического или химического изменения полярности или заряда агониста STING. Агонист STING может быть модифицирован путем однократной обработки или путем комбинации обработок, *например*, путем добавления только липид-связывающей метки или добавления липид-связывающей метки и изменения полярности. Предыдущий пример предназначен для использования в качестве неограничивающего иллюстративного примера. Предполагается, что любая комбинация модификаций может быть осуществлена в настоящем изобретении. Модификация может увеличить или контролировать инкапсуляцию агониста в экзосоме от 2 до 10000 раз, от 10 до 1000 раз или от 100 до 500 раз по сравнению с инкапсуляцией немодифицированного агониста. Модификация может увеличить инкапсуляцию агониста в экзосому по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 раз по сравнению с инкапсуляцией немодифицированного

агониста.

[280] В некоторых аспектах один или более экзогенных биологически активных фрагментов, *например*, адъювант, представляют собой агонист TLR. Неограничивающие примеры агонистов TLR включают: агонист TLR2 (*например*, липотейхоевую кислоту, атипичный ЛПС, MALP-2 и MALP-404, OspA, порин, LcrV, липоманнан, ГФИ, лизофосфатидилсерин, липофосфогликан (ЛФГ), гликофосфатидилинозитол (ГФИ), зимозан, hsp60, гликопротеин gH/gL, гемагглютинин), агонист TLR3 (*например*, двухцепочечную РНК, *например*, поли(I:C)), агонист TLR4 (*например*, липополисахариды (ЛПС), липотейхоевую кислоту, β -дефенсин 2, фибронектин ЭДА, HMGB1, снапин, тенасцин С), агонист TLR5 (*например*, флагеллин), агонист TLR6, агонист TLR7/8 (*например*, одноцепочечную РНК, CpG-A, Поли G10, Поли G3, резиквимод), агонист TLR9 (*например*, метилированную ДНК CpG) и их комбинации. Неограничивающие примеры агонистов TLR можно найти в WO2008115319A2, US20130202707A1, US20120219615A1, US20100029585A1, WO2009030996A1, WO2009088401A2 и WO2011044246A1, каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

[281] В некоторых аспектах один или более экзогенных биологически активных фрагментов, *например*, адъювант, является воспалительным медиатором.

[282] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, по настоящему изобретению может содержать один или более экзогенных биологически активных фрагментов, *например*, иммуномодуляторы. В некоторых аспектах один или более иммуномодуляторов экспрессируются в комбинации с другими активными биологическими молекулами, *например*, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах один или более иммуномодуляторов могут быть экспрессированы на поверхности (*например*, внешней поверхности или поверхности просвета) или в просвете ВВ, *например*, экзосомы. Соответственно, в некоторых аспектах один или более иммуномодуляторов связаны с фрагментом каркаса (*например*, каркасом X) на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. В дополнительных аспектах один или более иммуномодуляторов находятся в просвете экзосомы (*т.е.* не связаны с каркасом X). В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой полинуклеотид. В некоторых из этих аспектов полинуклеотид включает, помимо прочего, мРНК, микроРНК, миРНК, антисмысловую РНК, кшРНК, днкРНК и дцДНК. В некоторых аспектах иммуномодулятор представляет собой белок, пептид, гликолипид или гликопротеин.

[283] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), приготовленная для настоящей композиции, содержит IL-12. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), приготовленная для настоящей композиции, содержит CD40L. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), приготовленная для настоящей композиции, содержит FLT3L. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), приготовленная для настоящей композиции, содержит IL-12 и CD40L. В других аспектах ВВ (*например*, экзосома) содержит IL-12, CD40L и FLT3L. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную

последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, 12 или 13 (таблица 1А). В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

Таблица 1А. Аминокислотные последовательности IL-12.

IL-12A человека (р35)(<u>сигнальный пептид</u>) SEQ ID NO: 11	<u>MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLR</u> AVSNMLQKAR QTLEFYPC TSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLA SRKTSFMMALCLSS IYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NAS
IL-12B человека (р40)(<u>сигнальный пептид</u>) SEQ ID NO: 12	<u>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEM</u> VVLTCDTPEED GITWTL DQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIW STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS RGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQED SACPAAEESLPIEVMVDA VHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PD TWSTPHSYFSLTF CVQVQGK SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPC S
Слитый IL-12 (сигнальный)	<u>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGE</u> <u>MVVLTCDTPEED</u>

<p>пептид-р40- линкер-р35) SEQ ID NO: 13</p>	<p><u>GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL</u> <u>LHKKEDGIW</u> <u>STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS</u> <u>RGSSDPQGV</u> <u>TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDA</u> <u>VHKLKYENYT</u> <u>SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF</u> <u>CVQVQ GK</u> <u>SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC</u> <u>SGGSGGGSG</u> GGGSGGGSGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYP CTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFM MALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS</p>
--	--

[284] В некоторых аспектах фрагмент IL-12 содержит полипептид р35 или его фрагмент. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, 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% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 96% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 97% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В

некоторых аспектах в фрагменте II-12 отсутствует сигнальный пептид (см. таблицу 1A).

[285] В некоторых аспектах фрагмент II-12 содержит полипептид р40 или его фрагмент. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, 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% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 96% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 97% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах в фрагменте II-12 отсутствует сигнальный пептид (см. таблицу 1A).

[286] В некоторых аспектах фрагмент II-12 содержит полипептид р35 или его фрагмент и полипептид р40 или его фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент II-12 содержит один полипептид, при этом полипептид р35 или его фрагмент связаны с полипептидом р40 или его фрагментом. В некоторых аспектах полипептид р35 или его фрагмент связаны с полипептидом р40 или его фрагментом линкером. В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых аспектах линкер содержит линкер Gly-Ser (GS). В некоторых аспектах линкер GS содержит $(G_4S)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых аспектах линкер GS содержит $(G_3S)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 10.

[287] В конкретных аспектах фрагмент II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, 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% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах II-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых

аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 96% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 97% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах IL-12 состоит по существу из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах в фрагменте IL-12 отсутствует сигнальный пептид (см. таблицу 1A).

[288] В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), составленная для настоящей композиции, содержит антисмысловой олигонуклеотид (АСО), который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте STAT6 (SEQ ID NO: 23; таблица 1B). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193. В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO: 144). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO: 145). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCCCTTGTA CTTTTGCATAG (SEQ ID NO: 193). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты GCAAGATCCCGGATTCGGTC (SEQ ID NO: 185).

Таблица 1B. Последовательности мРНК и белка STAT6

Последовательность мРНК STAT6
GGGGCAGCCACTGCTTACACTGAAGAGGGAGGACGGGAGAGGAGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGCTTTATCTTATTTTTCTTTTTGGTGG TGGTGGTGGAAAGGGGGGAGGTGCTAGCAGGGCCAGCCTTGAACCTCGCTGGACAG AGCTACAGACCTATGGGGCCTGGAAGTGCCCGCTGAGAAAGGGAGAAGACAGCA GAGGGGTTGCCGAGGCAACCTCCAAGTCCCAGATCATGTCTCTGTGGGGTCTGGT CTCCAAGATGCCCCCAGAAAAGTG CAGCGGCTCTATGTCTGACTTTCCCAACAC CTGCGGCATCTTCTGGGTGACTGGCTGGAGAGCCAGCCCTGGGAGTTCCTGGTCCG GCTCCGACGCCTTCTGCTGCAACTTGGCTAGTGCCCTACTTTCAGACACTGTCCAG CACCTTCAGGCCTCGGTGGGAGAGCAGGGGGAGGGGAGCACCATCTTGCAACAC

ATCAGCACCCCTTGAGAGCATATATCAGAGGGACCCCTGAAGCTGGTGGCCACTT
TCAGACAAATACTTCAAGGAGAGAAAAAGCTGTTATGGAACAGTTCGCCACTT
GCCAATGCCTTTCCACTGGAAGCAGGAAGA ACTCAAGTTTAAGACAGGCTTGCGG
AGGCTGCAGCACCGAGTAGGGGAGATCCACCTTCTCCGAGAAGCCCTGCAGAAGG
GGGCTGAGGCTGGCCAAGTGTCTCTGCACAGCTTGATAGAACTCCTGCTAATGG
GACTGGGCCAAGTGAGGCCCTGGCCATGCTACTGCAGGAGACCACTGGAGAGCTA
GAGGCAGCCAAAGCCCTAGTGCTGAAGAGGATCCAGATTTGGAAACGGCAGCAG
CAGCTGGCAGGGAATGGCGCACCGTTTGAGGAGAGCCTGGCCCCACTCCAGGAGA
GGTGTGAAAGCCTGGTGGACATTTATTCCAGCTACAGCAGGAGGTAGGGGGCGGC
TGGTGGGGAGCTTGAGCCCAAGACCCGGGCATCGCTGACTGGCCGGCTGGATGAA
GTCCTGAGAACCCTCGTCACCAGTTGCTTCCTGGTGGAGAAGCAGCCCCCCCAGG
TACTGAAGACTCAGACCAAGTTCCAGGCTGGAGTTCGATTCCTGTTGGGCTTGAG
GTTCTGGGGGCCCCAGCCAAGCCTCCGCTGGTCAGGGCCGACATGGTGACAGAG
AAGCAGGCGCGGGAGCTGAGTGTGCCTCAGGGTCTGGGGCTGGAGCAGAAAGC
ACTGGAGAAATCATCAACAACACTGTGCCCTTGGAGAACAGCATTCTGGGAACT
GCTGCTCTGCCCTGTTCAAGAACCTGCTTCTCAAGAAGATCAAGCGGTGTGAGCG
GAAGGGCACTGAGTCTGTCACAGAGGAGAAGTGCCTGTGCTCTTCTCTGCCAGC
TTCACACTTGGCCCCGGCAAACCTCCCCATCCAGCTCCAGGCCCTGTCTCTGCCCT
GGTGGTCATCGTCCATGGCAACCAAGACAACAATGCCAAAGCCACTATCCTGTGG
GACAATGCCTTCTCTGAGATGGACCGCGTGCCCTTTGTGGTGGCTGAGCGGGTGCC
CTGGGAGAAGATGTGTGAAACTCTGAACCTGAAGTTCATGGCTGAGGTGGGGACC
AACCGGGGGCTGCTCCCAGAGCACTTCCTCTTCTGGCCCCAGAAGATCTTCAATGA
CAACAGCCTCAGTATGGAGGCCTTCCAGCACCGTTCTGTGTCTGGTTCGCAGTTCA
ACAAGGAGATCCTGCTGGGCCGTGGCTTCACCTTTTGGCAGTGGTTTGATGGTGTC
CTGGACCTCACAAACGCTGTCTCCGGAGCTACTGGTCTGACCGGCTGATCATTGG
CTTCATCAGCAAACAGTACGTTACTAGCCTTCTTCTCAATGAGCCCGACGGAACCT
TTCTCCTCCGCTTCAGCGACTCAGAGATTGGGGGCATCACCATTGCCCATGTCATC
CGGGGCCAGGATGGCTCTCCACAGATAGAGAACATCCAGCCATTCTCTGCCAAAG
ACCTGTCCATTCGCTCACTGGGGGACCGAATCCGGGATCTTGCTCAGCTCAAAAAT
CTCTATCCCAAGAAGCCCAAGGATGAGGCTTTCCGGAGCCACTACAAGCCTGAAC
AGATGGGTAAGGATGGCAGGGGTTATGTCCAGCTACCATCAAGATGACCGTGGA
AAGGGACCAACCACTTCTACCCAGAGCTCCAGATGCCTACCATGGTGCCTTCTT
ATGACCTTGAATGGCCCCTGATTCTCCATGAGCATGCAGCTTGGCCCAGATATG
GTGCCCCAGGTGTACCCACCACACTCTCACTCCATCCCCCGTATCAAGGCCTCTC
CCCAGAAGAATCAGTCAACGTGTTGTCAGCCTTCCAGGAGCCTCACCTGCAGATG

```

CCCCCAGCCTGGGCCAGATGAGCCTGCCCTTTGACCAGCCTCACCCCCAGGGCCT
GCTGCCGTGCCAGCCTCAGGAGCATGCTGTGTCCAGCCCTGACCCCCTGCTCTGCT
CAGATGTGACCATGGTGGAAAGACAGCTGCCTGAGCCAGCCAGTGACAGCGTTTCC
TCAGGGCACTTGGATTGGTGAAGACATATCCCTCCTCTGCTGCCTCCCCTGAAC
AGGACCTCACTAAGCTTCTCCTGGAGGGGCAAGGGGAGTCGGGGGGAGGGTCCTT
GGGGGCACAGCCCCTCCTGCAGCCCTCCCCTATGGGCAATCTGGGATCTCAATG
TCCCACATGGACCTAAGGGCCAACCCCAGTTGGTGATCCCAGCTGGAGGGAGAAC
CCAAAGAGACAGCTCTTCTACTACCCCCACAGACCTGCTCTGGACACTTGCTCATG
CCCTGCCAAGCAGCAGATGGGGAGGGTGCCCTCCTATCCCCACCTACTCCTGGGT
CAGGAGGAAAAGACTAACAGGAGAATGCACAGTGGGTGGAGCCAATCCACTCCT
TCCTTTCTATCATTCCCCTGCCACCTCCTTCCAGCACTGACTGGAAGGGAAGTTC
AGGCTCTGAGACACACCCCAACATGCCTGCACCTGCAGCGCGCACACGCACGCAC
ACACACATACAGAGCTCTCTGAGGGTGATGGGGCTGAGCAGGAGGGGGGCTGGG
TAAGAGCACAGGTTAGGGCATGGAAGGCTTCTCCGCCATTCTGACCCAGGGCCT
AGGACGGATAGGCAGGAACATACAGACACATTTACACTAGAGGCCAGGGATAGA
GGATATTGGGTCTCAGCCCTAGGGGAATGGGAAGCAGCTCAAGGGACCCTGGGTG
GGAGCATAGGAGGGGTCTGGACATGTGGTTACTAGTACAGGTTTTGCCCTGATTA
AAAAATCTCCCAAAGCCCCAAATTCCTGTTAGCCAGGTGGAGGCTTCTGATACGT
GTATGAGACTATGCAAAAGTACAAGGGCTGAGATTCTTCGTGTATAGCTGTGTGA
ACGTGTATGTACCTAGGATATGTTAAATGTATAGCTGGCACCTTAGTTGCATGACC
ACATAGAACATGTGTCTATCTGCTTTTGCCTACGTGACAACACAAATTTGGGAGGG
TGAGACACTGCACAGAAGACAGCAGCAAGTGTGCTGGCCTCTCTGACATATGCTA
ACCCCCAAATACTCTGAATTTGGAGTCTGACTGTGCCCAAGTGGGTCCAAGTGGCT
GTGACATCTACGTATGGCTCCACACCTCCAATGCTGCCTGGGAGCCAGGGTGAGA
GTCTGGGTCCAGGCCTGGCCATGTGGCCCTCCAGTGTATGAGAGGGCCCTGCCTG
CTGCATCTTTTCTGTTGCCCATCCACCGCCAGCTTCCCTTCACTCCCCTATCCCAT
TCTCCCTCTCAAGGCAGGGGTCATAGATCCTAAGCCATAAAAATAAATTTTATTCCA
AAATAACAAAATAAATAATCTACTGTACACAATCTGAAAA (SEQ ID NO: 23)

```

III. Каркасные фрагменты, например, каркас X или каркас Y

[289] В некоторых аспектах ВВ, *например* экзосомы, по настоящему изобретению содержат мембрану, модифицированную по своему составу. Например, составы их мембран могут быть изменены путем изменения содержания белков, липидов или гликанов в мембране.

[290] В некоторых аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосомы получают химическими и/или физическими способами, такими как индуцированное ПЭГ-слияние и/или ультразвуковое слияние. В других аспектах ВВ со

сконструированной поверхностью, *например*, экзосомы, получают с помощью способов генной инженерии. ВВ, *например*, экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать модифицированные по составу мембраны. В некоторых аспектах ВВ со сконструированной поверхностью, *например*, экзосомы, имеют каркасный фрагмент (*например*, белок экзосомы, *например*, каркас X) с более высокой или низкой плотностью (*например*, в большем количестве) или включают вариант или фрагмент каркасного фрагмента.

[291] Например, сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X) могут быть получены из клетки (*например*, клеток НЕК293), трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей каркасный фрагмент (*например*, белки экзосомы, *например*, каркас X) или его вариант или фрагмент. ВВ, включающие каркасную фрагмент, экспрессированный из экзогенной последовательности, могут включать модифицированные по составу мембраны.

[292] Различные модификации или фрагменты каркасного фрагмента могут быть использованы для аспектов настоящего изобретения. Например, каркасный фрагмент, модифицированный с целью повышения аффинности к связывающему агенту, может быть использован для создания ВВ со сконструированной поверхностью, которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные для более эффективного нацеливания на ВВ и/или мембраны. Также можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные для включения минимального фрагмента, необходимого для специфического и эффективного нацеливания на мембраны экзосом.

[293] Неограничивающие примеры фрагментов каркаса включают: отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN); басигин (BSG); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 2 (IGSF2); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 3 (IGSF3); представителя суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IGSF8); интегрин бета-1 (ITGB1); интегрин альфа-4 (ITGA4); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 (SLC3A2); и класс белков-переносчиков АТФ (АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В). В некоторых аспектах фрагменты каркаса представляют собой цельный белок. В других аспектах каркасные фрагменты представляют собой белковый фрагмент (*например*, функциональный фрагмент).

[294] В других аспектах каркасный фрагмент, применимый для настоящего изобретения, первый каркасный фрагмент, второй каркасный фрагмент и/или третий каркасный фрагмент, включает обычный белок экзосомы, включая, помимо прочего, молекулы тетраспанина (*например*, CD63, CD81, CD9 и другие), ассоциированный с лизосомой мембранный белок 2 (LAMP2 и LAMP2B), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), якорные белки GPI, лактадгерин и их фрагменты, пептиды, которые имеют аффинность к любому из этих белков или их фрагментов, или любую их

комбинацию.

[295] В некоторых аспектах сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X), описанные в настоящем документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ, известными в данной области техники. Например, сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X), содержат на поверхности модифицированные белки в больших количествах, чем встречающиеся в природе ВВ или ВВ, полученные с использованием обычных белков экзосом. Более того, сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X) по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфичной или более контролируемой биологической активностью по сравнению с природными ВВ или ВВ, полученными с использованием обычных белков экзосом.

[296] В некоторых аспектах каркас X содержит отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (полипептид PTGFRN). Белок PTGFRN можно также назвать партнером 1 CD9 (CD9P-1), белком F, содержащим мотив Glu-Trp-Ile EWI (EWI-F), регуляторным белком рецептора простагландина F2-альфа, белком, ассоциированным с рецептором простагландина F2-альфа, или CD315. Полная аминокислотная последовательность белка PTGFRN человека (номер доступа Uniprot Q9P2B2) показана в таблице 2 как SEQ ID NO: 1. Полипептид PTGFRN содержит сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 25 SEQ ID NO: 1), внеклеточный домен (аминокислоты с 26 по 832 SEQ ID NO: 1), трансмембранный домен (аминокислоты с 833 по 853 SEQ ID NO: 1) и цитоплазматический домен (аминокислоты с 854 по 879 SEQ ID NO: 1). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 1 без сигнального пептида, т. е. аминокислот с 26 по 879 SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, пригодный для настоящего изобретения, содержит трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый для 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 оба (i) и (ii).

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

[298] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100%

идентичны аминокислотам с 26 по 879 SEQ ID NO: 1. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичны SEQ ID NO: 9. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций, или семь аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или длиннее на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 9.

[299] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7. В других аспектов, каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти мутации аминокислот, мутации шести аминокислот или мутации семи аминокислот. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7 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 длиннее на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности каркасного белка X

SEQ ID NO.	Белок	Последовательность
1.	Полно размер	MGRLASRPLLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNV SDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQRG

	ый белок PTGF RN	EILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDT VQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPPFELRCTAASASPLHHL ALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTV GSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVA TVVIQPSVLRRAAVPKNVSV AEGKELDLTCNITTD RADDVRPEVTW SFSRMPDSTLPGSRVRLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLV RDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTV LEPDYQVYLNASKVPGFADDPTTELACRVVDTKSGEANVRFTVSW YYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGDGDFIF SKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDV FSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIK SPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRV DGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSL WREAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVE GAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLD RKGIVTTSRR DWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPG SWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIG YCSSHWCCKKEVQETRERRRRLMSMEMD
2.	Фрагм ент белка PTGF RN №1	PSARPPPSLS LREGEPPFELR CTAASASPLH THLALLWEVH RGPARRSVLA LTHEGRFHPG LGYEQRYHSG DVRLDTVGS AYRLSVSRAL SADQGSYRCI VSEWIAEQGN WQEIQEKAVE VATVVIQPSV LRAAVPKNVSV AEGKELDLT CNITTD RADD VRPEVTWSFS RMPDSTLPGS RVLARLDRDS LVHSSPHVAL SHVDARSYHL LVRDVS KENS GYYYCHVSLW APGHNRSWHK VAEAVSSPAG VGVTVLEPDY QVYLNASKVP GFADDPTELA CRVVDTKSGE ANVRFTVSWY YRMNRRSDNV VTSELLAVMD GDWTLKYGER SKQRAQDGDGDF IFSKEHTDTF NFRIQRTTEE DRGNYYCVVS AWTKQRNNSW VKSKDVFSKP VNIFWALEDS VLVVKARQPK PFFAAGNTFE MTCKVSSKNI KSPRYSVLIM AEKPVGDLSS PNETKYIISL DQDSVVKLEN WTDASRVDGV VLEKVQEDEF RYRMYQTQVS DAGLYRCMVT AWSPVRGSLW REAATSLSNP IEIDFQTS GP IFNASVHSDT PSVIRGDLIK LFCIITVEGA ALDPDDMAFD VSWFAVHSFG LDKAPVLLSS LDRKGIVTTS RRDWKSDLSL ERVSVLEFLL QVHGSEDQDF GNYYCSVTPW VKSPTGSWQK EAEIHSKPVF ITVKMDVLNA

		FKYPLLIGVG LSTVIGLLSC LIGYCSSHWC CKKEVQETRR ERRRLMSMEM D
3.	Фрагмент белка PTGF RN №2	VATVVIQPSV LRAAVPKNVS VAEGKELDLT CNITTDRAADD VRPEVTWSFS RMPDSTLPGS RVLARLDRDS LVHSSPHVAL SHVDARSYHL LVRDVSKENS GYYYCHVSLW APGHNRSWHK VAEAVSSPAG VGVTWLEPDY QVYLNASKVP GFADDPTELA CRVVDTKSGE ANVRFTVSWY YRMNRRSDNV VTSELLAVMD GDWTLKYGER SKQRAQDGDGDF IFSKEHTDTF NFRIQRTTEE DRGNYYCVVS AWTKQRNNSW VKSKDVFSKP VNIFWALEDS VLVVKARQPK PFFAAGNTFE MTCKVSSKNI KSPRYSVLIM AEKPVGDLSS PNETKYIISL DQDSVVKLEN WTDASRVDGV VLEKVQEDEF RYRMYQTQVS DAGLYRCMVT AWSPVRGSLW REAATSLSNP IEIDFQTS GP IFNASVHSDT PSVIRGDLIK LFCIITVEGA ALDPDDMAFD VSWFAVHSFG LDKAPVLLSS LDRKGIVTTS RRDWKS DLSL ERVSVLEFLL QVHGSEDQDF GNYYCSVTPW VKSPTGSWQK EAEIHSKPVF ITVKMDVLNA FKYPLLIGVG LSTVIGLLSC LIGYCSSHWC CKKEVQETRR ERRRLMSMEM D
4.	Фрагмент белка PTGF RN №3	SPAGVGVTLW EPDYQVYLNA SKVPGFADDP TELACRVVDT KSGEANVRFT VSWYYRMNRR SDNVVTSELL AVMDGDWTLK YGERSKQRAQ DGDFIFSKEH TDTFNRIQR TTEEDRGNY CVVSAWTKQR NNSWVSKSDV FSKPVNIFWA LEDSVLVVKA RQPKPFFAAG NTFEMTCKVS SKNIKSPRYS VLIMAEKPVG DLSSPNETKY IISLDQDSVV KLENWTDASR VDGVVLEKVQ EDEFYRMYQ TQVSDAGLYR CMVTAWSPVR GSLWREAATS LSNPIEIDFQ TSGPIFNASV HSDTPSVIRG DLIKLFICIIT VEGAALDPDD MAFDVSWFAV HSFGLDKAPV LLSSLDRKGI VTTSRRDWKS DLSLERSVL EFLQVHGSE DQDFGNYYCS VTPWVKSPGT SWQKEAEIHS KPVFITVKMD VLNAFKYPLL IGVGLSTVIG LLSC LIGYCS SHWCKKEVQ ETRRERRRLM SMEMD
5.	Фрагмент белка PTGF	KPVNIFWALE DSVLVVKARQ PKPFFAAGNT FEMTCKVSSK NIKSPRYSVL IMAEKPVGDL SSPNETKYII SLDQDSVVKL ENWTDASRVD GVVLEKVQED EFRYRMYQTQ VSDAGLYRCM VTAWSPVRGS LWREAATSLNPIEIDFQTS GPIFNASVHS

	RN №4	DTPSVIRGDL IKLFCITVE GAALDPDDMA FDVSWFAVHS FGLDKAPVLL SSLDRKGIVT TSRRDWKSDL SLERVSVLEF LLQVHGSEDQ DFGNYCYCSVT PWVKSPTGSW QKEAEIHSKP VFITVKMDVL NAFKYPLLIG VGLSTVIGLL SCLIGYCSSH WCKKEVQET RRERRRLMSM EMD
6.	Фрагмент белка PTGF RN №5	VRGSLWREAA TSLSNPIEID FQTSGPIFNA SVHSDTPSVI RGDLIKLFCI ITVEGAALDP DDMAFDVSWF AVHSFGLDKA PVLLSSLDRK GIVTTSRRDW KSDLSSLERVS VLEFLQVHG SEDQDFGNYY CSVTPWVKSP TGSWQKEAEI HSKPVFITVK MDVLNAFKYP LLIGVGLSTV IGLLSCLIGY CSSHWCKKE VQETRRERRR LMSMEMD
7.	Фрагмент белка PTGF RN №6	SKPVFITVKM DVLNAFKYPL LIGVGLSTVI GLLSCLIGYC SSHWCKKEV QETRRERRRL MSMEMD
8.	Белок PTGF RN - сигнальный пептид	MGRLASRPLL LALLSLALCR G
9.	Фрагмент белка PTGF RN №7	GPIFNASVHS DTPSVIRGDL IKLFCITVE GAALDPDDMA FDVSWFAVHS FGLDKAPVLL SSLDRKGIVT TSRRDWKSDL SLERVSVLEF LLQVHGSEDQ DFGNYCYCSVT PWVKSPTGSW QKEAEIHSKP VFITVKMDVL NAFKYPLLIG VGLSTVIGLL SCLIGYCSSH WCKKEVQET RRERRRLMSM EMD

[300] Неограничивающие примеры других каркасных белков X можно найти в патентах США № US 10195290 B1 и US 10561740 B2, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

[301] В некоторых аспектах каркасная часть, экспрессируемая в ВВ, не слита с полезной нагрузкой, *например*, биологически активным фрагментом, *например*, агонистом STING.

[302] В некоторых аспектах каркас X можно использовать для одновременного связывания любого фрагмента с поверхностью просвета и с внешней поверхностью ВВ, *например*, с экзосомой. Например, полипептид PTGFRN можно использовать для

связывания антигена, адъюванта и/или иммуномодулятора внутри просвета (*например*, на поверхности просвета) в дополнение к внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Следовательно, в некоторых аспектах каркас X можно использовать для двойных целей, *например*, антиген на поверхности просвета и адъювант или иммуномодулятор на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы, антиген на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы и адъювант или иммуномодулятор на поверхности просвета, адъювант на поверхности просвета и иммуномодулятор на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы или иммуномодулятор на поверхности просвета и адъювант на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы.

[303] В некоторых аспектах каркасный белок содержит каркас Y. Неограничивающие примеры каркасных белков Y, которые можно использовать в композициях и способах, раскрытых в настоящем документе, включают те каркасные белки Y, которые раскрыты, например, в международной публикации № WO 2019/099942 или WO 2020/101740, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых аспектах каркасный белок Y выбран из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы C («белок MARCKS»); белка 1, подобного миристоилированному богатому аланином субстрату протеинкиназы C, («белок MARCKSL1»), кислоторастворимого белка головного мозга 1 («белок BASP1»). В некоторых аспектах каркасный белок Y может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, способный прикреплять фрагмент на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосом). В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент (*например*, агониста STING и/или фрагмент IL-12) в просвете ВВ, *например*, экзосомы.

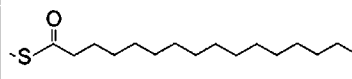
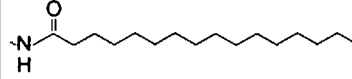
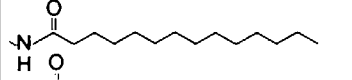
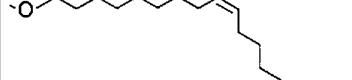
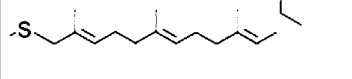
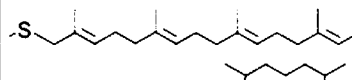
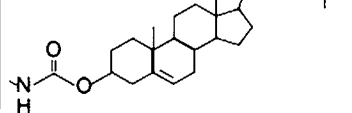
III. Якорные фрагменты

[304] В некоторых аспектах одна или более полезных нагрузок могут быть связаны с якорным фрагментом. В некоторых аспектах якорные фрагменты, которые можно использовать для связывания полезной нагрузки с внешней поверхностью и/или поверхностью просвета ВВ (*например*, экзосомы), включают: стерол (*например*, холестерин), GM1, липид (*например*, жирную кислоту), витамин, гизкомолекулярное вещество, пептид или их комбинацию.

[305] В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет 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 их части, например, его частично гидролизованную часть).

[306] Как правило, якорные фрагменты присоединяются химически. Однако якорный фрагмент может быть присоединен к полезной нагрузке ферментативным путем.

[307] Некоторые типы мембранных якорей, которые можно использовать для осуществления способов по настоящему изобретению, представлены в следующей таблице:

модификация	модифицирующая группа
S-пальмитоилирование	
N-пальмитоилирование	
N-миристилоилирование	
O-ацилирование	
Фарнесилирование	
Геранилгеранилирование	
Холестерин	

[308] В некоторых аспектах якорный фрагмент по настоящему изобретению может содержать два или более типов якорных фрагментов, раскрытых в настоящем документе. Например, в некоторых аспектах якорный фрагмент может содержать два липида, *например*, фосфолипиды и жирную кислоту, или два фосфолипиды, или две жирные кислоты, или липид и витамин, или холестерин и витамин.

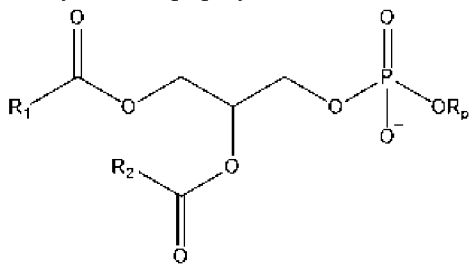
[309] В некоторых аспектах якорный фрагмент, применимый в настоящем изобретении, содержит стерол, стероид, гопаноид, гидроксистероид, секостероид или их аналог с липофильными свойствами. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стерол, такой как фитостерол, микостерол или зоостерол. Примеры зоостеролов включают холестерин и 24S-гидроксихолестерин; типичные фитостеролы включают эргостерол (микостерол), кампестерол, ситостерол и стигмастерол. В некоторых аспектах стерол выбран из эргостерола, 7-дегидрохолестерола, холестерина, 24S-гидроксихолестерола, ланостерола, циклоартенола, фукостерола, сарингостерола, кампестерола, β -ситостерола, ситостанола, копростанола, авенастерола или стигмастерола. Стерины могут находиться в виде свободных стеролов, ацилированных (эфиры стерола), алкилированных (стерилалкиловые эфиры), сульфатированных (стеролсульфат) или связанных с гликозидной частью (стерилгликозиды), которая сама может быть ацилирована (ацилированные стеролгликозиды). В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой холестерин.

[310] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стероид. В некоторых аспектах стероид выбран из дигидротестостерона, уваола, гецигенина, диосгенина,

прогестерона или кортизола.

[311] 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 омега-3 или омега-6 жирная кислота.

[312] 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 фрагмент фосфолипида, а R_1 и R_2 представляют собой фрагменты жирных кислот с ненасыщенностью или без нее, которые могут быть одинаковыми или разными.

[313] В некоторых аспектах полезная нагрузка связана с якорным фрагментом, описанным в настоящем документе, посредством комбинации линкеров, которая может содержать любую комбинацию расщепляемых и/или нерасщепляемых линкеров. Чтобы не быть связанными какой-либо теорией, одной из функций комбинации линкеров является обеспечение оптимального расстояния между якорным фрагментом и полезной нагрузкой.

III. Линкеры

[314] Как описано *выше*, внеклеточные везикулы (ВВ) по настоящему изобретению (*например*, экзосомы и нановезикулы) могут содержать один или более линкеров, которые связывают один или более экзогенных биологически активных фрагментов, раскрытых в настоящем документе, с ВВ (*например*, с внешней поверхностью или на поверхности просвета). В некоторых аспектах один или более экзогенных биологически активных фрагментов связаны с ВВ напрямую или через один или несколько каркасных фрагментов (*например*, каркас X). Например, в некоторых аспектах один или более экзогенных биологически активных фрагментов связаны с внешней поверхностью экзосомы посредством каркаса X. В дополнительных аспектах один или более экзогенных

биологически активных фрагментов связаны с поверхностью просвета экзосомы посредством каркаса X. Линкер может представлять собой любую химическую группу, известную в данной области.

[315] Используемый в данном документе 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 линкера могут быть связаны тандемно. Когда присутствует несколько линкеров, каждый из линкеров может быть одинаковым или различным. 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.

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

[317] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, то есть 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).

[318] Линкеры могут быть подвержены расщеплению («расщепляемый линкер»), тем самым облегчая высвобождение экзогенного биологически активного фрагмента.

[319] В некоторых аспектах линкер является «чувствительным к восстановлению линкером». В некоторых аспектах чувствительный к восстановлению линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых аспектах линкер представляет собой

«кислотолабильный линкер». В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит гидразон. Подходящие кислотолабильные линкеры также включают, например, цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

[320] В некоторых аспектах АСО связан с ВВ, *например*, экзосомой, посредством линкера. В некоторых аспектах линкер содержит акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (сложный эфир NHS), дигоксигенин (сложный эфир NHS), холестерин-ТЭГ, I-LINKER™, аминомодификатор (например, аминомодификатор С6, аминомодификатор С12, аминомодификатор С6 dT или аминомодификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадиинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-ТЕГ, двойной биотин, РС-биотин или дестиобиотин), тиолоую модификацию (тиоловый модификатор С3 S-S, дитиол или тиоловый модификатор С6 S-S) или любую их комбинацию.

[321] В некоторых аспектах линкер содержит терпен, такой как неролидол, фарнезол, лимонен, линалоол, гераниол, карвон, фенхон или ментол; липид, такой как пальмитиновая кислота или миристиновая кислота; холестерин; олеил; ретинил; остатки холестерина; холевую кислоту; адамантануксусную кислоту; 1-пиренмасляную кислоту; дигидротестостерон; 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин; геранилксигексильную группу; гексадецилглицерин; борнеол; 1,3-пропандиол; гептадецильную группу; О3-(олеоил)литохолевую кислоту; О3-(олеоил)холеновую кислоту; диметокситритил; феноксазин, малеимидный фрагмент, тип глюкоринидазы, тип CL2A-SN38, фолиевую кислоту; углевод; витамин А; витамин Е; витамин К или любая их комбинация. В некоторых аспектах АСО содержит метку холестерина, и метка холестерина связана с мембраной ВВ, *например*, экзосомой. В некоторых аспектах линкер содержит нерасщепляемый линкер.

[322] В некоторых аспектах линкер содержит тетраэтиленгликоль (ТЭГ), гексаэтиленгликоль (ГЭГ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах линкер содержит единицу спейсера для связывания биологически активной молекулы с линкером.

[323] В некоторых аспектах один или более линкеров содержат более мелкие единицы (*например*, ГЭГ, ТЭГ, глицерин, С2-С12 алкил и т.п.), связанные вместе. В одном аспекте связь представляет собой сложноэфирную связь (*например*, фосфодиэфирную или фосфоротиоатную эфирную) или другую связь.

[324] В некоторых аспектах линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), характеризующийся 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 имеет значение от 2 до 200. В некоторых аспектах линкер содержит спейсер, при этом спейсер представляет собой ПЭГ.

[325] В некоторых аспектах линкер ПЭГ представляет собой олигоэтиленгликоль, *например*, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), пентаэтиленгликоль или гексаэтиленгликоль (ГЭГ) линкер.

Способы лечения

[326] Кроме того, предполагается введение описанных в настоящем документе фармацевтических композиций для лечения множества заболеваний или состояний, при которых введение ВВ оказывает благоприятное воздействие на субъекта. В некоторых аспектах способы лечения заболевания или состояния у субъекта, описанные в настоящем документе, включают введение субъекту фармацевтической композиции.

[327] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена композиция, которую можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, чрескожным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, внутриопухолевым, внутримышечным путем, или в виде ингаляционного средства. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, вводят внутривенно, например, путем инъекции. Для трансмукозального или чрескожного введения в составе используют пенетранты, соответствующие барьеру, через который необходимо проникнуть. Такие пенетранты широко известны в данной области техники и включают, *например*, пенетранты для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмуккозальное введение можно осуществлять с помощью назальных спреев или суппозиторияев. Для чрескожного введения модифицированные экзосомы готовят в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как это обычно известно в данной области.

[328] В некоторых аспектах ВВ вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящую жидкость и вводят субъекту в вену. В некоторых аспектах ВВ вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящую жидкость и вводят субъекту в артерию. В некоторых аспектах ВВ вводят субъекту путем интратекального введения. В некоторых аспектах ВВ вводят *путем* инъекции в спинномозговой канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (СМЖ). В некоторых аспектах ВВ вводят внутриопухолево в одну или несколько опухолей субъекта. В некоторых аспектах ВВ вводят субъекту интраназально. В некоторых аспектах ВВ можно инсуфлировать через нос либо в форме местного введения, либо в форме системного введения. В некоторых аспектах ВВ вводят в виде назального спрея.

[329] В некоторых аспектах ВВ вводят субъекту внутрибрюшинно. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящую жидкость и вводят в брюшину субъекта. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в лимфатических сосудах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в один или несколько лимфатических узлов. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ 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 в поджелудочной железе.

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

[331] В некоторых аспектах лечение носит профилактический характер. В некоторых аспектах ВВ по настоящему изобретению используют для индукции иммунного ответа. В некоторых аспектах ВВ по настоящему изобретению используются для вакцинации субъекта.

[332] В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой рак, фиброз, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, глазное заболевание, болезнь Помпе, лизосомную болезнь накопления, муковизицидоз, кистозный фиброз, мышечную дистрофию Дюшенна и Беккера, транстиретиновый амилоидоз, гемофилию А, гемофилию В, дефицит аденозиндезаминазы, врожденный амавроз Лебера, X-сцепленную адренолейкодистрофию, метахроматическую лейкодистрофию, дефицит ОТС, болезнь накопления гликогена 1А, синдром Криглера-Наджара, первичную гипероксалурию 1 типа, острую перемежающуюся порфирию, фенилкетонурию, семейную гиперхолестеринемию, мукополисахаридоз VI типа, дефицит α 1-антитрипсина и гиперхолестеринемию.

[333] В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD). В некоторых аспектах заболевание или нарушение, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, представляет собой аутоиммунное заболевание. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают 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.

[334] В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой инфекционное заболевание. В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой онкогенный вирус. В некоторых аспектах инфекционные заболевания, которые можно лечить с помощью настоящего изобретения, включают, помимо прочего, вирус гамма-герпеса человека 4 (вирус Эпштейна-Барра), вирус гриппа А, вирус гриппа В, цитомегаловирус, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, ВИЧ-1, ВИЧ- 2, короновирусы (*например*, MERS-CoV и SARS CoV), филовирусы (*например*, Марбург и Эбола), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*

pneumoniae, Plasmodia species (*например*, vivax и falciparum), Chikungunya virus, вирус папилломы человека (ВПЧ), гепатит В, гепатит С, вирус герпеса человека 8, вирус простого герпеса 2 (HSV2), Klebsiella sp., Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus sp., Proteus sp., Enterobacter sp., Actinobacter sp., коагулазонегативные стафилококки (CoNS), Mycoplasma sp. или их комбинации.

[335] В некоторых аспектах рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичка, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак яичников, лимфому, рак печени, глиобластому, меланому, миелому, лейкемию, рак поджелудочной железы или их комбинацию.

[336] В некоторых аспектах рак связан с повышенной экспрессией белка STAT6. Неограничивающие примеры рака, который можно лечить с помощью настоящего изобретения, включают колоректальный рак, рак легкого (*например*, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)), рак поджелудочной железы (*например*, аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC)), лейкоз, рак матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак желчных протоков, рак желудка или любая их комбинация. В некоторых аспектах рак выбран из аденокарциномы толстой кишки, аденокарциномы прямой кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC), серозной цистаденокарциномы яичников, острого миелоидного лейкоза, рака яичка (*например*, опухолей зародышевых клеток яичка, семиномы, несеминомы и хориокарциномы), аденокарциномы легкого, глиомы головного мозга более низкой степени злокачественности, мультиформной глиобластомы, увеальной меланомы, карциномы щитовидной железы, эндометриальной карциномы тела матки, карциносаркомы матки, феохромоцитомы, параганглиомы и любой их комбинации. В некоторых аспектах рак представляет собой богатый миелоидами рак. В некоторых аспектах рак включает рак печени. В некоторых аспектах рак включает гепатоцеллюлярный рак (ГЦК). В некоторых аспектах рак включает аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC), в некоторых аспектах рак включает колоректальную карциному (КРК). В некоторых аспектах рак включает рак яичников. В некоторых аспектах рак включает лептоменингеальный рак.

[337] При введении субъекту, имеющему рак, в некоторых аспектах ВВ по настоящему изобретению могут усиливать иммунный ответ и усиливать нацеливание иммунной системы субъекта на опухоль. В некоторых аспектах рак, подвергаемый лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или так называемыми «горячими опухолями» или «воспалительными опухолями». В некоторых аспектах рак, подвергаемый лечению, характеризуется низкими уровнями или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли, или так называемыми «холодными опухолями» или «невоспалительными опухолями». В некоторых аспектах ВВ вводят в количестве и в течение времени, достаточных для превращения «холодной опухоли» в «горячую опухоль», *т. е.* указанное введение приводит к инфильтрации

лейкоцитов (таких как Т-клетки) в микроокружение опухоли. В некоторых аспектах рак включает рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичка, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи и рак яичников, лимфому, рак печени, глиобластому, меланому, миелому, лейкемию, 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 по настоящему изобретению лечат опухоль после метастатического распространения.

Способы получения сконструированных экзосом

[338] ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению, могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro*, или из жидкости организма субъекта. Когда экзосомы получают из культуры клеток *in vitro*, можно использовать различные клетки-продуценты.

[339] В некоторых аспектах клетка-продуцент может представлять собой линию клеток млекопитающих, линию клеток растений, линию клеток насекомых, линию клеток грибов или линию прокариотических клеток. В некоторых аспектах клетка-продуцент представляет собой клеточную линию млекопитающих. Неограничивающие примеры клеточных линий млекопитающих включают: линию клеток эмбриональной почки человека (НЕК), линию клеток яичника китайского хомячка (СНО), линию клеток НТ-1080, линию клеток HeLa, линию клеток PERC-6, линию клеток CEVEC, линию клеток фибробластов, линию клеток амниоцитов, линию эпителиальных клеток, линию клеток мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и их комбинации. В определенных аспектах линия клеток млекопитающих включает клетки НЕК-293, клетки фибробластов крайней плоти человека ВJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1 или их комбинации. В некоторых аспектах клетка-продуцент представляет собой первичную клетку. В определенных аспектах первичная клетка может представлять собой первичную клетку млекопитающего, первичную клетку растения, первичную клетку насекомого, первичную клетку грибов или первичную прокариотическую клетку.

[340] В некоторых аспектах клетка-продуцент не является иммунной клеткой, такой как антигенпрезентирующая клетка, Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер (NK-клетка), макрофаг, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (клетка Treg). В других аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой (*например*, дендритными клетками, макрофагами, В-клетками, тучными клетками, нейтрофилами, клеткой Купфера-Бровича или клеткой, полученной из любых таких клеток).

[341] Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения одной или нескольких экзогенных последовательностей (*например*, кодирующих одну или несколько экзогенных биологически активных фрагментов, раскрытых в настоящем документе, *например*, иммуномодулятор, например, IL-12, или АСО, например, АСО

STAT6) для получения описанных в данном документе экзосом. Генетически модифицированная клетка-продуцент может содержать экзогенные последовательности путем временной или стабильной трансформации. Экзогенные последовательности могут быть трансформированы в виде плазмиды. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-продуцента, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых аспектах создается стабильная клеточная линия для получения ВВ, раскрытых в настоящем документе, *например*, экзосом.

[342] Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-продуцента, расположенную внутри, выше (5'-конец) или ниже (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-продуцент можно использовать различные способы, известные в данной области. Например, клетки, модифицированные с использованием различных способов редактирования генов (*например*, способы, использующие гомологичную рекомбинацию, систему, опосредованную транспозоном, систему loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN), входят в объем данного описания.

[343] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую каркасный фрагмент, раскрытый в данном документе, или его фрагмент или вариант. Дополнительная копия последовательности, кодирующей каркасный фрагмент, может быть введена для получения экзосомы, описанной в настоящем документе (*например*, имеющей более высокую плотность каркасного фрагмента или экспрессирующей несколько различных каркасных фрагментов на поверхности или на поверхности посвета ВВ, *например*, экзосомы). Экзогенные последовательности, кодирующие модификацию или фрагмент каркасного фрагмента, могут быть введены для получения экзосомы со сконструированным просветом и/или сконструированной поверхностью, содержащей модификацию или фрагмент каркасного фрагмента.

[344] В некоторых аспектах клетка-продуцент может быть модифицирована, *например*, трансфицирована одним или несколькими векторами, кодирующими один или несколько каркасных фрагментов, связанных с экзогенными биологически активными фрагментами, описанными в настоящем документе.

Способы получения ВВ с полезной нагрузкой

VIА. Способы нагрузки полезной нагрузки

[345] Полезные нагрузки, например, биологически активные фрагменты, например, агонисты STING, могут быть инкапсулированы в ВВ, *например*, экзосомы, с помощью любого подходящего способа, известного в данной области техники. Предполагается, что все известные способы нагрузки биомолекул в ВВ, *например*, экзосомы, считаются подходящими для использования в настоящем документе. Такие способы включают пассивную диффузию, электропорацию, химическую или полимерную трансфекцию, вирусную трансдукцию, механическое разрушение мембраны или механический сдвиг или любую их комбинацию. Полезные нагрузки, например, биологически активные фрагменты, например, агонисты STING, и ВВ, *например*, экзосомы, можно инкубировать

в соответствующем буфере во время инкапсуляции.

[346] В одном аспекте биологически активный фрагмент, например, агонист STING, инкапсулируется ВВ, *например*, экзосомой, путем пассивной диффузии. Биологически активный фрагмент, например, агонист STING, и ВВ, *например* экзосома, можно смешать вместе и инкубировать в течение периода времени, достаточного для диффузии биологически активного фрагмента, например, агониста STING, через липидный бислой везикул, тем самым становится инкапсулированным в ВВ, *например*, экзосоме. Биологически активный фрагмент, например, агонист STING, и ВВ, *например*, экзосому, можно инкубировать вместе в течение приблизительно от 1 до 30 часов, от 2 до 24 часов, от 4 до 18 часов, от 6 до 16 часов, от 8 до 14 часов, от 10 до 12 часов, от 6 до 12 часов, от 12 до 20 часов, от 14 до 18 часов или от 20 до 30 часов. Агонист STING и ВВ, *например*, экзосому, можно инкубировать вместе в течение приблизительно 2 часов, 4 часов, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа, 24 часа, 26 часов или 30 часов.

[347] Буферные условия раствора ВВ, *например*, экзосом, также можно изменить, чтобы увеличить или контролировать инкапсуляцию биологически активного фрагмента, например, агониста STING. В одном аспекте буфер может представлять собой фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с сахарозой. Также можно использовать дополнительные модификации буфера, такие как средства защиты от сдвига, модификаторы вязкости и/или растворенные вещества, влияющие на структурные свойства везикул. Наполнители, такие как материалы для смягчения мембран и агенты молекулярного краудинга, также могут быть добавлены для повышения эффективности инкапсуляции биологически активного фрагмента, например, агониста STING. Другие модификации буфера могут включать определенные диапазоны pH и/или концентрации солей, органических растворителей, низкомолекулярных веществ, детергентов, цвиттер-ионов, аминокислот, полимеров и/или любую комбинацию вышеперечисленного, включая множественные концентрации.

[348] Температура раствора ВВ, *например*, экзосом, и биологически активных фрагментов, например, агонистов STING, во время инкубации может быть изменена для увеличения или контроля инкапсуляции биологически активных фрагментов. Температура может быть комнатной. Температура может составлять от 15°C до 90°C, 15-30°C, 30-50°C, 50-90°C. В некоторых аспектах температура составляет около 15°C, 20°C, 35°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C или 90°C.

[349] Концентрация биологически активного фрагмента, например, агониста STING, во время инкубации биологически активного фрагмента с ВВ, *например*, экзосомами, также может быть изменена для увеличения или контроля инкапсуляции биологически активного фрагмента, например, агониста STING. Например, концентрация биологически активного фрагмента, например, агониста STING, может составлять по меньшей мере от 0,01 мМ до 100 мМ агониста STING. Концентрация биологически активного фрагмента, например, агониста STING, может составлять по меньшей мере 0,01-1 мМ, 1-10 мМ, 10-50 мМ или 50-100 мМ. Концентрация агониста может быть по

меньшей мере 0,01 мМ, 0,02 мМ, 0,03 мМ, 0,04 мМ, 0,05 мМ, 0,06 мМ, 0,07 мМ, 0,08 мМ, 0,09 мМ, 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ, 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ или 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация биологически активного фрагмента, например, агониста STING, составляет по меньшей мере около 1 мМ.

[350] В некоторых аспектах биологически активные фрагменты, например, агонисты STING, инкубируют в смеси при концентрации по меньшей мере около 500 мкМ, по меньшей мере около 600 мкМ, по меньшей мере около 700 мкМ, по меньшей мере около 800 мкМ, по меньшей мере около 900 мкМ, по меньшей мере около 1000 мкМ, по меньшей мере около 1100 мкМ, по меньшей мере около 1200 мкМ, по меньшей мере около 1300 мкМ, по меньшей мере около 1400 мкМ, по меньшей мере около 1500 мкМ, по меньшей мере около 1600 мкМ, по меньшей мере около 1700 мкМ, по меньшей мере около 1800 мкМ, по меньшей мере около 1900 мкМ или по меньшей мере около 2000 мкМ. В некоторых аспектах ЦДН инкубируют в смеси при концентрации по меньшей мере около 2500 мкМ, по меньшей мере около 2600 мкМ, по меньшей мере около 2700 мкМ, по меньшей мере около 2800 мкМ, по меньшей мере около 2900 мкМ, по меньшей мере около 3000 мкМ, по меньшей мере около 3100 мкМ, по меньшей мере около 3200 мкМ, по меньшей мере около 3300 мкМ, по меньшей мере около 3400 мкМ, по меньшей мере около 3500 мкМ, по меньшей мере около 3600 мкМ, по меньшей мере около 3700 мкМ, по меньшей мере около 3800 мкМ, по меньшей мере около 3900 мкМ или по меньшей мере около 3000 мкМ.

[351] В некоторых аспектах биологически активные фрагменты, например агонисты STING, инкубируют в смеси при концентрации от около 500 мкМ до около 100 мМ, от около 500 мкМ до около 90 мМ, от около 500 мкМ до около 80 мМ, от около 500 мкМ до около 70 мМ, от около 500 мкМ до около 60 мМ, от около 500 мкМ до около 50 мМ, от около 500 мкМ до около 40 мМ, от около 500 мкМ до около 30 мМ, от около 500 мкМ и около 20 мМ, от около 500 мкМ до около 10 мМ или от около 500 мкМ до около 1 мМ. В некоторых аспектах биологически активные фрагменты, например агонисты STING, инкубируют в смеси при концентрации от около 500 мкМ до около 10 мМ, от около 500 мкМ до около 9 мМ, от около 500 мкМ до около 8 мМ, от около 500 мкМ до около 7 мМ, от около 500 мкМ до около 6 мМ, от около 500 мкМ до около 5 мМ, от около 500 мкМ до около 4 мМ, от около 500 мкМ и около 3 мМ, от около 500 мкМ до около 2 мМ или от около 500 мкМ до около 1 мМ.

[352] Количество внеклеточных частиц, инкубируемых с биологически активными фрагментами, например, агонистами STING, также можно изменять для увеличения или контроля инкапсуляции биологически активных фрагментов, например, агонистов STING. Количество очищенных частиц ВВ, *например*, экзосом, может составлять от по меньшей мере около 10^6 до по меньшей мере около 10^{20} частиц очищенных везикул. Общее количество очищенных частиц может составлять около от 10^8 до 10^{18} , от 10^{10} до 10^{16} , от

10^8 до 10^{14} или от 10^{10} до 10^{12} частиц очищенных везикул. Общее количество очищенных частиц может составлять по меньшей мере около 10^6 , 10^8 , 10^{10} , 10^{12} , 10^{14} , 10^{16} , 10^{18} , или 10^{20} частиц очищенных везикул.

VIB. Способы очистки ВВ

[353] ВВ, *например*, экзосомы, полученные для настоящего изобретения, могут быть выделены из клеток-продуцентов. Предполагается, что все известные способы выделения ВВ, *например*, экзосомы, считаются подходящими для использования в настоящем документе. Например, для выделения ВВ, *например*, экзосом, из среды или другого исходного материала могут быть использованы их физические свойства, включая разделение на основе электрического заряда (*например*, электрофоретическое разделение), размера (*например*, фильтрация, молекулярное просеивание и т. п.), плотности (*например*, обычное или градиентное центрифугирование), постоянной Сведберга (*например*, осаждение с применением внешней силы или без нее и т. п.) Альтернативно или дополнительно выделение может быть основано на одном или нескольких биологических свойствах и включать способы, которые могут использовать поверхностные маркеры (*например*, для осаждения, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания лиганда, неспецифического связывания лиганда и т. д.). В еще дополнительных предполагаемых способах ВВ, *например*, экзосомы, также могут быть слиты с использованием химических и/или физических способов, включая слияние, индуцированное ПЭГ, и/или слияние под действием ультразвука.

[354] Перед составлением ВВ, *например*, экзосомы, также могут быть очищены после инкубации с биологически активными фрагментами, например, агонистами STING, для удаления свободных, неинкапсулированных биологически активных фрагментов, например, агонистов STING, из композиции. Все способы ранее описанных способов также считаются подходящими для использования в настоящем документе, включая разделение на основе физических или биологических свойств ВВ, *например*, экзосом.

[355] Выделение, очистку и обогащение можно проводить обычным и неселективным способом (обычно включая последовательное центрифугирование). В качестве альтернативы выделение, очистка и обогащение могут быть выполнены более специфичным и селективным образом (*например*, с использованием поверхностных маркеров, специфичных для клеток-продуцентов). Например, специфические поверхностные маркеры можно использовать для иммунопреципитации, FACS-сортировки, аффинной очистки, лигандов, связанных с гранулами, для магнитного разделения и т. д.

[356] В некоторых аспектах эксклюзионная хроматография может использоваться для выделения или очистки ВВ, *например*, экзосом. Способы эксклюзионной хроматографии известны в данной области техники. В настоящем документе представлены иллюстративные неограничивающие методики. В некоторых аспектах выделяют фракцию свободного объема, которая включает интересующие ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах, например, центрифугирование в градиенте плотности

можно использовать для дальнейшего выделения ВВ, *например*, экзосом. Кроме того, в некоторых аспектах может быть желательно дополнительно отделить ВВ, происходящие из клетки-продуцента, *например*, экзосомы, от ВВ другого происхождения. Например, ВВ, полученные из клеток-продуцентов, *например*, экзосомы, можно отделить от ВВ, полученных из клеток-непродуцентов, *например*, экзосом, путем иммуносорбентного захвата с использованием антигенного антитела, специфичного для клетки-продуцента.

[357] В некоторых аспектах выделение ВВ, *например*, экзосом, может включать эксклюзионную хроматографию или ионную хроматографию, такую как анионообменная, катионообменная или смешанная хроматография. В некоторых аспектах выделение ВВ, *например*, экзосом, может включать обессоление, диализ, фильтрацию с тангенциальным потоком, ультрафильтрацию или диафильтрацию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах выделение ВВ, *например*, экзосом, может включать комбинации способов, которые включают, помимо прочего, дифференциальное центрифугирование, мембранную фильтрацию по размеру, концентрирование и/или зональное центрифугирование. В некоторых аспектах выделение ВВ, *например*, экзосом, может включать одну или несколько стадий центрифугирования. Центрифугирование можно проводить при ускорении от 50 000 до 150 000 x g. Центрифугирование можно проводить примерно при 50 000 x g, 75 000 x g, 100 000 x g, 125 000 x g или 150 000 x g.

[358] ВВ, *например*, экзосомы, полученные для настоящего изобретения, могут быть выделены с помощью мультимодальной хроматографии. Способы по настоящему изобретению применимы для приготовления композиции, содержащей внеклеточные везикулы, связанные с биологически активными фрагментами, например, агонистами STING, например, одним или несколькими циклическими динуклеотидами (ЦДН, *например*, агонистами STING), включая инкубацию внеклеточных везикул с биологически активными фрагментами, например, агонистами STING, например, одним или более циклическими динуклеотидами (ЦДН) в смеси, и разделение внеклеточных везикул с использованием мультимодальной хроматографии.

[359] Мультимодальную хроматографию можно использовать для удаления свободных биологически активных фрагментов, например, агонистов STING, из препарата ВВ. Предполагается, что все известные способы выделения ВВ, *например*, экзосомы, считаются подходящими для использования в настоящем документе. Например, для выделения ВВ, *например*, экзосом, из среды или другого исходного материала могут быть использованы их физические свойства, включая разделение на основе электрического заряда (*например*, электрофоретическое разделение), размера (*например*, фильтрация, молекулярное просеивание и т. п.), плотности (*например*, обычное или градиентное центрифугирование), постоянной Сведберга (*например*, осаждение с применением внешней силы или без нее и т. п.) Альтернативно или дополнительно выделение может быть основано на одном или нескольких биологических свойствах и включать способы, которые могут использовать поверхностные маркеры (*например*, для осаждения, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания

лиганда, неспецифического связывания лиганда и т. д.). В еще дополнительных предполагаемых способах ВВ, *например*, экзосомы, также могут быть слиты с использованием химических и/или физических способов, включая слияние, индуцированное ПЭГ, и/или слияние под действием ультразвука. В некоторых аспектах мультимодальная колонка выбрана из группы, включающей CaptoCore 700, Capto MMC или Capto MMC ImpRes. В некоторых аспектах мультимодальная колонка представляет собой CaptoCore 700. В некоторых аспектах мультимодальная колонка представляет собой CaptoCore MMC. В некоторых аспектах мультимодальная колонка представляет собой Capto MMC ImpRes.

[360] Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

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

ПРИМЕРЫ

[362] Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами. Примеры представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем или содержание изобретения. В практике в настоящем изобретении будут использовать, если не указано иное, общепринятые методы химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, известные специалистам в данной области техники. Такие методы полностью 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: Оценка стабильности нативных экзосом и экзосом с белком X

[363] Оценивали стабильность нативных экзосом и экзосом, содержащих белок X, при различных значениях pH. Подход к оценке, выбранный для оценки стабильности, заключался в контроле размера и поверхностного заряда с помощью динамического светорассеяния и анализа дзета-потенциала.

Материалы

[364] Экзосомы нативных клеток эмбриональной почки человека (НЕК) были сконструированы и приготовлены примерно в количестве 5×10^{12} в сверхчистой воде MilliQ. Внеклеточные везикулы с белком X (CB-101) были сконструированы и приготовлены при концентрации приблизительно 5×10^{12} п/мл в забуференном фосфатом солевом растворе. Был приобретен забуференный фосфатом физиологический раствор Gibco с pH 7,2 без кальция или магния (PN 20012027, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Были приобретены стерильные микроцентрифужные пробирки (1,5 мл, низкое

удержание) (PN 3451, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Дополнительные материалы включали: лимонную кислоту (PN C2404, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), дигидрат цитрата натрия (PN BP327, Fisher Scientific Waltham, MA) и карбонатно-бикарбонатный буфер (PN C3041, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Фосфат

[365] Два твердых вещества (83,01 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2=41,51$ г и 12,29 г $\text{KH}_2\text{PO}_4/2=6,15$ г) добавляли в химический стакан и растворяли в 400 мл воды Milli-Q. При необходимости pH доводили до 7,4 с помощью 1M HCl или 1M NaOH. Раствор доводили до 500 мл в мерном цилиндре и фильтровали с использованием колбы с фильтром 0,2 мкм. В боксе биобезопасности раствор переносили в центрифужные пробирки объемом 50 мл и хранили при 4°C. KH_2PO_4 (кат. № 3248-01, партия № 0000163254) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (кат. № 3817-01, партия № 0000201905) были приобретены у JT Baker (Fisher Scientific Waltham, MA).

Динамическое рассеяние света (ДРС)

[366] ДРС использовали для измерения агрегации ВВ, т.е. ДРС представляет собой анализ, указывающий на стабильность. Каждый образец был подготовлен и испытан в соответствии со следующим методом.

[367] Образцы анализировали на приборе динамического рассеяния света (ДРС) Malvern Zetasizer Nano ZS, модель ZEN3600, серийный номер MAL1036117 (Malvern, Worcestershire, UK), и анализировали с помощью программного обеспечения Malvern Zetasizer версии 7.13 (Malvern Panalytical). Были приобретены микрокюветы Malvern для ДРС и набор крышек (PN ZEN0040) и кюветы с дзета-потенциалом (PN DTS1070) (Malvern, Worcestershire, UK). Экзосомы разбавляли от $1\text{E}11$ п/мл до $1\text{E}12$ п/мл в ФСБ Gibco 1X pH 7,2. Образцы измеряли с использованием кювет Malvern малого объема (PN ZEN0040) и уравнивали в течение 4 минут при 25 °C перед трехкратным измерением. Для каждого образца ВВ 20 мкл образца разводили в 180 мкл отфильтрованного ФСБ Gibco в микрокювете, смешивали повторным пипетированием и измеряли.

[368] В описанных в данном документе экспериментах использовали следующие стандарты размера полистирола NIST от Polysciences Inc.:

Стандарты размера полистирола NIST от Polysciences Inc.		
Кат. №	Арт. №	Размер (нм)
64005	704405	$51,7 \pm 0,7$
64010-15	A758988	$99,9 \pm 1,3$
64010-15	712842	$243,9 \pm 0,0$

Проверка внешнего вида

[369] Каждый образец проверяли на матово-белом и матово-черном фоне в течение не менее 5 секунд на каждой поверхности. Пробирку осторожно встряхивали вручную, чтобы взболтать возможный осадок, и проверяли на наличие видимых частиц с помощью светодиодного фонарика Maglite Mini и 5-кратного увеличительного стекла. pH измеряли с использованием водонепроницаемого карманного pH-тестера Oakton Cole-Parmer pH

Spear (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL).

Схема исследования

[370] В схеме исследования учитывали значения рН 3, 5, 7, 9 и 11. Измерения проводили сразу после корректировки рН. Концентрированные растворы нативных экзосом и экзосом белка X были приготовлены либо в воде MilliQ, либо в ФСБ, и разбавлены водой MilliQ с соответствующим буфером и/или доведены до правильного рН при температуре окружающей среды в лаборатории до начала исследования (ФИГ. 2D). Для кислых рН использовали цитратный буфер, для нейтральных рН использовали фосфатный буфер, а для основных рН использовали карбонатно-натриевый буфер. Целевая осмоляльность составляла 300 мОсм/кг. Для измерений ДРС и дзета использовали 20 мкл ВВ при концентрации от 1Е11 до 1Е12 п/мл. Полученные данные для нативных экзосом и экзосом с белком X представлены в таблицах 2, 3 и 4 ниже.

Таблица 3. Нативные экзосомы

Номер	Тип	Название образца	T	ZP	Подвижн.	Провод	рН	Среднее (мВ)	Станд. отклон. (мВ)
			°C	мВ	мкМсМ/ Вс	мСм/ см			
1	Дзета	рН 3,01 образец 1	25	9,05	0,7091	6,95	3,01	9,5	0,67
2	Дзета	рН 3,01 образец 2	25	10	0,7848	7,25			
3	Дзета	рН 4,95 образец 1	25	-16,5	-1,291	3,35	4,95	-17,5	1,41
4	Дзета	рН 4,95 образец 2	25	-18,5	-1,452	3,88			
7	Дзета	рН 7,07 образец 1	25	-31,8	-2,496	2,16	7,07	-32,7	1,27
8	Дзета	рН 7,07 образец 2	25	-33,6	-2,637	2,4			

9	Дзета	рН 8,94 образец 1 1	25	-23,1	-1,814	1,56	8,94	-26,6	4,88
10	Дзета	рН 8,94 образец 2	25	-30	-2,352	1,74			
11	Дзета	рН 11,21 образец 1 1	25	-5,92	-0,4641	3,71	11,21	-8,4	3,52
12	Дзета	рН 11,21 образец 2	25	-10,9	-0,8535	4,35			
13	Дзета	рН 3,01 образец 1 1	25	8,2	0,6428	6,69			
14	Дзета	рН 3,01 образец 2 2	25	9,07	0,7111	6,82			

Таблица 4. Экзосомы с белком X

Номер	Тип	Название образца	T	ZP	Подвижн.	Провод	рН	Среднее (мВ)	Станд. отклон. (мВ)
			°C	мВ	мкМсМ/Вс	мСм/см			
1	Дзета	рН 3,15 Образец с белком X 1 1	25	6,87	0,5386	11,2			
2	Дзета	рН 3,15 Образец с белком X 1 2	25	6,36	0,4988	11,6			
3	Дзета	рН 2,95 Образец с белком X	25	10,4	0,8167	8,39	2,95	10,1	0,45

		2 1							
4	Дзета	рН 2,95 Образец с белком X 2 2	25	9,76	0,765	8,57			
7	Дзета	рН 5,20 Образец с белком X 1 1	25	- 10,3	-0,8057	8,98	5,2	-10,8	0,64
8	Дзета	рН 5,20 Образец с белком X 1 2	25	- 11,2	-0,8793	9,41			
11	Дзета	рН 6,95 Образец с белком X 1 1	25	-13	-1,022	5,8	6,95	-13,8	1,06
12	Дзета	рН 6,95 Образец с белком X 1 2	25	- 14,5	-1,135	5,91			
15	Дзета	рН 9,51 Образец с белком X 1 1	25	- 11,3	-0,888	12,9	9,51	-12,3	1,41
16	Дзета	рН 9,51 Образец с белком X 1 2	25	- 13,3	-1,041	13,4			
19	Дзета	рН 11,08 Образец с белком X 1 1	25	- 15,9	-1,243	6,26	11,08	-17,0	1,56
20	Дзета	рН 11,08	25	-	-1,416	6,57			

		Образец с белком X 1 2		18,1					
33	Дзета	рН 6,01 Образец с белком X 1 1	25	- 13,1	-1,028	5,47	6,01	-13,7	0,78
34	Дзета	рН 6,01 Образец с белком X 1 2	25	- 14,2	-1,113	5,55			
39	Дзета	рН 6,38 Образец с белком X 1 1	25	- 13,4	-1,051	5,49	6,38	-14,3	1,20
40	Дзета	рН 6,38 Образец с белком X 1 2	25	- 15,1	-1,182	5,57			

[371] Эти данные были получены путем диализа солей с последующим диспергированием в соответствующем буфере при желаемом значении рН. Было замечено, что присутствие ФСБ защищает экзосомы от агрегации в более широком диапазоне рН. Результаты, показанные в приведенных выше таблицах, представлены на **ФИГ. 2А**.

Таблица 5. Среднее значение рН и дзета-потенциал нативных экзосом и экзосом с белком X

Нативные		Белок X		
рН	Дзета		рН	Дзета
3,01	9,5		2,95	10,1
4,95	-17,5		5,2	-10,8
7,07	-32,7		6,95	-13,8
8,94	-26,6		9,51	-12,3
11,21	-8,4		11,08	-17,0
			6,01	-13,7

			6,38	-14,3
--	--	--	------	-------

[372] Результаты, показанные в таблице 5, также представлены графически на **ФИГ. 1Б**.

Пример 2: Состав буфера А

[373] Экзосомальный буфер А для хранения и введения ВВ готовили, как описано ниже. ВВ, приготовленные для буфера А, сконструированы так, чтобы экспрессировать белок PTGFRN.

[374] Для регулирования рН готовили 50 мл 1N гидроксида натрия и 50 мл 1N соляной кислоты. Воду для инъекций (0,8 л) добавляли в химический стакан на 1 л с мешалкой. При перемешивании с помощью мешалки (без нагрева) добавляли следующие ингредиенты: (а) 50,00 г сахарозы, (b) 0,70 г фосфата калия, одноосновного, (с) 4,00 г фосфата натрия, двухосновного, 7-гидрата и (d) 2,90 г хлорида натрия. рН не регулировали до тех пор, пока весь порошок не растворялся. Если порошок не растворялся, скорость перемешивания увеличивали. Затем рН доводили до 7,1-7,3. Если рН был > 7,3, для регулирования использовали 1N соляную кислоту. Если рН был < 7,1, для регулирования использовали 1N раствор гидроксида натрия. Раствор заливали в градуированный цилиндр объемом 1 л. Добавляли воду для инъекций, чтобы довести общий объем до 1 л. Записывали рН и проводимость. Целевой рН было между 7,1 и 7,3. Целевая проводимость составляет от 6,5 +/- 10% до 8,0 +/- 10% мСм/см. Затем раствор стерилизовали фильтрованием через 0,2-мкм фильтр для бутылок (кат. № 567-0020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Окончательный состав буфера А представлен в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Состав буфера А

Буфер А		
Плотность: 1,02 кг/л		
Описание	Концентрация г/л	Концентрация ммоль
Сахароза	50 г/л	146,07
Фосфат калия, одноосновный	0,70 г/л	5,14
Фосфат натрия, двухосновный, 7-гидрат	4,00 г/л	14,92
Хлорид натрия	2,90 г/л	49,62
ВДИ	По необходимости	

Пример 3: Состав буфера В

[375] Экзосомальный буфер В для хранения и введения ВВ готовили, как описано ниже. ВВ, приготовленные для буфера В, сконструированы так, чтобы экспрессировать белок PTGFRN и дополнительно содержать CL656.

[376] Для регулирования pH готовили 50 мл 1N гидроксида натрия и 50 мл 1N соляной кислоты. Воду для инъекций (0,8 л) добавляли в химический стакан на 1 л с мешалкой. При перемешивании с помощью мешалки (без нагрева) добавляли следующие ингредиенты: (а) 50,00 г сахарозы, (b) 2,10 г фосфата калия, одноосновного, (с) 7,26 г фосфата натрия, двухосновного, 7-гидрата и (d) 2,34 г хлорида натрия. pH не регулировали до тех пор, пока весь порошок не растворялся. Если порошок не растворялся, скорость перемешивания увеличивали. Затем pH доводили до 7,1-7,3. Если pH был > 7,3, для регулирования использовали 1N соляную кислоту. Если pH был < 7,1, для регулирования использовали 1N раствор гидроксида натрия. Раствор заливали в градуированный цилиндр объемом 1 л. Добавляли воду для инъекций, чтобы довести общий объем до 1 л. Записывали pH и проводимость. Целевой pH было между 7,1 и 7,3. Целевая проводимость составляет от 6,5 до 8,0 мСм/см. Затем раствор стерилизовали фильтрованием через 0,2-мкм фильтр для бутылок (кат. № 567-0020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Окончательный состав буфера В представлен в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Состав буфера В

Буфер В		
Плотность: 1,02 кг/л		
Описание	Концентрация г/л	Концентрация ммоль
Сахароза	50 г/л	146,07
Фосфат калия, одноосновный	2,10 г/л	15,44
Фосфат натрия, двухосновный, 7-гидрат	7,26 г/л	27,08
Хлорид натрия	2,34 г/л	40,04
ВДИ	По необходимости	

Пример 4: Состав буфера С

[377] Экзосомальный буфер С был приготовлен в соответствии с формулой, представленной в таблице 8 ниже. ВВ были сконструированы для экспрессии белка PTGFRN, слитого с PL-12.

Таблица 8. Состав буфера С

	Реагент	FW	Моль/л	г/л
0,032 М двухосновного фосфата натрия, 0,011 М одноосновного фосфата калия, 0,04 М	Фосфат натрия двухосновный гептагидрат	268,07	0,0317	8,50
	Фосфат калия одноосновный	136,09	0,0110	1,50
	Хлорид натрия	58,44	0,040	2,34
	Сахароза	342,3	0,146	50

хлорида натрия, 0,146 М сахарозы, рН 7,2	Плотность= 1,022 г/мл	рН=7,2±0,2	Проводимость= 8,7 ± 0,9 мСм/см
---	-----------------------	------------	-----------------------------------

Пример 5: Распространение концентрации агониста STING в экзосомах и супернатантах с течением времени

[378] Распространение биологически активных фрагментов, то есть агонистов STING, в экзосомах и супернатантах исследовали в исследовании уравнивания.

[379] Присутствия в экзосомах, биологически активные фрагменты (**ФИГ. 1А**), например, агонисты STING, могут со временем пассивно диффундировать из экзосом в супернатант (**ФИГ. 4А-4С**). Распределение агониста STING в экзосомах и супернатантах определяли путем расчета концентрации агониста STING с течением времени. Вкратце, экзосомы нагружали агонистами STING и хранили в буфере В. Содержащие экзосомы жидкие буферные составы либо замораживали при -80 °С, полужамораживали при 4 °С, либо хранили при 22 °С в течение 72 часов. После 12 часов хранения в буфере В при описанных температурах рассчитывали концентрацию агонистов STING в экзосомах и сравнивали с концентрацией агониста STING в супернатантах. Результаты показаны на **ФИГ. 3А** и **3В**. Как показано, при хранении при -80 °С в течение 72 часов конечная концентрация агониста STING в экзосомах составляла около 5 мкМ, а конечная концентрация агониста STING в супернатанте составляла около 4,3 мкМ. При хранении при 4 °С в течение 72 часов конечная концентрация агониста STING в экзосомах составляла около 4,5 мкМ, а конечная концентрация агониста STING в супернатанте составляла около 4,4 мкМ. При хранении при 22 °С в течение 72 часов конечная концентрация агониста STING в экзосомах составляла около 4,1 мкМ, а конечная концентрация агониста STING в супернатанте составляла около 6,5 мкМ. Данные, графически представленные на **ФИГ. 3А** и **3В**, представлены в таблицах 9, 10 и 11 ниже.

[380] Этот пример демонстрирует, что температура хранения не оказывает значительного влияния на концентрацию агониста STING в экзосомах по сравнению с концентрацией агониста STING в супернатантах.

Таблица 9. Данные исследования равновесия

№ образца	Тип образца	Контрольный момент времени (ч)	Концентрация (мкМ)
1	Осадок экзосом	0	6,35
2	Осадок экзосом	0	6,29
3	Осадок экзосом	0,5	5,56
4	Осадок экзосом	0,5	5,80
5	Осадок экзосом	1	5,44
6	Осадок экзосом	1	5,63
7	Осадок экзосом	2	5,44
8	Осадок экзосом	2	4,98

9	Осадок экзосом	3	5,87
10	Осадок экзосом	3	6,02
11	Осадок экзосом	4	4,99
12	Осадок экзосом	4	5,09
13	Осадок экзосом	8	5,29
14	Осадок экзосом	8	5,18
15	Осадок экзосом	12	4,87
16	Осадок экзосом	12	5,45
17	Супернатант	0	1,23
18	Супернатант	0	1,21
19	Супернатант	0,5	2,08
20	Супернатант	0,5	1,62
21	Супернатант	1	1,69
22	Супернатант	1	2,76
23	Супернатант	2	3,19
24	Супернатант	2	3,38
25	Супернатант	3	3,40
26	Супернатант	3	3,63
27	Супернатант	4	4,05
28	Супернатант	4	4,19
29	Супернатант	8	4,03
30	Супернатант	8	4,00
31	Супернатант	12	4,44
32	Супернатант	12	4,23

Таблица 10. Данные исследования равновесия - осадок экзосом

Осадки экзосом		
Контрольный момент времени	Концентрация (мкМ)	Погрешность (мкМ)
0	6,32	0,04
0,5	5,68	0,17
1	5,53	0,13
2	5,21	0,32
3	5,94	0,11
4	5,04	0,07

8	5,24	0,08
12	5,16	0,41

Таблица 11. Данные исследования равновесия - супернатанты

Супернатанты		
Контрольный момент времени	Концентрация (мкМ)	Погрешность (мкМ)
0	1,22	0,01
0,5	1,85	0,32
1	2,22	0,76
2	3,28	0,13
3	3,51	0,16
4	4,12	0,10
8	4,01	0,02
12	4,34	0,15

Пример 6: Влияние агониста STING в буфере В на экспрессию генов

[381] Исследовали влияние введения экзосом, содержащих агонист STING CL656, на экспрессию генов в печени C57BL/6.

[382] После размораживания экзосомы в буфере В, композицию, содержащую агонист STING CL656, хранили при 4°C и 22°C в течение 24 ч или 72 ч, как описано в примере 5. ФСБ, CL656 (20 мкг), экзосомы или экзосомы в буфере В, содержащем агонист STING CL656, который инкубировали, как описано выше (600 нг CL656 на мышь), вводили мышам C57BL/6 внутривенно. В качестве контроля вводили экзосомы в составе буфера В, содержащие агонист STING CL656, которые хранили при -80 °C (6 нг, 60 нг и 600 нг на мышь) (рассматривали как 0 ч). Через 4 часа мышей подвергали эвтаназии и собирали печень. Общую РНК выделяли из печени с использованием набора RNeasy Lipid Mini Kit (Qiagen) и определяли уровень экспрессии мРНК ИФН β с помощью ОТ-кПЦР. Относительную экспрессию нормализовали относительно конститутивного гена RPS13. На **ФИГ. 3** показаны результаты исследования печени. Как показано, 1) дозозависимая индукция мРНК ИФН β наблюдалась в 0-часовых образцах, 2) уровень мРНК ИФН β был одинаковым во всех экзосомах в составе буфера В, содержащем агонист STING CL656 (600 нг на инъекцию мыши) при любых условиях хранения, 3) экзосомы без агониста STING не индуцировали мРНК ИФН β , а CL656 (20 мкг) индуцировал низкий уровень мРНК ИФН β .

[383] Эти результаты демонстрируют, что введение агониста STING, содержащегося в буфере В, который был заморожен, разморожен и введен субъектам, эффективно индуцирует экспрессию гена ИФН β в ткани печени без каких-либо существенных различий.

Пример 7: Влияние агониста STING и агониста STING, инкапсулированного в

экзосомы, на внутриопухолевую концентрацию

[384] Исследовали внутриопухолевую концентрацию агониста STING в буфере В с течением времени.

[385] Вкратце, клетки меланомы B16-F10 подкожно трансплантировали мышам C57BL/6. Когда кожные опухоли были видны, каждое животное получало внутриопухолевую дозу либо свободного агониста STING (0,3 μ г CL656), либо агониста STING, инкапсулированного в экзосомы (0,3 μ г CL656). Внутриопухолевая концентрация свободного агониста STING и инкапсулированного в экзосомы агониста STING измерялась через 5, 30, 120, 360, 1440 и 2880 минут после инъекции. Результаты показаны на **ФИГ. 3D**. Как показано, внутриопухолевая концентрация свободного агониста STING значительно снизилась после введения (пунктирная линия) и не определялась примерно через 360 минут. Далее показано на **ФИГ. 3D**, концентрация агониста STING, инкапсулированного в экзосомы, медленно падала примерно до 100 нМ через 1440 минут. После этого концентрация агониста STING, инкапсулированного в экзосому, оставалась стабильной на уровне около 100 нМ до тех пор, пока не было проведено последнее измерение через 2880 минут.

[386] Этот пример демонстрирует, что введение композиции, содержащей инкапсулированный в экзосому агонист STING, по сравнению со свободным агонистом STING, оказывает стабилизирующее действие на внутриопухолевую концентрацию агониста STING.

Пример 8: Примерная разработка состава композиции 02

[387] Обзор разработки состава

[388] Разработка состава лекарственного препарата композиции 02 (С-02) экзосомы, нагруженной агонистом STING (экзоSTING), происходила одновременно с разработкой состава промежуточного соединения-1, содержащего очищенные экзосомы. Целью параллельной разработки состава было: а) признание того, что стабильность очищенного активного ингредиента экзосомы в лекарственном препарате, вероятно, будет способствовать выбору стабилизирующих вспомогательных веществ в отличие от стабильности активного ингредиента агониста, и б) наличие очищенного состава экзосом, такого же, как у лекарственного препарата С-02, позволит упростить производство, поскольку эти эксципиенты будут включены в лекарственный препарат. Методы испытаний, использованные для исследований, были похожи, хотя и не идентичны методам теста на высвобождение. Окончательные квалифицированные методы испытаний были использованы для исследования стабильности конечного состава в стрессовых условиях. Исследования проводили с лекарственным препаратом С-02 (содержащим промежуточное соединение-1 и промежуточное соединение-02), если не указано иное.

[389] Было проведено начальное исследование лекарственного препарата в стрессовых условиях, которое включало условия механического, окислительного стресса и стресса рН. Исследование проводили с использованием буфера на основе 15 мМ одноосновного фосфата калия, 27 мМ двухосновного фосфата натрия, 100 мМ хлорида

натрия, 5% сахарозы (масс./об.), рН 7,2. Исследование продемонстрировало приемлемую стабильность состава лекарственного препарата при любом механическом стрессе, кроме экстремального, таком как интенсивное перемешивание. Данные показали, что составы ФСБ, содержащие 5% (масс./об.) сахарозы, обеспечивают защиту от стрессовых условий.

[390] Исследование широкого диапазона рН (рН от 3,0 до 11,0), проведенное в различных буферах с использованием промежуточного соединения-01, определило диапазон рН от 6,5 до 9,0 как приемлемый (методом динамического светорассеяния (ДСР)) и подтвердило пригодность фосфатного буфера. Исследование стабильности промежуточного соединения-01 в течение 9 месяцев с использованием ДРС, а также дополнительные аналитические оценки подтвердили стабильность при -80°C в ФСБ, содержащем 5% (масс./об.) сахарозы.

[391] Окончательный состав композиции лекарственного препарата как промежуточного соединения-01, так и лекарственного препарата С-02 был модифицирован для достижения тоничности, подходящей для парентерального введения. Из-за желаемых уровней сахарозы и целевой тоничности концентрация хлорида натрия в составе ФСБ была снижена. Для улучшения буферной емкости состава была увеличена концентрация фосфата в ФСБ. Кроме того, вместо одного фосфата натрия была выбрана смесь натрий- и калий-фосфатного буфера.

[392] Выбранный состав композиции представлял собой 15 мМ одноосновного фосфата калия, 27 мМ двухосновного фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, 5% (масс./об.) сахарозы, рН 7,2. Этот состав используется для промежуточного соединения-01, лекарственного препарата С-02 и разбавителя FB-01 для С-02. Конечный состав буфера обозначается как состав буфера 01 (FB-01).

[393] Оценка стабильности лекарственного препарата С-02 в конечном составе показывает, что лекарственный препарат устойчив к циклическому замораживанию-размораживанию и механической инверсии. Деградация происходит только в условиях экстремального стресса.

[394] Оценка криопротекторов на устойчивость к замораживанию-размораживанию лекарственного препарата

[395] Криопротекторы, включая сахарозу, трегалозу и D-сорбит, оценивали в различных концентрациях в экспериментальной партии лекарственного препарата, приготовленной в буфере на основе 310 мМ двухосновном фосфате натрия, 90 мМ одноосновном фосфате калия, рН 7,4. В этом исследовании использовали экспериментальную партию экзосом, сверхэкспрессирующих PTGFRN, и циклический динуклеотидный агонист STING. Криопротекторы оценивали в концентрациях 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10,0% (масс./об.). Теоретическая осмоляльность для всех составов сахарозы и трегалозы в фосфатном буфере была рассчитана примерно как 300 мОсм/кг. Для составов с D-сорбитом осмоляльность составов от 1% до 5% (масс./об.) также составляла примерно 300 мОсм/кг, в то время как для составов с 7,5 и 10,0% D-сорбита осмоляльность была рассчитана примерно как 400 и 600 мОсм/кг, соответственно. Все составы оценивали

после 0, 3 и 10 циклов замораживания-размораживания по внешнему виду и размеру с помощью динамического светорассеяния (ДРС).

[396] Результаты проверки внешнего вида для двух контролей (только ФСБ или вода) показали более существенные изменения внешнего вида, связанные с увеличением количества циклов замораживания-размораживания, по сравнению с составами, содержащими криопротекторы. Изменения включали увеличение мутности и цвета (ФСБ) или видимых частиц с осаждением (вода). Как сахароза, так и D-сорбит показали приемлемые результаты внешнего вида при нескольких концентрациях. Для предотвращения изменений внешнего вида требовались более высокие концентрации трегалозы по сравнению с сахарозой или D-сорбитом.

[397] Результаты тестирования ДРС показали, что увеличение размера и полидисперсности для контрольных составов (только ФСБ, только вода) наблюдалось после нескольких циклов замораживания-размораживания. В целом не наблюдалось значительных изменений в размере или полидисперсности после 3 и 10 замораживаний-размораживаний при использовании более высоких концентраций криопротектора ($\geq 2,5\%$ (масс./об.)).

[398] Судя по внешнему виду и результатам ДРС в этом исследовании замораживания-размораживания, и сахароза, и D-сорбит являются приемлемыми криопротекторами, если они присутствуют в количестве $\geq 2,5\%$ (масс./об.). 5% (масс./об.) сахарозы обеспечивало достаточную криозащиту и было выбрано для будущих исследований состава, в том числе в первоначальных исследованиях стресса, описанных ниже.

[399] Исследования стресса в фосфатно-солевом буфере с сахарозой - первоначальное исследование

[400] Исследования стресса проводили с использованием выбранного криопротектора (5% (масс./об.) сахарозы) и фосфатного буфера, содержащего хлорид натрия, для подтверждения стабильности в различных условиях механического стресса и после окисления. Состав для этих исследований представлял собой 43 мМ фосфатный буфер, 100 мМ хлорида натрия, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,2.

[401] Для исследования механического стресса образцы оценивали при температуре окружающей среды с использованием различных уровней механического стресса (встряхивание, перемешивание) в течение разной продолжительности. Образцы оценивали по внешнему виду, pH, осмоляльности, ДРС и анализу отслеживания наночастиц (NTA). Размер и индекс полидисперсности не изменились ни в одном из тестируемых условий по сравнению с контролем (без перемешивания). Только энергичное ручное перемешивание приводило к изменениям внешнего вида в тесте; в этом случае наблюдалось пенообразование. Приемлемая стабильность состава лекарственного препарата наблюдалась во всех условиях, кроме экстремального механического стресса, такого как сильное перемешивание. Также наблюдалась стабильность состава после многократного плавного переворачивания. pH и осмоляльность испытуемых образцов

оставались постоянными.

[402] Влияние окислительного стресса на лекарственный препарат оценивали путем обработки образцов перекисью водорода различной концентрации при 37°C в течение 4 часов. После обработки образцы гасили 100 мМ аскорбата натрия и выдерживали при температуре окружающей среды в течение 1 часа для нейтрализации перекиси водорода перед тестированием. В этом исследовании использовали промежуточное соединение-01, нагруженное агонистом STING. Образцы анализировали по внешнему виду, ДРС, NTA и активности *in vivo*.

[403] Лекарственный продукт стабилен и полностью эффективен при воздействии окислительного стресса в условиях, протестированных с помощью ограниченного набора анализов. Не наблюдалось существенных изменений внешнего вида, размера или концентрации экзосом при воздействии различных концентраций перекиси водорода и по сравнению с контролем (без обработки перекисью водорода). Качественно, по нормализованной экспрессии генов не наблюдалось существенных различий в активности в селезенке. Хотя наблюдалась тенденция к снижению активности в отношении печени при увеличении концентрации перекиси водорода в тесте, также наблюдалась существенная потеря активности в группе только с аскорбиновой кислотой, наряду с относительно широким диапазоном результатов активности между группами и внутри групп. Таким образом, активность в отношении печени также была одинаковой между испытуемой и контрольной группами, за исключением контрольной группы (ФСБ). Данные свидетельствуют о том, что лекарственный препарат не чувствителен к низким уровням окислительного стресса с помощью используемых методов испытаний.

[404] Последующее исследование стресса было разработано для дальнейшего подтверждения стабильности лекарственного продукта С-02 в выбранном конечном составе. Кроме того, было проведено ускоренное исследование условий для лекарственного продукта С-02 в окончательном составе (данные не показаны).

[405] Исследование выбора рН/промежуточного соединения-01

[406] Выбор целевого значения рН и диапазона для лекарственного препарата был сосредоточен на обеспечении стабильности экзосом в составе, поэтому исследование было проведено с использованием промежуточного соединения-01. В исследовании оценивали стабильность при значениях рН 3, 5, 6, 6,5, 7, 9 и 11. Буфер лимонная кислота/дигидрат цитрата натрия использовали для достижения значений рН 3 и 5. Одноосновный фосфат калия/гептагидрат двухосновного фосфата натрия использовали для значений рН 6, 6,5 и 7, а карбонатный буфер использовали для значений рН 9 и 11. Образцы анализировали с помощью ДРС на предмет изменения размера или распределения по размерам, а также ζ -потенциала поверхностного заряда. Хотя сочетание этих ограниченных данных поддерживает диапазон рН от 6,5 до 9,0, на практике для состава был выбран более узкий диапазон ($\pm 0,5$) около целевого значения рН 7,2. На основании полученных результатов было выбрано целевое значение рН 7,2, исходя из приемлемых результатов ДРС и ожидаемой буферной емкости фосфатного буфера.

[407] Состав промежуточного соединения-01 и лекарственного препарата С-02

[408] Данные исследования рН промежуточного соединения-01 подтверждают выбор состава ФСБ для промежуточного соединения-01. Исследование криопротектора для лекарственного препарата выявило 5% (масс./об.) сахарозы в составе. Аналогичное исследование для промежуточного соединения-01 также определило 5% (масс./об.) сахарозы в качестве желаемого криопротектора (данные не показаны). Состав композиции как для промежуточного соединения-01, так и для лекарственного препарата также поддерживает тоничность, близкую к физиологическим жидкостям (приблизительно 300 мОсм/кг). Из-за желаемых уровней сахарозы и целевой тоничности концентрация соли в составе ФСБ была снижена. Для улучшения буферной емкости состава была увеличена концентрация фосфата в ФСБ. Кроме того, была выбрана смесь натрий- и калий-фосфатного буфера.

[409] На основании этих соображений одна композиция препарата, выбранная для лекарственного продукта С-02, представляла собой 15 мМ одноосновного фосфата калия, 27 мМ двухосновного фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, 5% масс./об. сахарозы, рН 7,2. Состав используется для промежуточного соединения-01, лекарственного препарата С-02 и разбавителя FB-01 для лекарственного препарата С-02. Состав буфера обозначается как FB-01.

[410] Исследование стабильности промежуточного соединения-01

[411] Было проведено исследование стабильности, чтобы подтвердить стабильность промежуточного соединения-01 при длительном хранении при -80°C в FB-01.

[412] Исследование стресса для окончательного состава лекарственного препарата - последующее исследование

[413] Последующее исследование стресса было проведено для окончательного состава композиции для подтверждения стабильности лекарственного продукта С-02 в различных условиях механического стресса и после окисления. Это исследование проводилось с использованием лекарственного препарата С-02 в окончательном составе FB-01 и проводилось с использованием дополнительных аналитических методов по сравнению с первоначальным исследованием стресса.

[414] Исследование включало контроль выдерживания (при 25°C до 24 часов), многократные циклы замораживания-размораживания (до 10 циклов с замораживанием до -80°C и размораживанием при температуре окружающей среды), экстремальные значения рН (рН 5 и 9), окислительный стресс (воздействие 3% перекиси водорода до 24 часов) и механическое воздействие с использованием механического переворачивания до 24 часов.

[415] Результаты циклов замораживания-размораживания не показывают изменений качественных характеристик продукта в течение 10 циклов замораживания-размораживания.

Пример 9: Примерная разработка состава композиции 03

[416] Композиция 03 (С-03) лекарственного продукта с экзосомами, нагруженными

IL-12 (экзоIL-12), состоит из активного лекарственного вещества, экзоIL-12, в составе буфера, состоящем из 5 мМ одноосновного фосфата калия, 15 мМ двухосновного фосфата натрия, 50 мМ хлорида натрия, 146 мМ сахарозы, pH 7,2.

[417] При разработке состава С-03 руководствовались несколькими принципами: состав лекарственного препарата предназначен для использования в виде раствора для инъекций; и что состав оптимизирован для хранения в замороженном состоянии, чтобы свести к минимуму деградацию при операциях замораживания/размораживания. Во время исследований по разработке состава первоначальное аналитическое тестирование было сосредоточено на стабильности экзосом в растворе и активности. Эти анализы включали внешний вид, динамическое светорассеяние (ДСР), AlphaLISA IL-12 и репортерный анализ на основе клеток эмбриональной почки человека (НЕК).

[418] После очистки состав экзо-IL-12 представляет собой полупрозрачный раствор без видимых частиц. Цвет определяли путем сравнения образцов экзосом со стандартами цвета Европейской фармакопеи в стеклянных ампулах. Было обнаружено, что экзосомы экзоIL-12 имеют диаметр приблизительно 171 нм со значением PDI <0,25.

[419] Исследования буфера и криопротектора для С-03 привели к выбору натрий-калий-фосфатного буфера с 146 мМ (5% масс./об.) сахарозы при pH 7,2 для лекарственной субстанции СВ-102 и состава лекарственного препарата С-03 для оптимизации качества и стабильности. Было проведено исследование принудительной деградации, чтобы получить информацию о потенциальных анализах, указывающих на стабильность.

[420] Выбор буфера

[421] Исследование стабильности pH проводили при повышенных температурах (37°C и 50°C) с различными буферами при pH 3, 5, 7 и 9.

[422] Буфер-102 первоначально был заменен на воду MilliQ и доведен до желаемого pH путем добавления концентрированных исходных растворов соответствующего буфера. После корректировки pH образцы анализировали по внешнему виду, динамическому светорассеянию (ДСР) на предмет изменения размера и распределения по размерам и анализу AlphaLISA IL-12 для количественного определения свободного и общего (свободного и связанного с экзосомами) содержания IL-12.

[423] Выбор криопротектора

[424] Исследование проводили с использованием экзоIL-12 в фосфатном буфере с добавлением и без добавления 146 мМ (5% масс./об.) сахарозы, подвергнутых повторным циклам замораживания и размораживания (З/Р). Концентрацию криопротектора подбирали для достижения физиологической осмоляльности (приблизительно 290 мОсм/кг) при достаточной фосфатной буферной емкости (концентрации). ЭкзоIL-12 только в воде milliQ (MQ) и только в ФСБ готовили в качестве контрольных образцов и подвергали 3-м циклам замораживания/размораживания (З/Р). ЭкзоIL-12 в фосфатном буфере (выбранном из исследования выбора буфера) с 146 мМ сахарозы оценивали при 0, 1, 3 и 10 З/Р. Собранные образцы оценивали по внешнему виду, ДСР и методам тестирования AlphaLISA IL-12.

[425] Тестовые образцы, содержащие сахарозу, оставались стабильными в отношении размера по данным ДРС в течение 10 циклов З/Р с размером приблизительно 180 нм. Точно так же распределение или индекс полидисперсности (PDI) оставался неизменно низким на уровне 0,15 до 3-х циклов З/Р, а после 10-и циклов З/Р увеличивался до 0,2. Изменения цвета или повышения мутности не наблюдалось. Контрольные экзосомы, диспергированные либо в воде milliQ, либо в ФСБ и подвергнутые 3-м циклам З/Р, демонстрировали явные признаки агрегации и деградации. Контрольные образцы в milliQ становились мутными и приобретали слегка красноватый/оранжевый цвет, а размер >800 нм по данным ДРС четко указывал на агрегацию. Размер экзосом только в ФСБ был немного больше, чем у испытуемых образцов, и составлял 187 нм, а PDI был аналогичен таковому у образцов 10-ти З/Р испытуемых групп, содержащих сахарозу. Экзосомы только в ФСБ показали заметное изменение мутности по внешнему виду, указывающее на агрегацию, но без изменения цвета.

[426] Результаты AlphaLISA IL-12 показывают, что как связанный, так и свободный IL-12 остаются одинаковыми при приблизительно 2300 нг/мл и 1-3% IL-12 соответственно после 10-ти З/Р в присутствии сахарозы. Заметное снижение связанного IL-12 наблюдали как для экзосом только в milliQ, так и для экзосом только в ФСБ: снижение на 24% и 37%, соответственно. Количество свободного IL-12 немного увеличилось до 5% и 4%, соответственно.

[427] Осмоляльность конечной композиции фосфатно-сахарозного буфера составляет около 300 мОсм/кг.

[428] Исследование принудительной деградации

Исследование принудительной деградации было проведено в соответствии с ICH Q1A(R2) для оценки стабильности лекарственного препарата в стрессовых условиях замораживания-размораживания, экстремальных значений pH, окисления и механического стресса.

[429] Результаты исследования замораживания и размораживания в целом не показали значительных тенденций в течение десяти циклов З/Р. Хотя наблюдаемые размеры экзосом и значения PDI были самыми большими после 10-ти З/Р, абсолютные различия были недостаточно значительными, чтобы указывать на истинное влияние на стабильность экзосом. Кроме того, другие результаты испытаний не показали значительных тенденций до 10-ти З/Р. Консервативно подтверждена стабильность С-03 в течение пяти циклов замораживания и размораживания.

Пример 10: Примерная разработка состава композиции 04

[430] Будет разработан состав лекарственного препарата для экзосом, нагруженных антисмысловыми олигомерами. В качестве отправной точки будет использоваться лекарственный препарат С-03. Концентрация фосфатного буфера (5 мМ одноосновного фосфата калия и 15 мМ двухосновного фосфата натрия) и pH (pH 7,2) останутся неизменными по сравнению с лекарственным препаратом С-03. Концентрации хлорида натрия будут протестированы в диапазоне концентраций от около 50 мМ до около 150

мМ, а концентрации сахарозы будут протестированы в диапазоне концентраций от около 2,5% до 5% (от около 73 мМ до около 146 мМ). Условия будут отслеживаться в соответствии со способами, описанными в примерах 9 и 10 выше. Будут проанализированы различные конструкции экзосом, нагруженные АСО, включая экзосомы, нагруженные АСО, нацеленными на STAT6, как описано в настоящем документе. В водном трис-ЭДТА-буфере или чистой воде АСО диссоциирует из экзосом, и, таким образом, комбинация хлорида натрия и сахарозы, вероятно, играет роль в удержании нагруженного АСО.

[431] 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.

[432] 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.

[433] 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.

[434] 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.

[435] Формула настоящей заявки отличается от формулы родительской заявки или других связанных заявок. Таким образом, заявитель отрицает любой отказ от объема притязаний, сделанный в родительской заявке или любой предшествующей заявке в отношении настоящей заявки. Поэтому эксперту рекомендуется пересмотреть любой

такой предыдущий отказ и процитированные ссылки, для избегание которых он был сделан. Кроме того, эксперту также напоминают, что любой отказ, сделанный в данной заявке, не должен быть прочитан в отношении родительской заявке или против нее.

[436] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в данной заявке, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения путем ссылки для всех целей.

[437] Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные аспекты, приведенное выше описание не является ограничивающим. Следует принять во внимание, что различные изменения могут быть внесены без отхода от сущности и объема настоящего изобретения(ий).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая
внеклеточную везикулу;
сахарид;
хлорид натрия;
фосфат калия; и
фосфат натрия,
при этом композиция находится в растворе при рН около 7,2.
2. Композиция по п. 1, в которой внеклеточная везикула представляет собой экзосому.
3. Композиция по п. 1 или п. 2, причем композиция может храниться в течение по меньшей мере около 4 часов, по меньшей мере около 5 часов, по меньшей мере около 6 часов, по меньшей мере около 7 часов, по меньшей мере около 8 часов, по меньшей мере около 9 часов, по меньшей мере около 10 часов, по меньшей мере около 11 часов, по меньшей мере около 12 часов, по меньшей мере около 15 часов, по меньшей мере около 20 часов, по меньшей мере около 24 часов, по меньшей мере около 2 дней, по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 4 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 6 дней или по меньшей мере около 7 дней при температуре 4°C.
4. Композиция по любому из пп. 1-3, причем композицию можно замораживать и размораживать, при этом размороженная композиция имеет рН около 7,2.
5. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция имеет рН 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 или 7,4.
6. Композиция по любому из пп. 1-5, причем композиция имеет рН 7,2.
7. Композиция по любому из пп. 1-6, у которой рI находится в диапазоне от около 1 до около 6,5.
8. Композиция по любому из пп. 1-7, причем композиция имеет (i) уменьшенное количество агрегатов, (ii) улучшенную стабильность ВВ, (iii) улучшенную целостность структуры ВВ и (iv) улучшенную стабильность сконструированных белков, содержащихся на или в ВВ.
9. Композиция по любому из пп. 1-8, в которой сахарид содержит моносахарид, дисахарид, трисахарид, олигосахарид, полисахарид, сахарный спирт или любую их комбинацию.
10. Композиция по любому из пп. 1-9, в которой сахарид имеет молекулярную массу от около 180,00 г/моль до около 380,00 г/моль.
11. Композиция по любому из пп. 1-10, в которой сахарид содержит лактозу, глюкозу, сахарозу, трегалозу и/или их комбинации.
12. Композиция по любому из пп. 1-11, в которой сахарид представляет собой сахарный спирт с молекулярной массой от около 90,00 г/моль до около 190,00 г/моль.
13. Композиция по любому из пп. 9-12, в которой сахарный спирт содержит глицерин, сорбит, маннит, ксилит и/или их комбинации.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, в которой сахарид представляет собой сахарозу или трегалозу.

15. Композиция по любому из пп. 1-14, в которой сахарид присутствует в композиции в концентрации около 5% мас./об.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) внеклеточную везикулу и (ii) сахарид, который представляет собой сахарозу или трегалозу в концентрации около 5% мас./об.

17. Композиция по п. 16, в которой композиция обладает улучшенной стабильностью по сравнению с эталонной композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1% мас./об. до 4% мас./об.

18. Композиция по любому из пп. 1-17, причем композиция имеет проводимость от около 6 мСм/см +/- 10% до около 10 мСм/см +/- 10%.

19. Композиция по п. 18, у которой проводимость составляет от 6 мСм/см до около 7 мСм/см, от около 7 мСм/см до около 8 мСм/см, от около 8 мСм/см до около 9 мСм/см или от около 9 мСм/см и до около 10 мСм/см.

20. Композиция по п. 18 или 19, у которой проводимость составляет около 6 мСм/см, около 7 мСм/см, около 8 мСм/см, около 9 мСм/см или около 10 мСм/см.

21. Композиция по любому из пп. 16-20, которая дополнительно содержит хлорид натрия.

22. Композиция по любому из пп. 1-15 и 16-21, причем хлорид натрия присутствует в композиции в концентрации от около 10 мМ до около 134 мМ.

23. Композиция по п. 22, в которой концентрация хлорида натрия составляет от около 10 мМ до около 130 мМ, от около 20 мМ до около 120 мМ, от около 30 мМ до около 110 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 50 мМ до около 90 мМ, от около 60 мМ до около 80 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 95 мМ, от около 45 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 70 мМ, от около 45 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 60 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ или от около 51 мМ до около 54 мМ.

24. Композиция по п. 22 или 23, в которой концентрация хлорида натрия составляет около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ или около 100 мМ.

25. Композиция по любому из пп. 22-24, в которой концентрация хлорида натрия составляет около 39 мМ, около 40 мМ, около 41 мМ, около 42 мМ, около 43 мМ, около 44 мМ, около 45 мМ, около 46 мМ, около 47 мМ, около 48 мМ, около 49 мМ или около 50 мМ.

26. Композиция по любому из пп. 16-25, причем композиция дополнительно содержит фосфатный буфер.

27. Композиция по п. 26, в которой фосфатный буфер содержит по меньшей мере одно фосфатное соединение, включающее фосфат калия, фосфат натрия, гидрофосфат динатрия, дигидрофосфат калия, фосфат дикалия и/или их комбинацию.

28. Композиция по п. 27, в которой фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 2, около 1: около 3, около 1: около 4; или около 1: около 5.

29. Композиция по п. 27 или 28, в которой фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 3.

30. Композиция по любому из пп. 27-29, в которой фосфатный буфер содержит фосфат калия и фосфат натрия в соотношении около 1: около 2.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) внеклеточную везикулу, (ii) фосфат калия и (iii) фосфат натрия в растворе, причем соотношение фосфата калия и фосфата натрия составляет от около 1 до около 3 или от около 1 до около 2.

32. Композиция по любому из пп. 16-31, в которой раствор имеет pH от 7,1 до 7,3.

33. Композиция по любому из пп. 1-15 и 27-32, в которой фосфат калия присутствует в композиции в концентрации от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 19 мМ, от около 3 мМ до около 18 мМ, от около 4 мМ до около 17 мМ, от около 5 мМ до около 16 мМ или от около 5 мМ до около 15 мМ.

34. Композиция по п. 33, в которой концентрация фосфата калия составляет около 4,5 мМ, около 4,6 мМ, около 4,7 мМ, около 4,8 мМ, около 4,9 мМ, около 5,0 мМ, около 5,1 мМ, около 5,2 мМ, около 5,3 мМ, около 5,4 мМ или около 5,5 мМ.

35. Композиция по п. 33 или 34, в которой концентрация фосфата калия составляет 5,15 мМ.

36. Композиция по п. 33, в которой концентрация фосфата калия составляет около 15,0 мМ, около 15,1 мМ, около 15,2 мМ, около 15,3 мМ, около 15,4 мМ, около 15,5 мМ, около 15,6 мМ, около 15,7 мМ, около 15,8 мМ, около 15,9 мМ, около 16,0, около 16,1 мМ, около 16,2 мМ, около 16,3 мМ, около 16,4 мМ или около 16,5 мМ.

37. Композиция по п. 33 или 36, в которой концентрация фосфата калия составляет 15,4 мМ.

38. Композиция по любому из пп. 1-15 и 27-37, в которой фосфат калия представляет собой одноосновный фосфат калия.

39. Композиция по любому из пп. 1-15 и 27-38, в которой фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации от около 10 мМ до около 30, от около 11 мМ до около 29 мМ, от около 12 мМ до около 28 мМ, от около 13 мМ до около 27 мМ или от около 14 мМ до около 26 мМ.

40. Композиция по п. 39, в которой фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации около 14,5 мМ, около 14,6 мМ, около 14,7 мМ, около 14,8 мМ, около 14,9 мМ, около 15,0 мМ, около 15,1 мМ, около 15,2 мМ, около 15,3 мМ, около 15,4 мМ или около 15,5 мМ.

41. Композиция по п. 39 или 40, в которой концентрация фосфата натрия составляет 14,9 мМ.

42. Композиция по п. 39, причем фосфат натрия присутствует в композиции в концентрации около 26,5 мМ, около 26,6 мМ, около 26,7 мМ, около 26,8 мМ, около 26,9

мМ, около 27,0 мМ, около 27,1 мМ, около 27,2 мМ, около 27,3 мМ, около 27,4 мМ или около 27,5 мМ.

43. Композиция по п. 39 или 42, в которой концентрация фосфата натрия составляет 27,1 мМ.

44. Композиция по любому из пп. 1-15 и 27-43, в которой фосфат натрия представляет собой гептагидрат двухосновного фосфата натрия.

45. Композиция по любому из пп. 1-44, дополнительно содержащая антиоксидант.

46. Композиция по п. 45, в которой антиоксидант содержит D-метионин, L-метионин, аскорбиновую кислоту, эриторбиновую кислоту, аскорбат натрия, тиоглицерин, цистеин, ацетилцистеин, цистин, дитиоэритреитол, глутатион, токоферолы, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), бисульфат натрия, дитионит натрия, А-токоферол, γ-токоферол, пропил галлат, аскорбилпальмитат, метабисульфит натрия, тиомочевину, тиосульфат натрия, пропилгаллат и тиогликолят натрия.

47. Композиция по любому из пп. 1-46, причем композиция не является лиофилизированной.

48. Композиция по любому из пп. 1-47, причем композиция не содержит хелатирующий агент.

49. Композиция по любому из пп. 1-48, причем композиция не содержит альбумин.

50. Композиция по любому из пп. 1-49, содержащая сахарозу в концентрации около 5% мас./об., хлорид натрия в концентрации около 50 мМ; одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ; гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 15 мМ; при этом композиция находится в растворе с рН 7,2 и проводимостью 7,23 мСм/см +/- 10%.

51. Композиция по любому из пп. 1-49, содержащая сахарозу в концентрации около 5% мас./об., хлорид натрия в концентрации около 40 мМ; одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ; гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ; при этом композиция находится в растворе с рН 7,2 и проводимостью 8,8 мСм/см +/- 10%.

52. Композиция по любому из пп. 1-51, причем композицию можно хранить при температуре от около -20°C до около -80°C, при этом стабильность внеклеточной везикулы не снижается.

53. Композиция по п. 52, причем композиция может храниться в течение около одной недели, около двух недель, около трех недель, около четырех недель, около одного месяца, около двух месяцев, около трех месяцев, около четырех месяцев, около пяти месяцев, около шести месяцев, около семи месяцев, около восьми месяцев, около девяти

месяцев, около десяти месяцев, около 11 месяцев, около 12 месяцев, около года, около двух лет, около трех лет или около четырех лет.

54. Композиция по любому из пп. 16-53, в которой внеклеточная везикула представляет собой экзосому.

55. Композиция по любому из пп. 1-15 и 16-54, в которой внеклеточная везикула дополнительно содержит каркасный белок.

56. Композиция по п. 55, в которой каркасный белок представляет собой каркасный белок X.

57. Композиция по п. 55 или 56, в которой полезная нагрузка связана с каркасным белком.

58. Композиция по п. 57, в которой полезная нагрузка связана с каркасным белком линкером.

59. Композиция по п. 58, в которой линкер представляет собой полипептид.

60. Композиция по п. 58, в которой линкер представляет собой неполипептидный фрагмент.

61. Композиция по любому из пп. 56-60, в которой каркас X представляет собой каркасный белок, способный закреплять полезную нагрузку на внешней поверхности внеклеточной везикулы.

62. Композиция по любому из пп. 56-61, в которой каркасный белок содержит отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 (белок PTGFRN).

63. Композиция по любому из пп. 55-62, в которой каркасный белок содержит белок PTGFRN или его фрагмент.

64. Композиция по пп. 55-62, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-7 и 33.

65. Композиция по любому из пп. 55-64, в которой каркасный белок содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1.

66. Композиция по пп. 1-67, в которой внеклеточная везикула содержит биологически активный фрагмент.

67. Композиция по пп. 55-68, в которой каркасный белок слит с биологически активным фрагментом.

68. Композиция по пп. 55-68, в которой каркасный белок не слит с биологически активным фрагментом.

69. Композиция по любому из пп. 68-71, в которой биологически активный фрагмент содержит агонист STING.

70. Композиция по п. 71, в которой агонист STING содержит CL656.

71. Композиция по п. 72, в которой агонист STING представляет собой изомер А,

изомер В, изомер С или изомер D CL656.

72. Композиция по любому из пп. 71-73, в которой агонист STING не слит с каркасным белком.

73. Композиция по любому из пп. 68-70, в которой биологически активный фрагмент представляет собой IL-12, CD40L, FLT3L или любую их комбинацию.

74. Композиция по п. 75, в которой биологически активный фрагмент слит с каркасным белком.

75. Композиция по любому из пп. 1-76, причем композицию можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, чрескожным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, внутриопухолевым, внутримышечным путем, или в виде ингаляционного средства.

76. Способ приготовления фармацевтической композиции по любому из пп. 1-77, включающий объединение:

внеклеточной везикулы;

сахарида;

хлорида натрия;

фосфата калия; и

фосфата натрия.

77. Способ по п. 78, в котором внеклеточная везикула представляет собой экзосому.

78. Способ приготовления фармацевтической композиции, включающий объединение внеклеточной везикулы и сахараида, который представляет собой сахарозу или трегалозу, в концентрации около 5% мас./об., при этом композиция проявляет улучшенную стабильность по сравнению с композицией, содержащей сахарозу или трегалозу в концентрации от 1 до 4%.

79. Способ приготовления фармацевтической композиции, включающий комбинирование внеклеточной везикулы и фосфатного соединения, причем фосфатное соединение включает фосфат калия и фосфат натрия в соотношении, обеспечивающем повышение pH до от 7,1 до 7,3.

80. Способ по любому из пп. 78-81, в котором проводимость композиции дополнительно регулируют.

81. Способ по п. 97, в котором проводимость композиции составляет от около 7,1 до около 7,3 мСм/см.

82. Способ по п. 83, в котором проводимость составляет 7,23 мСм/см.

83. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-77.

84. Способ по п. 85, в котором заболевание или состояние представляет собой рак, фиброз, гемофилию, диабет, дефицит фактора роста, глазное заболевание, болезнь Помпе, лизосомную болезнь накопления, муковидоз, кистозный фиброз, мышечную

дистрофию Дюшенна и Беккера, транстиретиновый амилоидоз, гемофилию А, гемофилию В, дефицит аденозиндезаминазы, врожденный амавроз Лебера, X-сцепленную адренолейкодистрофию, метахроматическую лейкодистрофию, дефицит ОТС, болезнь накопления гликогена 1А, синдром Криглера-Наджара, первичную гипероксалурию 1 типа, острую перемежающуюся порфирию, фенилкетонурию, семейную гиперхолестеринемию, мукополисахаридоз VI типа, дефицит α 1-антитрипсина и гиперхолестеринемию.

85. Способ по п. 86, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичка, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак яичников, лимфому, рак печени, глиобластому, меланому, миелому, лейкемию, рак поджелудочной железы или их комбинации.

86. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-77 для лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта.

87. Применение композиции по любому из пп. 1-77 при производстве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния.

88. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы;
- (b) сахарозу в концентрации от около 4% масс./об. до около 6% масс./об., например 5% масс./об.;
- (c) хлорид натрия в концентрации от 30 мМ до около 50 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации от около 5 мМ до около 25 мМ;
- (e) гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации от около 15 мМ до около 35 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

89. Композиция по п. 88, содержащая

- (a) внеклеточные везикулы;
- (b) сахарозу в концентрации около 5% мас./об.;
- (c) хлорид натрия в концентрации около 40 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 15 мМ;
- (e) гептагидрат двухосновного фосфата натрия в концентрации около 27 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

90. Композиция по п. 88 или 89, в которой внеклеточные везикулы содержат агонист STING.

91. Композиция по одному из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы;
- (b) сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 50 мМ до по меньшей мере около 300 мМ;
- (c) хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ

до по меньшей мере около 20 мМ;

(е) двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

92. Композиция по п. 91, содержащая:

(а) внеклеточные везикулы;

(b) сахарозу в концентрации около 146 мМ;

(с) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(е) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ, и

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

93. Композиция по одному из пп. 1-68, содержащая:

(а) внеклеточные везикулы;

(b) сахарозу в концентрации от по меньшей мере около 1% до по меньшей мере около 10%;

(с) хлорид натрия в концентрации от по меньшей мере около 10 мМ до по меньшей мере около 200 мМ;

(d) одноосновный фосфат калия в концентрации от по меньшей мере около 1 мМ до по меньшей мере около 20 мМ;

(е) двухосновный фосфат натрия в концентрации от по меньшей мере около 5 мМ до по меньшей мере около 35 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет от около 6,7 до около 7,7.

94. Композиция по п. 93, содержащая:

(а) внеклеточные везикулы;

(b) Сахарозу в концентрации около 5%;

(с) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;

(d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(е) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ, и

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

95. Композиция по любому из пп. 91-94, в которой внеклеточные везикулы содержат фрагмент П-12.

96. Композиция по п. 95, в которой фрагмент П-12 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, 12 или 13.

97. Композиция по п. 95 или 96, в которой фрагмент П-12 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

98. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО;
- (b) сахарозу;
- (c) хлорид натрия;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ, и
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2;

причем концентрация сахарозы выбрана из около 73 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ; и

концентрация хлорида натрия выбрана из около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ.

99. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО;
- (b) сахарозу;
- (c) хлорид натрия;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ, и
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2;

причем концентрация сахарозы выбрана из около 2,5%, около 2,6%, около 2,7%, около 2,8%, около 2,9%, около 3,0%, около 3,1%, около 3,2%, около 3,3%, около 3,4%, около 3,5%, около 3,6%, около 3,7%, около 3,8%, около 3,9%, около 4,0%, около 4,1%, около 4,2%, около 4,3%, около 4,4%, около 4,5%, около 4,6%, около 4,7% , около 4,8%, около 4,9% и около 5,0%; и

концентрация хлорида натрия выбрана из около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ, около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 146 мМ и около 150 мМ.

100. Композиция по п. 98 или 99, в которой АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193.

101. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации от около 73 мМ до около 146 мМ;
- (c) хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

102. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации от около 2,5% до около 5%;
- (c) хлорид натрия в концентрации от около 50 мМ до около 150 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

103. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации около 146 мМ;
- (c) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

104. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

105. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации около 2,5%;
- (c) хлорид натрия в концентрации около 50 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;
- (e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,
- (f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

106. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

- (a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;
- (b) сахарозу в концентрации около 5%;
- (c) хлорид натрия в концентрации около 100 мМ;
- (d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

107. Композиция по любому из пп. 1-68, содержащая:

(a) внеклеточные везикулы, содержащие АСО, причем АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 91-193;

(b) сахарозу в концентрации около 2,5%;

(c) хлорид натрия в концентрации около 100 мМ;

(d) одноосновный фосфат калия в концентрации около 5 мМ;

(e) двухосновный фосфат натрия в концентрации около 15 мМ,

(f) при этом рН композиции составляет около 7,2.

108. Композиция по любому из пп. 98-107, в которой АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 144.

109. Композиция по любому из пп. 98-107, в которой АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 145.

110. Композиция по любому из пп. 98-107, в которой АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 193.

111. Композиция по любому из пп. 98-107, в которой АСО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 185.

112. Композиция по любому из пп. 98-111, в которой АСО связан с внеклеточными везикулами линкером.

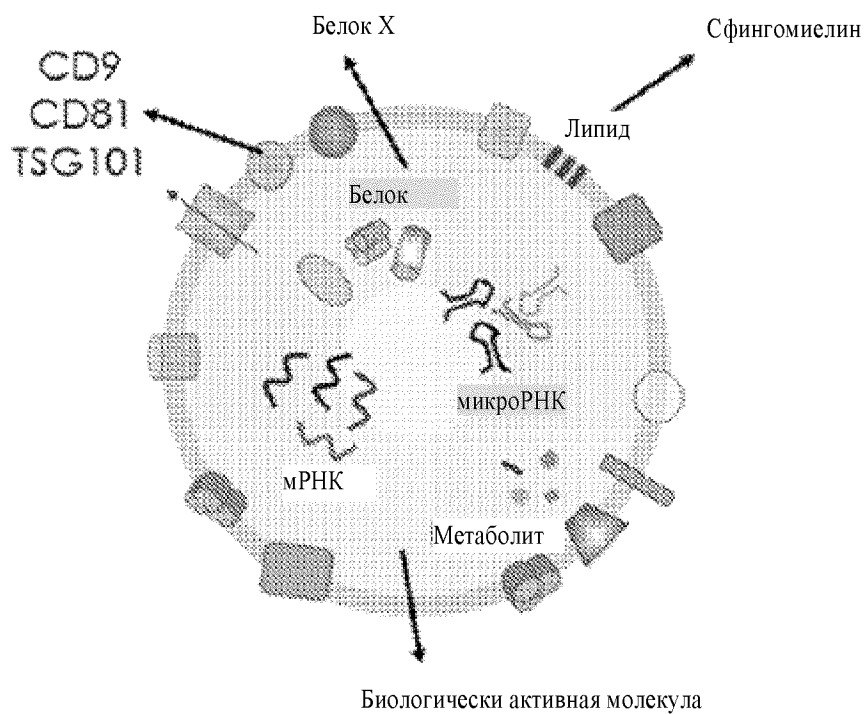
113. Композиция по п. 112, в которой линкер содержит холестерин, токоферол, жирную кислоту или любую их комбинацию.

114. Композиция по п. 112 или 113, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.

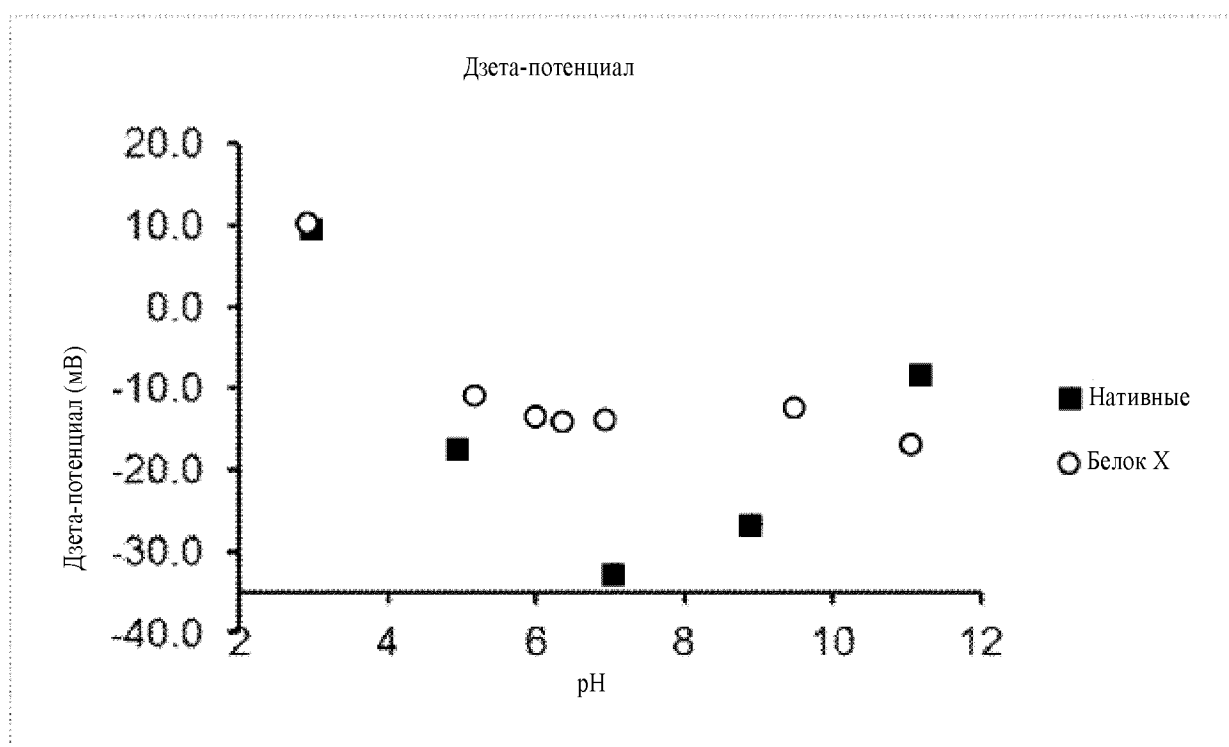
115. Композиция по любому из пп. 58-60, в которой линкер представляет собой расщепляемый линкер.

По доверенности

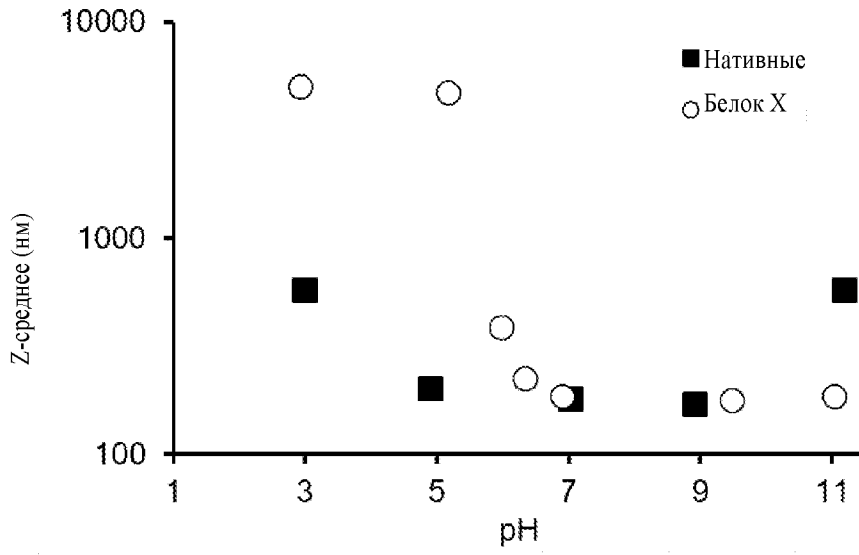
1/10



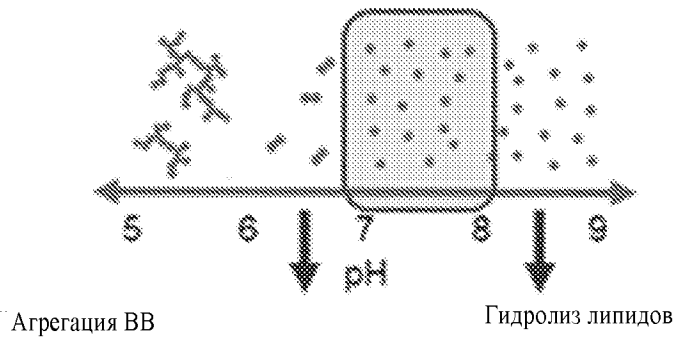
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



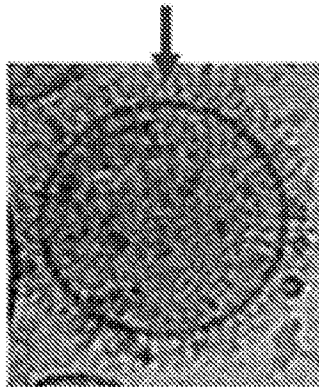
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

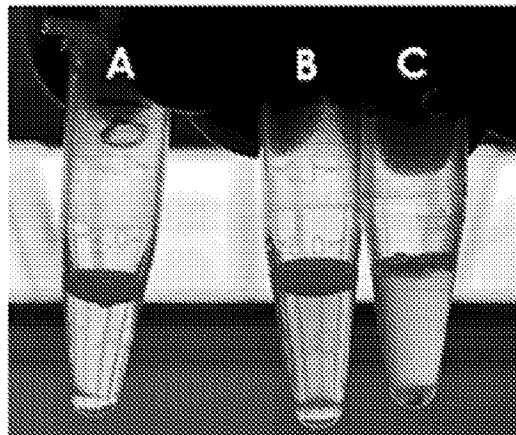
3/10

Белок X
Теоретическая $pI = 6.2$



Белок X ВВ~100нм
Крио-ТЭМ

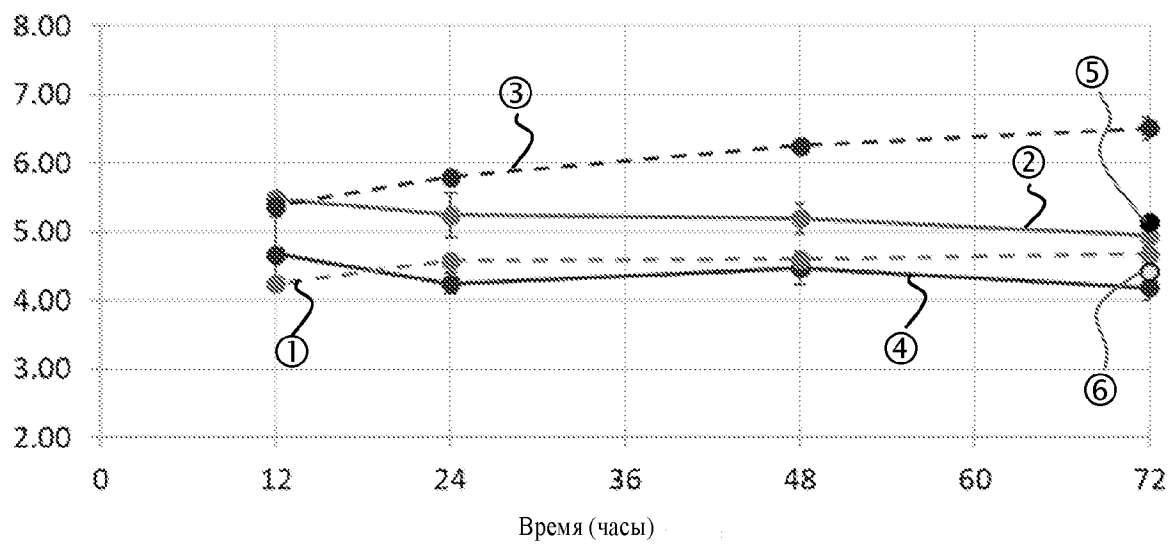
ФИГ. 2С



A = сахароза + буфер, 3x 3/P
B = только буфер, 3x 3/P
C = только вода Milli-Q, 3x 3/P

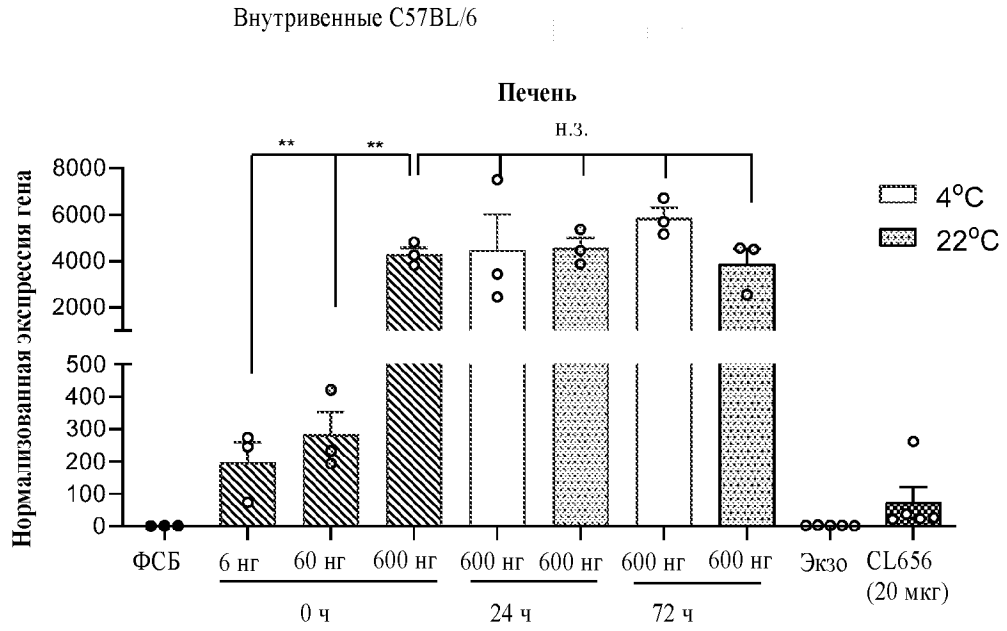
ФИГ. 2D

**ФИГ. 3А**



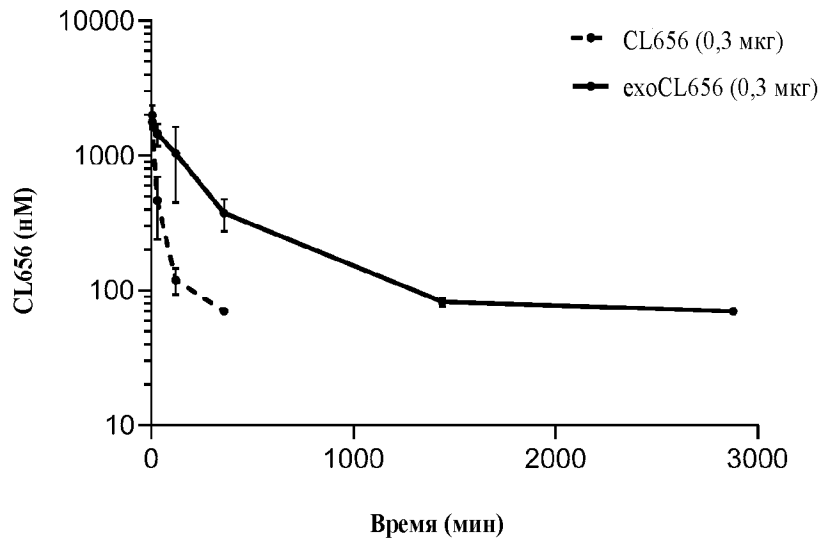
- ① 4 °C супернатант
- ② 4 °C экзосомы
- ③ 22 °C супернатант
- ④ 22 °C экзосомы
- ⑤ -80 °C экзосомы
- ⑥ -80 °C супернатант

ФИГ. 3В

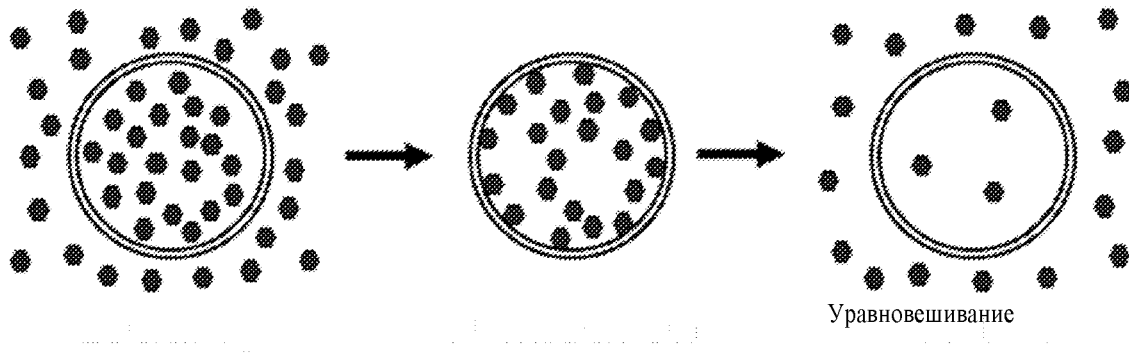


ФИГ. 3С

Внутрипухольевые В16-F10 C57BL/6



ФИГ. 3D

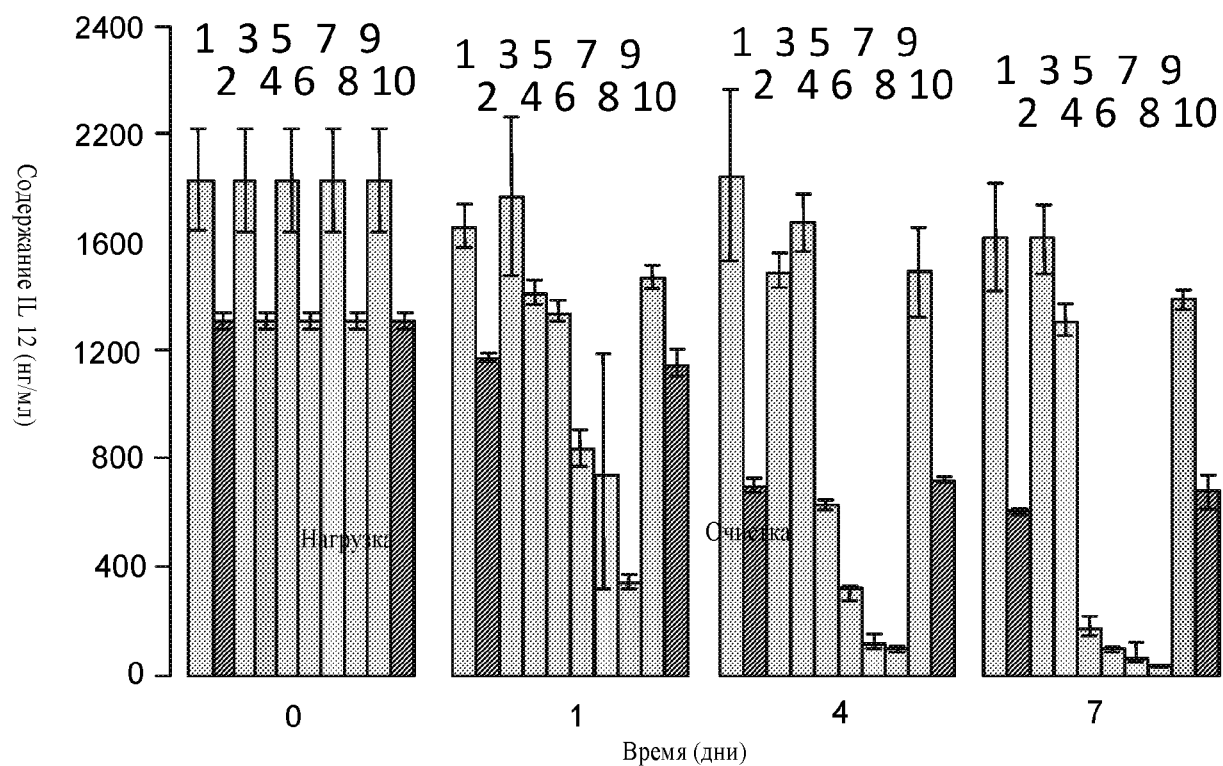


ФИГ. 4А

ФИГ. 4В

ФИГ. 4С

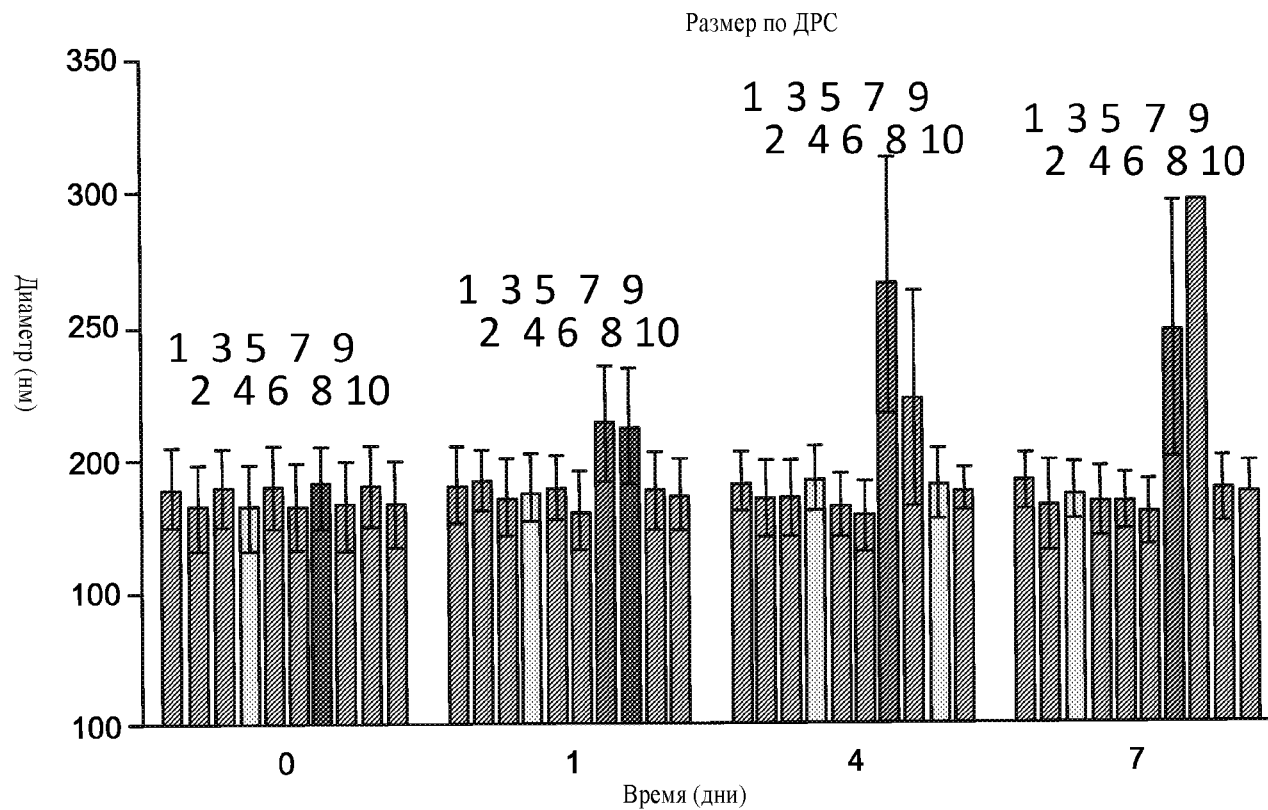
ФИГ. 5



1 - контроль, без пероксида
 2 - контроль, 0,05% пероксид
 3 - тиосульфат, без пероксида
 4 - тиосульфат, 0,05% пероксид
 5 - аскорбат, без пероксида

6 - аскорбат, 0,05% пероксид
 7 - глутатион, без пероксида
 8 - глутатион, 0,05% пероксид
 9 - метионин, без пероксида
 10 - метионин, 0,05% пероксид

ФИГ. 6



- 1 - контроль, без пероксида
- 2 - контроль, пероксид
- 3 - тиосульфат, без пероксида
- 4 - тиосульфат, пероксид
- 5 - аскорбат, без пероксида

- 6 - аскорбат, пероксид
- 7 - глутатион, без пероксида
- 8 - глутатион, пероксид
- 9 - метионин, без пероксида
- 10 - метионин, пероксид

ФИГ. 7