



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.25**

**(21)** Номер заявки  
**201890006**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.06.10**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОСОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ**

**(31)** **62/173,838**

**(32)** **2015.06.10**

**(33)** **US**

**(43)** **2018.05.31**

**(86)** **PCT/US2016/037018**

**(87)** **WO 2016/201323 2016.12.15**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Каллури Рагху (US), Мело Соня (PT)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2013185032  
C.V. PECOT ET AL. "Therapeutic Silencing of KRAS Using Systemically Delivered siRNAs", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 13, no. 12, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 2876-2885, XP055303664, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0074, the whole document  
WEN XUE ET AL. "Small RNA combination therapy for lung cancer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 111, no. 34, 26 August 2014 (2014-08-26), pages E3553-E3561, XP002730537, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1412686111, [retrieved on 2014-08-11], the whole document  
LINJUAN ZENG ET AL. "Combination of siRNA-directed Kras oncogene silencing and arsenic-induced apoptosis using a nanomedicine strategy for the effective treatment of pancreatic cancer", NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, vol.

10, no. 2, 1 February 2014, (2014-02-01), pages 463-472, XP055304815, NL ISSN: 1549-9634, DOI: 10.1016/j.nano.2013.08.007, the whole document

A. LAKSHMIKUTTYAMMA ET AL. "Stable and Efficient Transfection of siRNA for Mutated KRAS Silencing Using Novel Hybrid Nanoparticles", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 11, no. 12, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 4415-4424, XP55304819, US ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp500525p, the whole document

CONG-FEI XU ET AL. "Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy", ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 10, no. 1, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 1-12, XP055304821, ISSN: 1818-0876, DOI: 10.1016/j.ajps.2014.08.011, the whole document

LYDIA ALVAREZ-ERVITI ET AL. "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 29, no. 4, 20 March 2011 (2011-03-20), pages 341-345, XP055227686, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1807, the whole document

KASPER BENDIX JOHNSEN ET AL. "A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles – Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy", BBA - REVIEWS ON CANCER., vol. 1846, no. 1, 1 August 2014, (2014-08-01), pages 75-87, XP55304832, NL ISSN: 0304-419X, DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.04.005, the whole document

RODRIGUEZ: "Minimal "self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles", SCIENCE, vol. 339, 22 February 2013, (2013-02-22), pages 971-975, XP002762200, the whole document

P.-A. OLDENBORG: "Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells", SCIENCE, vol. 288, no. 5473, 16 June 2000, (2000-06-16), pages 2051-2054, XP055304810, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.288.5473.2051, the whole document

**(57)** Изобретение относится к наночастицам на основе липидов (например, липосомам или экзосомам), имеющим CD47 на их поверхности и содержащим терапевтический агент (например, терапевтический белок, антитело, ингибиторную РНК и/или низкомолекулярное лекарственное средство). Кроме того, данное изобретение предусматривает применение таких наночастиц на основе липидов в терапии.

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке Соединенных Штатов 62/173838, поданной 10 июня 2015 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### **Область техники**

Данное изобретение относится в целом к области медицины и онкологии. В частности, это касается применения экзосом в способах лечения.

### **Уровень техники**

Экзосомы представляют собой небольшие (40-150 нм) мембранные везикулы с липидным бислоем эндосомного происхождения, которые высвобождаются всеми клетками организма (Kowal et al., 2014; El-Andaloussi et al., 2013; Thery et al., 2002). Экзосомы содержат белки, липиды, мРНК, микроРНК (микроРНК) и геномную ДНК (Valadi et al., 2007; Peinado et al., 2012; Luga et al., 2012; Kahlert et al., 2014). В отличие от липосом и других носителей наночастиц синтетического лекарственного средства, экзосомы содержат много трансмембранных и мембранных заякоренных белков, которые, вероятно, усиливают эндоцитоз и/или прямое слияние с плазматической мембраной клеток-реципиентов, тем самым повышая доставку карго (Marcus et al., 2013; van den Boorn et al., 2013; Johnsen et al., 2014). Природная экзосомная плазмалеммоподобная фосфолипидная композиция (включая фосфатидилсерин на цитозольной стороне и холестерол) и композиция мембраноассоциированного белка также может обеспечить превосходную стабильность в большом круге кровообращения по сравнению с синтетическими наночастицами (такими как липосомы) за счет уменьшения клиренса системы кровообращения (частично благодаря их отсутствию взаимодействия с опсонинами, факторами коагуляции и комплемента, распознаваемые макрофагом для фагоцитоза) и минимизации иммуногенной реакции (Clayton et al., 2003; van der Meel et al., 2014; Gomes-da-Silva et al. 2012). Эти особенности, вероятно, также минимизируют цитотоксические эффекты, наблюдаемые при использовании синтетических наночастиц *in vivo* (Simoes et al., 2005). Наконец, механизмы эндосомного и межклеточного везикулярного транспорта, вовлеченные в генерацию экзосом, также могут быть использованы в поглощении экзосом клетками-реципиентами, возможно, улучшая высвобождение карго (и включение в механизм РНК-сайленсинга генов), тем самым увеличивая эффективность любого терапевтического агента (например, гена). Недавние исследования оценили эффективность экзосом как носителей РНК для терапии и показали, что системное введение экзосом позволило доставить миРНК в мозг, что привело к устойчивому снижению экспрессии целевых генов (Cooper et al., 2014; Alvarez-Erviti et al., 2011). Кроме того, сообщалось, что экзосомы, полученные из плазмы человека, позволили обеспечить доставку РНК в клетки-реципиенты (Wahlgren et al., 2012), поддерживая их потенциальную терапевтическую полезность при доставке РНК для изменения экспрессии генов в целевых клетках.

Одиночные нуклеотидные вариации в KRAS (мутации Kras<sup>G12D/R/V</sup>) обнаружены у 96% опухолей поджелудочной железы (Chang et al., 2014), а мутации Kras считаются ранними неопластическими событиями, которые приводят и поддерживают малигнизацию поджелудочной железы (Ying et al., 2012; Collin et al., 2012; Collins et al., 2012; Smakman et al., 2005). Недавно сообщалось, что нацеливание на основе РНК на экспрессию Kras и нисходящий сигналинг с использованием наночастиц снижает опухолевую нагрузку в моделях рака легких и колоректального рака (Pecot et al., 2014; Yuan et al., 2014; Xue et al., 2014). В отличие от усилий, направленных на специфическое нацеливание на онкогенный Kras, эти подходы могут вызывать цитотоксические эффекты, что требует тщательный подбор доз и наблюдение. Специфическое нацеливание на онкогенный Kras было ограничено доставкой при помощи электропорации (Rejiba et al., 2007) или биополимерными имплантатами (Zorde Khvalevsky et al., 2013) в ксенотрансплантатных моделях рака поджелудочной железы. Для доставки терапевтических или диагностических агентов необходимы более совершенные подходы.

### **Краткое описание сущности изобретения**

В данном документе представлены способы и лекарственные средства, которые используют сконструированные липосомы и экзосомы в качестве систем доставки для лечения рака.

В одном варианте реализации изобретения предложены фармацевтические композиции, которые содержат наночастицу на основе липидов и вспомогательное вещество, причем наночастица на основе липидов содержит CD47 на своей поверхности и при этом наночастица на основе липидов содержит терапевтический агент. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов представляет собой липосому или экзосому. В некоторых аспектах экзосомы выделяют из клетки через экспрессию CD47. В некоторых аспектах экзосомы выделяют из пациента, нуждающегося в лечении. В некоторых аспектах экзосомы выделяют из фибробластов. В некоторых аспектах липосома представляет собой однослойную липосому. В некоторых аспектах липосома представляет собой многослойную липосому.

В различных аспектах терапевтический агент представляет собой терапевтический белок, антитело (например, полноразмерное антитело, моноклональное антитело, scFv, Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>, диатело, триатело или мини-антитело), ингибиторную РНК или низкомолекулярное лекарственное средство. В некоторых аспектах терапевтический белок представляет собой белок, чья потеря или инактивация, как известно, относится к болезни, подлежащему лечению, например, к онкосупрессору, киназе, фосфатазе или транскрипционному фактору. В некоторых аспектах антитело связывает внутриклеточный антиген.

Такой внутриклеточный антиген может быть белком, активность которого необходима для пролиферации и/или выживания клеток, таким как онкоген. В некоторых случаях антитело предотвращает действие антигена. В некоторых случаях антитело нарушает взаимодействие белок-белок. В некоторых аспектах ингибиторная РНК представляет собой миРНК (малая интерферирующая РНК), кшРНК (короткая шпилечная РНК), микроРНК или пре-микроРНК (молекула-предшественник микроРНК). В различных аспектах ингибиторная РНК предотвращает экспрессию белка, активность которого необходима для поддержания определенной стадии болезни, такого как, например, онкоген. В тех случаях, когда онкоген является мутантной формой гена, тогда ингибиторная РНК может предпочтительно предотвращать экспрессию мутантного онкогена, а не белка дикого типа. В некоторых аспектах низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой средство для визуализации. В некоторых аспектах низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

В некоторых аспектах композицию составляют для парентерального введения, такого как, например, внутривенная, внутримышечная, подкожная или внутривнутрибрюшинная инъекция.

В некоторых аспектах композиция содержит противомикробное средство. Противомикробным средством может быть хлорид бензалкония, бензетония хлорид, бензиловый спирт, бронопол, центририд, цетилпиридиний хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексэтидин, имидомочевина, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути, пропиленгликоль или тимеросал.

В некоторых аспектах одиночная наночастица на основе липидов содержит более чем один агент, такой как терапевтический агент и диагностический агент, более чем один терапевтический агент или более чем один диагностический агент.

В одном варианте реализации изобретения предложены способы лечения болезни у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение композиции согласно любому из настоящих вариантов реализации изобретения пациенту, тем самым обеспечивая лечение болезни у пациента. В некоторых аспектах болезнь представляет собой рак. В некоторых аспектах пациент представляет собой человека. В некоторых аспектах пациент ранее удалял опухоль оперативным путем.

В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой ингибиторную РНК, нацеленную на онкоген. В некоторых аспектах ингибиторная РНК нацелена на Kras<sup>G12D</sup>. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой онкосупрессорный белок.

В некоторых аспектах способ дополнительно включает применение по меньшей мере второй терапии пациенту. В разных аспектах вторая терапия включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию.

В одном варианте реализации изобретения предложены способы лечения болезни у пациента, нуждающегося в этом, включающие электропорацию липосом или экзосом с терапевтическим агентом (например, моноклональным антителом), и предложены электропорированные липосомы, экзосомы для пациента, для лечения болезни у пациента. В некоторых аспектах липосомы или экзосомы содержат CD47 на их поверхности. В некоторых аспектах болезнь представляет собой рак. В некоторых аспектах моноклональное антитело специфически или селективно связывает внутриклеточный антиген.

В одном варианте реализации изобретения предложены способы введения терапевтического белка пациенту, нуждающемуся в этом, включающие трансфекцию экзосом с нуклеиновой кислотой (например, ДНК или РНК), кодирующей терапевтический белок (например, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), инкубируя трансфецированные экзосомы в условиях, обеспечивающих экспрессию терапевтического белка в экзосомах, и обеспечение инкубированных экзосом для пациента, тем самым обеспечивая введение пациенту терапевтического белка.

В одном варианте реализации изобретения предложены способы введения терапевтического антигена в клетку, включающие приведение в контакт клетки с наночастицей на основе липидов, содержащей антитело, причем антитело специфически или избирательно связывает внутриклеточный антиген. В некоторых случаях клетка находится в пациенте, и способ включает введение пациенту наночастицы на основе липидов.

В одном варианте реализации изобретения предложены способы лечения рака у пациента, включающие введение терапевтически эффективного количества наночастицы на основе липидов пациенту, причем наночастица содержит ингибиторную РНК, которая специфически или избирательно нацелена на мутантный Kras (например, Kras<sup>G12D</sup>). В некоторых аспектах рак представляет собой рак легкого, колоректальный рак или рак поджелудочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов представляет собой липосому или экзосому. В некоторых аспектах экзосомы получают из собственных клеток пациента. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов содержит CD47 на ее поверхности. В некоторых аспектах ингибиторная РНК представляет собой миРНК или кшРНК. В некоторых аспектах последовательность ингибиторной РНК предназначена для того, чтобы содержать специфическое отклонение нуклеотидов от G на A в области нацеливания (например, как показано в SEQ ID NO: 1) для содействия специфическому нацеливанию на Kras<sup>G12D</sup> мРНК. В некоторых аспектах ингибиторная РНК содержит область нацеливания, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации предложена композиция, содержащая наночастицу на основе липидов и вспомогательное вещество, для применения в лечении болезни у пациента. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов содержит CD47 на ее поверхности. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов содержит терапевтический агент. В некоторых аспектах болезнь может быть раком. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой ингибиторную РНК, нацеленную на онкоген. В некоторых аспектах ингибиторная РНК нацелена на Kras<sup>G12D</sup>. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой онкосупрессорный белок. В некоторых аспектах композиция дополнительно включает по меньшей мере вторую терапию. В некоторых аспектах вторая терапия включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию. В некоторых аспектах пациент представляет собой человека.

В некоторых аспектах композицию составляют для парентерального введения, такого как, например, внутривенная, внутримышечная, подкожная или внутрибрюшинная инъекция.

В некоторых аспектах композиция содержит противомикробное средство. Противомикробным средством может быть хлорид бензалкония, бензетония хлорид, бензиловый спирт, бронепоп, центримид, цетилпиридиний хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексэтидин, имидомочевина, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути, пропиленгликоль или тимеросал.

В одном варианте реализации изобретения предложено использование наночастицы на основе липидов при изготовлении лекарственного средства для лечения болезни. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов содержит CD47 на ее поверхности. В некоторых аспектах наночастица на основе липидов содержит терапевтический агент. В некоторых аспектах болезнь представляет собой рак. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой ингибиторную РНК, нацеленную на онкоген. В некоторых аспектах ингибиторная РНК нацелена на Kras<sup>G12D</sup>. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой онкосупрессорный белок.

В некоторых аспектах лекарственное средство составлено для парентерального введения, такого как, например, внутривенная, внутримышечная, подкожная или внутрибрюшинная инъекция.

В некоторых аспектах лекарственное средство содержит противомикробный агент. Противомикробным средством может быть хлорид бензалкония, бензетония хлорид, бензиловый спирт, бронепоп, центримид, цетилпиридиний хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексэтидин, имидомочевина, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути, пропиленгликоль или тимеросал.

Используемый в данном документе "по существу свободный" в терминах определенного компонента используется в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно сформулирован в составе и/или присутствует только в качестве загрязнителя или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента, возникающее в результате какого-либо непреднамеренного загрязнения композиции, значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой никакое количество указанного компонента не может быть обнаружено стандартными аналитическими методами.

Как используется в данном документе термин в единственном числе может означать один или более. Как используется в данном документе в формуле изобретения, при использовании в сочетании со словом "содержащий" слова в единственном числе могут означать один или более одного.

Использование термина "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не указано только на альтернативу, или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя раскрытие поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или". Используемый в данном документе термин "другой" может означать по меньшей мере отличный или более.

Во всей этой заявке термин "около" используется для обозначения того, что значение включает изначально присущую вариацию ошибки для прибора, способа, используемого для определения значения, или вариацию, существующую среди субъектов исследования.

Другие объекты, особенности и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Следует, однако, понимать, что подробное описание и конкретные примеры, наряду с указанием предпочтительных вариантов реализации изобретения, приводятся только для иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения, станут очевидными для специалистов в данной области техники исходя из данного подробного описания.

### **Краткое описание графических материалов**

Следующие графические материалы являются частью данного описания изобретения и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов данного изобретения.

Изобретение может быть более понятным со ссылками на один или более из этих чертежей в комбинации с детальным описанием конкретных вариантов реализации изобретения, представленных в данном документе.

Фиг. 1A-F. Нацеливание на Kras<sup>G12D</sup>, опосредуемое миРНК/кшРНК, упакованными в экзосомы, индуцирует гибель раковых клеток (фиг. 1A). Количественная оценка конфокальных микрофотографий

клеток Panc-1, окрашенных ядерным красителем SYTOX® Green (зеленая флуоресценция), и визуализация поглощенных экзосом (экзос.) и липосом (липос.), содержащих миРНК, меченные Alexa Fluor® 647. Клетки Panc-1 предварительно инкубировали с и без протеиназы К или трипсина перед воздействием миРНК, меченным Alexa fluor 647, содержащим экзос, или липос. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости между группами, (фиг. 1B-C) ПЦР-анализ в реальном времени KRAS<sup>G12D</sup> (фиг. 1B) или KRAS дикого типа (фиг. 1C) уровни транскриптов в клетках Panc-1, обработанных в течение 3 часов siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup>, содержащих экзос. или липос., siScrbl или shScrbl, содержащих экзос. или липос., или неэлектропорированные (пустой карго, контрольный экзос.) экзос. Кратность изменения представлена по отношению к экспрессии в необработанных клетках Panc-1 (контроль), которая была произвольно установлена равной 1. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости по сравнению с уровнями транскриптов необработанных клеток Panc-1. (фиг. 1D) Вестерн-блоттинг лизатов из лизатов необработанных Panc-1 (контроль) и лизатов из клеток Panc-1, обработанных siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. на фосфорилированный АКТ (p-AKT) (протеинкиназа B), фосфорилированный ERK (p-ERK) (киназа, регулируемая внеклеточными сигналами) и актин (контроль для нанесения). (фиг. 1E) Относительное количество клеток Panc-1 в течение времени после контакта с перечисленными обработками (фиг. 1F). Количественная оценка иммуноокрашенных микрофотографий, выполненных на маркер апоптоза TUNEL (терминальное дезоксиуридинное мечение концов) в клетках Panc-1, подвергнутых перечисленным обработкам. Пуромицин использовали в качестве положительного контроля. (0) указывает на, что не было обнаружено положительных на TUNEL клеток. Контроль: необработанные, контрольные экзос.: неэлектропорированные (без миРНК груза) экзос. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости между группами. Среднее значение изображается с  $\pm$ СОС. Если не указано иное, однофакторный дисперсионный анализ использовали для определения статистической значимости. \*\*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,001, нз: незначимый.

Фиг. 2A-G. Лечение экзосомами, содержащими карго si/shKras<sup>G12D</sup>, приводит к устойчивой регрессии ортотопической Panc-1 опухоли. (фиг. 2A) Относительное свечение биoluminesцентных ортотопических Panc-1 опухолей со временем. PBS (фосфатно-солевой буфер): n=7, контрольный экзос.: n=6, siKras<sup>G12D</sup> липос: n=3, shKras<sup>G12D</sup> липос: n=3, siKras<sup>G12D</sup> экзос: n=7, shKras<sup>G12D</sup> экзос.: n=7. Статистические результаты испытаний демонстрируют сравнение групп лечения с контрольной группой PBS на 42-е сутки после инъекции раковых клеток, за исключением группы siKras<sup>G12D</sup> экзос., которую сравнивали с группой PBS в экспериментальной конечной точке (28-е сутки после инъекции раковыми клетками). Верхняя пара линий- PBS и контрольные экзос; средняя пара линий - липос; нижняя пара линий - экзос. (фиг. 2B) Относительное свечение биoluminesцентных ортотопических VxPC3 опухолей с течением времени. PBS: n=3, контрольные экзос: n=3, siKras<sup>G12D</sup> экзос: n=3, shKras<sup>G12D</sup> экзос.: n=3. Статистические результаты испытаний демонстрируют сравнение групп лечения с контрольной группой PBS на 77-е сутки после инъекции раковыми клетками. (фиг. 2C) Относительное свечение биoluminesцентных ортотопических Panc-1 опухолей со временем. Экспериментальные группы начинались с PBS: n=7, контрольных экзос: n=6, siKras<sup>G12D</sup> экзос: n=7, shKras<sup>G12D</sup> экзос: n=7, и постепенно уменьшались, когда мышей умерщвляли и подвергали эвтаназии (PBS и контрольные экзосомные группы). Небольшие очаги раковых клеток были замечены в обработанной shKras<sup>G12D</sup> экзос. поджелудочной железе, однако большая часть поджелудочной железы было гистологически ничем не примечательна. Верхняя пара линий представляют собой PBS и контрольный экзос; нижняя пара линий представляют собой si/shKrasG12D экзос. (фиг. 2D) Сравнительный анализ измеренного свечения биoluminesценции на 77-е сутки после инъекции раковыми клетками ортотопических опухолей Panc-1. PBS: n=7, контрольные экзос.: n=6, shKras<sup>G12D</sup> экзос.: n=7. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости между группами (фиг. 2E).

Количественная оценка иммунного мечения p-ERK (масштабная линейка: 50 мкм) и процент окрашивания p-ERK в опухолях поджелудочной железы в экспериментальных группах. n=6. Обратите внимание, что количественную оценку проводили на значительно меньших участках опухоли в группе, обработанной shKras<sup>G12D</sup> экзос. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости между обеими группами. (фиг. 2F) Масса опухоли (относительная масса поджелудочной железы к массе тела) в указанных экспериментальных группах при эвтаназии (PBS: 62-130 сутки, контрольные экзос.: 30-132 сут, shKras<sup>G12D</sup> экзос.: 200 сут). Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости между группами. (фиг. 2G) Сравнение кривых выживаемости мышей, полученных по методу Каплана-Мейера, в указанных экспериментальных группах и статистические различия оценивали с использованием логарифмического рангового критерия по Мантелу-Коксу, PBS: n=7, контрольные экзос.: n=6, shKras<sup>G12D</sup> экзос.: n=7. Среднее значение изображается с  $\pm$  СОС. Если не указано иное, однофакторный дисперсионный анализ использовали для определения статистической значимости. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, нз: незначимый.

Фиг. 3A-G. Введение экзосом, упакованных с миРНК и кшРНК Kras<sup>G12D</sup>, индуцирует более медлен-

ную прогрессию опухоли и увеличивает выживаемость РКТ мышей. (фиг. 3А) Схематическое изображение временной шкалы прогрессирования опухоли с экспериментальными точками лечения у  $Ptfla^{cre/+}$ ;  $LSL-Kras^{G12D/+}$ ;  $Tgfb2^{lox/lox}$  (РКТ) мышей. Лечение экзогенными фибробластами BJ, содержащими  $Kras^{G12D}$  РНКи, начали на 33 сутки, а затем продолжали через сутки, пока мыши не достигли экспериментальной конечной точки или не начинали умирать и не нуждались в эвтаназии. Контрольную группу лечили с той же концентрацией неэлектропорированных экзосом BJ (контрольные экзос.). (фиг. 3В) Сравнение кривых выживаемости мышей, полученных по методу Каплана-Мейера, в указанных экспериментальных группах и статистические различия оценивали с использованием логарифмического рангового критерия по Мантелу-Коксу.  $n=5$  в каждой группе. (фиг. 3С) Масса опухоли (относительная масса поджелудочной железы к массе тела) в указанных экспериментальных группах в возрасте 44 суток.  $n=3$  в каждой группе. (фиг. 3Д) Количественная оценка относительных процентных соотношений, определенных на микрофотографиях, окрашенных Н&Е опухолей у 44-суточных РКТ мышей, получавших лечение  $siKras^{G12D}$ , содержащих экзос. или неэлектропорированные контрольные экзос.,  $n=3$ . Для статистического сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ. (фиг. 3Е-Ф) Сравнение кривых выживаемости мышей, полученных по методу Каплана-Мейера, (фиг. 3Е) в указанных экспериментальных группах (экзосомы из фибробластов, полученных из РКТ,  $n=5$  в каждой группе, левая линия представляют собой контрольные экзос., правая линия представляет собой  $siKras^{G12D}$  экзос.) и (фиг. 3Ф) масса опухоли,  $n=5$ . Для статистического анализа сравнения кривых Каплана-Мейера проводили логарифмический ранговый критерий по Мантелу-Коксу. (фиг. 3Г) Количественная оценка микрофотографий на окрашивание трихром по Массону (МТС) и иммунного мечения на маркер апоптоза TUNEL, маркер пролиферации Ki-67 и фосфорилированную-ERK из опухолей поджелудочной железы 44-суточных РКТ в указанных экспериментальных группах.  $n=3$ . Данные представлены как среднее  $\pm$  СОС. Если не указано иное, для определения статистической значимости использовали непарный двухсторонний t-критерий Стьюдента.  $**p<0,01$ ,  $****p<0,0001$ .

Фиг. 4А-І. Специфическое нацеливание на  $Kras^{G12D}$  с использованием экзосом. (фиг. 4А) Схематическое изображение электропорации РНКи в экзосомы. РНКи на изображении помечен Alexa Fluor® 647. (фиг. 4В) Число экзосом и распределение по размерам с использованием NanoSight. (фиг. 4С-Д) Микрофотография экзосом, очищенных от фибробластов BJ, полученная с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (фиг. 4С) и окрашенных CD9 при помощи иммунного окрашивания золотом (фиг. 4Д). (фиг. 4Е) Нозерн-блот в градиенте плотности сахарозы экзосом фибробластов BJ, содержащих мРНК, меченные Alexa Fluor® 647. Детекция флуоресценции флуорофора Alexa Fluor® 647 изображено на блоке. (фиг. 4Ф) ПЦР-анализ в реальном времени уровней транскриптов  $KRAS^{G12D}$  в клетках Panc-1, обработанных в течение 3 часов  $siKras^{G12D}$  или  $shKras^{G12D}$  липос.,  $siScrb1$  или  $shScrb1$  липос., с увеличением концентрации липос. (1x, 10x, 100x), а также увеличением времени обработки клеток Panc-1 (24 часа). Кратность изменения представлена по отношению к экспрессии в необработанных клетках Panc-1 (контроль), которая была произвольно установлена равной 1. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости по сравнению с уровнями транскриптов необработанных клеток Panc-1. (фиг. 4Г) ПЦР-анализ в реальном времени уровней транскриптов  $KRAS^{G12D}$  в клетках Panc-1, обработанных  $siKras^{G12D}$  или  $shKras^{G12D}$  экзос. в течение 3 часов, как показано на фиг. 1В, и с повышенной концентрацией экзос. (~ 700 экзос. на клетки вместо ~ 400 экзос. на клетки). Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости по сравнению с уровнями транскриптов необработанных клеток Panc-1. (фиг. 4Н) ПЦР-анализ в реальном времени уровней транскриптов  $KRAS$  дикого типа в клетках BxPC-3, обработанных  $siKras^{G12D}$  или  $shKras^{G12D}$  экзос. в течение 3 часов. Непарный двусторонний t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости по сравнению с уровнями транскриптов необработанных клеток BxPC3. (фиг. 4І) Относительное количество клеток Panc-1 в течение времени после контакта с перечисленными обработками. В конечный момент времени использовали непарный двухсторонний t-тест Стьюдента,  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ,  $****p<0,0001$ , нз: незначимый.

Фиг. 5А-Д. Экзосомы, содержащие РНКи  $Kras^{G12D}$ , подавляют рост ортотопической опухоли Panc-1. (фиг. 5А) Проточный цитометрический анализ экзосом, выделенных из сыворотки мышей, получавших лечение  $siKras^{G12D}$  экзос., на 24 час после и/п инъекции (интраперитонеальной). Меченные экзосомы были обнаружены с использованием РНКи, меченных Alexa Fluor® 647, которые дополнительно связаны с гранулами 0,4 мкм. (фиг. 5В) Проточный цитометрический анализ и количественное определение процента Alexa Fluor® 647<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> макрофагов в крови мышей через 12 часов после и/п инъекции РНКи, меченной Alexa fluor 647, содержащей экзос. или липос. (фиг. 5С) Количественная оценка доли окрашенной p-AKT области на микрофотографиях опухолей поджелудочной железы, иммуномеченных на фосфорилированную АКТ (p-AKT).  $n=6$ . Обратите внимание, что количественную оценку проводили на относительно небольших участках опухоли в группе, получавшей лечение  $shKras^{G12D}$  экзос. (фиг. 5Д) Сравнение кривых выживаемости мышей с ортотопическими опухолями BxPC-3, полученных по методу Каплана-Мейера, в указанных экспериментальных группах, PBS:  $n=3$ , контрольные экзос.:  $n=3$ ,  $shKras^{G12D}$  экзос.:  $n=3$ ,  $siKras^{G12D}$  экзос.:  $n=3$  (логарифмический ранговый критерий (Мантела-Кокса)

был использован для этого анализа). Данные представлены как среднее  $\pm$ СОС. Если не указано иное, непарный двухсторонний t-тест Стьюдента использовали для определения статистической значимости. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , нз: незначимый.

Фиг. 6А-В. Прогрессия опухоли Panc-1. (фиг. 6А) Сравнительный анализ измеренного свечения биолюминесценции на 77 сутки. PBS:  $n=7$ , контрольные экзос.:  $n=6$ , shKras<sup>G12D</sup> экзос.:  $n=7$ . Непарный двухсторонний t-тест Стьюдента использовали на 77-е сутки для определения статистической значимости. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , нз: незначимый. (фиг. 6В) Лепестковая диаграмма, изображающая отдельные опухоли. PBS:  $n=7$ , контрольные экзос.:  $n=6$ , shKras<sup>G12D</sup> экзос.:  $n=7$ .

Фиг. 7А-Д. Гистологический анализ мышей РКТ, получавших лечение РНКи Kras<sup>G12D</sup> экзос. (фиг. 7А) Масса опухоли (относительная масса поджелудочной железы к массе тела) в экспериментальной конечной точке (контрольные экзос.: медиана выживаемости на 43 сутки, siKras<sup>G12D</sup> экзос.: медиана выживаемости на 60 сутки).  $n=5$  в каждой группе. (фиг. 7В-С) Количественная оценка относительной доли гистологических фенотипов на микрофотографиях, окрашенных Н&Е опухолей РКТ мышей в указанных экспериментальных конечных точках и получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос., полученных из фибробластов ВJ (фиг. 7А) и фибробластов РКТ (фиг. 7Б), или неэлектропорированными экзос. (контрольные экзос.).  $n=5$ . Для статистического сравнения использовали двухфакторный дисперсионный анализ. (фиг. 7Д) Количественная оценка микрофотографий опухолей, иммуномеченных на фосфорилированную АКТ, у 44-суточных РКТ мышей в указанных экспериментальных группах. Данные представлены как среднее  $\pm$ СОС. Если не указано иное, для определения статистической значимости использовали непарный двухсторонний t-критерий Стьюдента. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Фиг. 8А-В. Циркулирующие моноциты поглощают iLiposomes (то есть липосомы, содержащие лекарственное вещество, такое как ингибиторная РНК) более эффективно, чем iExosomes (то есть экзосомы, содержащие лекарственное вещество, такое как ингибиторная РНК). (фиг. 8А) На верхних графиках показан % CD11b-положительных клеток от общей популяции живых клеток. На нижних графиках показан % из A647 и CD11b дважды положительных клеток от общей популяции живых клеток. (фиг. 8В) Количественная оценка диаграмм рассеяния возбужденной флуоресценции сортированных клеток, представленных на фиг. 8А.

Фиг. 9А-С. CD47 детектируется на экзосомах, но не в экзосомах. (фиг. 9А) Экзосомы, выделенные из фибробластов ВJ. На верхних диаграммах показано окрашивание только вторичными антителами, которые на нижних диаграммах демонстрируют окрашивание на CD63 или CD47. (фиг. 9В) Липосомы (100 нм), окрашенные только вторичным антителом или антителами к CD63 или CD47. (фиг. 9С) Экспрессия CD47 экзосомами, выделенными из трех разных клеточных линий двумя различными способами.

Фиг. 10. Антитело против CD47 стимулирует поглощение экзосомы циркулирующими моноцитами *in vivo*. Экзосомы обрабатывали антителом против CD47, которое позволяло поглощать экзосомы циркулирующими моноцитами *in vivo*.

Фиг. 11. Диаграммы Венна, отображающие белки, присутствующие в субпопуляциях раковых клеток поджелудочной железы и их соответствующих экзосомах. Белок экстрагировали из субпопуляций клеточной линии рака поджелудочной железы ТЗМ4 и их соответствующих экзосом. Масс-спектрометрию использовали для идентификации белков, экспрессируемых в клетках и соответствующих экзосомах. Для каждого образца был определен список белков. Сравнение между клетками и соответствующими экзосомами идентифицированных белков, присутствующих в клетках, но не присутствующих в экзосомах (левая сторона каждой пары кругов), белки, присутствующие в клетках и соответствующих экзосомах (пересечение между кругами), и белки, обогащенные экзосомами по сравнению с клетками (правая сторона каждой пары кругов). Клетки экспрессируют белки, которые не обнаруживаются в экзосомах. Кроме того, по сравнению с клетками экзосомы содержат обогащенные белки.

#### Подробное описание сущности изобретения

Несмотря на современный стандарт клинической практики, при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы (PDAC) пациенты с метастатическими заболеваниями имеют медиану выживаемости шесть месяцев, и только 6, 7% выживают после пяти лет (Siegel et al., 2014; Howlader et al., 2013). Поэтому PDAC остро нуждается в эффективных новых лекарственных средствах. Генетический анализ PDAC демонстрирует, что мутации в семействе RAS малых ГТФаз (KrasG12/D/R/V) встречаются у 70%-96% пациентов (Biankin et al., 2012; Hruban et al., 1993; Almoguera et al., 1988; Chang et al., 2014) и являются ключевыми факторами роста опухоли и метастазирования (Ying et al., 2012; Hingorani et al., 2005; Collins et al., 2012a; Collins et al., 2012b; Eser et al., 2014). Генетические манипуляции у мышей показали, что ослабление онкогенного KRAS изменяет прогрессирование опухоли (Ying et al., 2012; Collins et al., 2012a; Collins et al., 2012b; Smakman et al., 2005). Сигналинг онкогенного KRAS и повышенная активность RAS появлялись как иницирующие факторы неоплазии поджелудочной железы (Collins et al., 2012a; Eser et al., 2014; Ji et al., 2009); однако RAS остается неустранимой мишенью и проблемой терапии (Gysin et al., 2011). В данном документе экзосомы, полученные из нормальных фибробластов, были сконструированы таким образом, чтобы нести РНК-интерференционную (РНКи) полезную нагрузку на

целевой онкогенной KRAS<sup>G12D</sup>. Экзосомы, содержащие ТТ-связанную миРНК или кшРНК против Kras<sup>G12D</sup>, эффективно поступали в раковые клетки и специфически подавляли онкогенный Ras, ослабляли активацию ERK, ингибировали пролиферацию и индуцировали апоптоз раковых клеток. Системная доставка экзосом с карго, нацеленным на Kras<sup>G12D</sup>, демонстрирует устойчивую локализацию поджелудочной железы и подавление ранее установленных ортотопических опухолей поджелудочной железы человека, а также опухолей в генно-инженерных мышечных моделях (GEMM) рака поджелудочной железы вместе с улучшением выживаемости по сравнению с липосомами, содержащими ми/кшРНК и экзосомы с конструкциями скремблированных РНК. Опухоли мышей, получавших лечение экзосомами, содержащими ми/кшРНК, демонстрировали значительное снижение нисходящих Ras-сигналов медиаторов, и улучшали гистопатологические данные с нормальной гистологией поджелудочной железы. Экзосомы, полученные из фибробластов человека, демонстрируют сходную эффективность с экзосомами, полученными из фибробластов мыши, в PDAM GEMM, что позволяет предположить, что экзосомы, специфичные для пациента, могут не потребоваться для обеспечения эффективной доставки РНК при минимизации потенциальных токсических побочных эффектов. Такая стратегия предлагает новые и эффективные средства для подавления экспрессии онкогенных генов и нисходящего сигналинга с минимальными побочными эффектами.

CD47 (интегрин-ассоциированный белок) представляет собой трансмембранный белок, который экспрессируется в большинстве тканей и клеток. CD47 является лигандом для сигнального регуляторного белка-альфа (SIRP- $\alpha$ ), который экспрессируется на фагоцитах, таких как макрофаги и дендритные клетки. Активированный CD47-SIRP- $\alpha$  инициирует каскад трансдукции сигналов, который ингибирует фагоцитоз. Введение моноклонального антитела против CD47 мышам перед введением экзосом или лечением экзосомами с CD47-нейтрализующим антителом перед введением как блока CD47, так и для поглощения экзосом макрофагами или моноцитами. Таким образом, экспрессия CD47 на поверхности экзосом предотвращает фагоцитоз макрофагами.

#### I. Наночастицы на основе липидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения наночастица на основе липидов представляет собой липосому, экзосому, липидные препараты или другую наночастицу на основе липидов, такую как везикулу на основе липидов (например, везикулу DOTAP: холестерин (DOTAP - 1,2-диолеил-3-(триметиламмоний)пропан). Наночастицы на основе липидов могут быть положительно заряжены, отрицательно заряжены или нейтральны.

#### A. Липосомы.

"Липосома" представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем генерации замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с двухслойной мембраной, обычно содержащие фосфолипид и внутреннюю среду, которая обычно содержит водную композицию. Липосомы, представленные в данном документе, включают однослойные липосомы, многослойные липосомы и мультивезикулярные липосомы. Липосомы, предложенные в данном документе, могут быть положительно заряжены, отрицательно заряжены или нейтрально заряжены. В некоторых вариантах реализации изобретения липосомы являются нейтральными в заряде.

Многослойная липосома имеет множество липидных слоев, разделенных водной средой. Такие липосомы образуются спонтанно, когда липиды, содержащие фосфолипиды, суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестраиванию перед образованием закрытых структур и задерживают воду и растворенные растворенные вещества между липидными бислоями. Липофильные молекулы или молекулы с липофильными областями могут также растворяться или связываться с липидным бислоем.

В конкретных аспектах полипептид, нуклеиновая кислота или низкомолекулярное лекарственное средство могут быть, например, инкапсулированы в водную внутреннюю часть липосомы, перемежающейся внутри липидного бислоя липосомы, прикрепленной к липосоме через связывающую молекулу, которая представляет собой связанный как с липосомой, так и с полипептидом/нуклеиновой кислотой, захваченный в липосому, в комплексе с липосомой или тому подобное.

Липосома, используемая в соответствии с настоящими вариантами реализации изобретения, может быть изготовлена различными способами, как известно специалисту в данной области техники. Например, фосфолипид, такой как, например, нейтральный фосфолипид диолеил-фосфатидилхолин (DOPC), растворяют в трет-бутаноле. Затем липид(ы) смешивают с полипептидом, нуклеиновой кислотой и/или другим компонентом(ами). Твин-20 добавляют к липидной смеси, так что Твин-20 составляет около 5% от массы композиции. К этой смеси добавляют избыток трет-бутанола, так что объем трет-бутанола составляет по меньшей мере 95%. Смесь перемешивают, замораживают в бане с сухим льдом/ацетоном и лиофилизируют в течение ночи. Лиофилизированный препарат хранится при -20°C и может использоваться до трех месяцев. При необходимости лиофилизированные липосомы восстанавливают в 0,9% солевом растворе.

Альтернативно, липосома может быть получена путем смешивания липидов в растворителе в кон-

тейнере, например, в стеклянной колбе из грушевидной формы. Контейнер должен иметь объем, в десять раз превышающий объем ожидаемой суспензии липосом. Используя роторный испаритель, растворитель удаляют при приблизительно 40°C при отрицательном давлении. Растворитель обычно удаляют в течение от около 5 мин до 2 ч в зависимости от желаемого объема липосом. Композицию можно дополнительно высушить в эксикаторе под вакуумом. Высушенные липиды обычно забраковывают примерно через 1 неделю из-за тенденции ухудшаться со временем.

Высушенные липиды могут быть гидратированы при приблизительно 25-50 ммоль/л фосфолипида в стерильной, апиrogenной воде, встряхивая до тех пор, пока вся липидная пленка не будет ресуспендирована. Насыщенные водой липосомы можно затем разделять на аликвоты, каждый помещают во флакон, лиофилизируют и герметизируют под вакуумом.

Высушенные липиды или лиофилизированные липосомы, полученные, как описано выше, могут быть дегидратированы и восстановлены в растворе белка или пептида и разбавлены до соответствующей концентрации подходящим растворителем, например, DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко). Затем смесь энергично встряхивают в вихревой мешалке. Неинкапсулированные дополнительные материалы, такие как агенты, включая, но не ограничиваясь этим, гормоны, лекарственные средства, конструкции нуклеиновых кислот и тому подобное, удаляют центрифугированием при 29000×g и промывают липосомальные гранулы. Промытые липосомы ресуспендируют при соответствующей общей концентрации фосфолипидов, например, примерно 50-200 ммоль/л. Количество инкапсулированного дополнительного материала или активного агента может быть определено в соответствии со стандартными методами. После определения количества дополнительного материала или активного агента, инкапсулированного в препарат липосомы, липосомы можно развести до соответствующих концентраций и хранить при 4°C до использования. Фармацевтическая композиция, содержащая липосомы, обычно включает стерильный, фармацевтически приемлемый носитель или растворитель, такой как вода или солевой раствор.

Дополнительные липосомы, которые могут быть полезны в настоящих вариантах реализации изобретения, включают катионные липосомы, например, как описано в WO 02/00435A1, патенте США № 596016, заявке на патент США 2004/0208921, WO 03/015757A1, WO04029213A2, патенте США 5030453 и патенте США 6680068, из которых настоящим включены в качестве ссылки в полном объеме без отказа от ответственности.

При получении таких липосом может быть использован любой протокол, описанный в данном документе, или, как известно, специалисту в данной области техники. Дополнительные неограничивающие примеры получения липосом описаны в патентах США 4728578, 4728575, 4737323, 4533254, 4162282, 4310505 и 4921706; международных заявках PCT/US85/01161 и PCT/US89/05040, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения наночастица на основе липидов представляет собой нейтральную липосому (например, DOPC-липосому). "Нейтральные липосомы" или "незаряженные липосомы", как используется в данном документе, определяются как липосомы, имеющие один или более липидных компонентов, которые дают практически нейтральный чистый заряд (по существу не заряженный). Под "по существу нейтральными" или "по существу незаряженными" подразумевается, что немногие, если таковые имеются, липидные компоненты в данной популяции (например, популяция липосом) включают заряд, который не аннулируется противоположным зарядом другого компонента (т.е. менее 10% компонентов включают неаннулированный заряд, более предпочтительно менее 5% и наиболее предпочтительно менее 1%). В некоторых вариантах реализации изобретения нейтральные липосомы могут включать в основном липиды и/или фосфолипиды, которые сами по себе являются нейтральными в физиологических условиях (то есть примерно при pH 7).

Липосомы и/или липидные наночастицы согласно данному варианту реализации изобретения могут содержать фосфолипид. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть использован один вид фосфолипида при создании липосом (например, нейтральный фосфолипид, такой как DOPC, может быть использован для получения нейтральных липосом). В других вариантах реализации изобретения можно использовать более одного вида фосфолипидов для создания липосом. Фосфолипиды могут быть из природных или синтетических источников. Фосфолипиды включают, например, фосфатидилхолины, фосфатидилглицерины и фосфатидилэтаноламины; поскольку фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины незаряжены в физиологических условиях (то есть примерно при pH 7), эти соединения могут быть особенно полезны для получения нейтральных липосом. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфолипидный DOPC используют для получения незаряженных липосом. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть использован липид, который не является фосфолипидом (например, холестерином).

Фосфолипиды включают глицерофосфолипиды и некоторые сфинголипиды. Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, диолеилфосфатидилохолин ("DOPC"), яичный фосфатидилхолин ("EPC"), дилаурилоилфосфатидилхолин ("DLPC"), димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("MPPC"), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин ("PMPC"), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин ("PSPC"), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("SPPC"), дилаурило-

илфосфатидилглицерин ("DLPG"), димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерин ("DSPG"), дистеароил сфингомиелин ("DSSP"), дистеароилфосфатидилэтанолламин ("DSPE"), диолеилфосфатидилглицерин ("DOPG"), димиристоилфосфатидная кислота ("DMPA"), дипальмитоилфосфатидная кислота ("DPPA"), димиристоилфосфатидилэтанолламин ("DMPE"), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин ("DPPE"), димиристоилфосфатидилсерин ("DMPS"), дипа (DPSP), димистилфосфатидилхолин ("ДФК"), 1,2-дистеароил-sn-глицеролин ("ДФС"), фосфатидилсерин головного мозга ("БПС"), мозговой сфингомиелин ("ВСП"), дипальмитоилсфингомиелин 3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DBPC"), 1,2-диметилксиоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), диолеилфосфатидилэтанолламин ("DOPE"), пальмитоилфосфатидилхолин ("POPC"), пальмитоилфосфатидилэтанолламин ("POPE"), лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин и дилинолеилфосфатидилхолин.

#### В. Экзосомы.

Термины "микровезикула" и "экзосомы", используемые в данном документе, относятся к мембранной частице, имеющей диаметр (или наибольший размер, где частицы не являются сфероидными) от около 10 до около 5000 нм, более типично от 30 нм до 1000 нм и наиболее типично между около 50 нм и 750 нм, причем по меньшей мере часть мембраны экзосомы получают непосредственно из клетки. Чаще всего экзосомы будут иметь размер (средний диаметр), который составляет до 5% от размера донорной клетки. Поэтому особенно рассматриваемые экзосомы включают те, которые просачиваются из клетки.

Экзосомы могут быть обнаружены или выделены из любого подходящего типа образца, такого как, например, биологические жидкости организма. Используемый в данном документе термин "выделенный" относится к отделению из его естественной среды и предназначен для включения по меньшей мере частичной очистки и может включать существенную очистку. Используемый в данном документе термин "образец" относится к любому образцу, подходящему для способов, предусмотренных настоящим изобретением. Образец может быть любым образцом, который включает экзосомы, подходящие для обнаружения или выделения. Источники образцов включают кровь, костный мозг, плевральную жидкость, перитонеальную жидкость, спинномозговую жидкость, мочу, слюну, амниотическую жидкость, злокачественный асцит, бронхоальвеолярную лаважную жидкость, синовиальную жидкость, грудное молоко, пот, слезы, совместную жидкость и бронхиальные моющие средства. В одном аспекте образец представляет собой образец крови, включая, например, целую кровь или любую фракцию, или ее компонент. Образец крови, подходящий для использования согласно данному изобретению, может быть экстрагирован из любого известного источника, который включает клетки крови или ее компоненты, такие как венозные, артериальные, периферические, ткани, пуповины и тому подобное. Например, образец может быть получен и обработан с использованием общеизвестных и обычных клинических методов (например, процедуры забора и обработки цельной крови). В одном аспекте примерный образец может быть периферической кровью, взятой у субъекта с раком.

Экзосомы также могут быть выделены из образцов тканей, таких как операционные образцы, образцы биопсии, ткани, фекалии и культивируемые клетки. При выделении экзосом из тканевых источников может потребоваться гомогенизировать ткань, чтобы получить суспензию одной клетки, а затем при помощи лизиса клеток высвободить экзосомы. При выделении экзосом из образцов тканей важно выбрать процедуры гомогенизации и лизиса, которые не приводят к нарушению экзосом. Экзосомы, рассматриваемые в данном документе, предпочтительно выделяют из биологической жидкости в физиологически приемлемом растворе, например, в забуференном физиологическом растворе, в среде для роста, в различных водных средах и т.д.

Экзосомы могут быть выделены из свежесобранных образцов или из образцов, которые были заморожены или охлаждены. В некоторых вариантах реализации изобретения экзосомы могут быть выделены из среды для культивирования клеток. Хотя это и необязательно, экзосомы повышенной чистоты могут быть получены, если образцы жидкости очищают до осаждения с помощью объем-исключающего полимера для удаления любого дебриса из образца. Способы очистки включают центрифугирование, ультрацентрифугирование, фильтрацию или ультрафильтрацию.

Наиболее типично экзосомы могут быть выделены многочисленными способами, хорошо известными в данной области техники. Одним из предпочтительных способов является дифференциальное центрифугирование из биологических жидкостей или супернатантов клеточной культуры. Типичные способы выделения экзосомы описаны в работе (Losche et al., 2004; Mesri and Altieri, 1998; Morel et al., 2004). Альтернативно, экзосомы также могут быть выделены при помощи проточной цитометрии, как описано в (Combes et al., 1997).

Один из общепринятых протоколов для выделения экзосом включает ультрацентрифугирование, часто в сочетании с градиентами плотности сахарозы или сахарозными подушками для удерживания на поверхности относительно экзосом низкой плотности. Выделение экзосом путем последовательных дифференциальных центрифугирований осложняется возможностью перекрытия распределений по размерам с другими микровирусами или макромолекулярными комплексами. Кроме того, центрифугирование может обеспечить недостаточные возможности для отделения везикул на основе их размеров. Однако последовательные центрифугирования в сочетании с ультрацентрифугированием в градиенте плотно-

сти сахарозы могут обеспечить высокое извлечение экзосом.

Выделение экзосомы по размеру, с применением альтернатив процедур ультрацентрифугирования, является еще одним вариантом. Сообщалось об успешной очистке экзосом с использованием ультрафильтрационных процедур, которые занимают меньше времени, чем ультрацентрифугирование, и не требуют использования специального оборудования. Аналогичным образом, доступен коммерческий набор (EXOMIR™, Bioo Scientific), который позволяет удалять клетки, тромбоциты и клеточный дебрис на одном микрофилтре и захватывать везикулы размером более 30 нм на втором микрофилтре с использованием положительного давления для подачи жидкости. Однако для этого процесса экзосомы не восстанавливаются, их содержащая РНК, содержащаяся в них, непосредственно экстрагируется из материала, попавшего на второй микрофилтр, который затем может быть использован для ПЦР-анализа. Протоколы на основе ВЭЖХ могут потенциально позволить получать экзосомы высокой чистоты, хотя для этих процессов требуется специальное оборудование и их трудно масштабировать. Существенная проблема заключается в том, что как кровь, так и среда для культивирования клеток содержат большое количество наночастиц (некоторые невезикулярные) в том же диапазоне размеров, что и экзосомы. Например, некоторые микроРНК могут содержаться внутри внеклеточных белковых комплексов, а не экзосомы; однако обработка протеазой (например, протеиназа К) может быть проведена для устранения любого возможного загрязнения "экстраэкзосомальным" белком.

В другом варианте реализации изобретения экзосомы, полученные из раковых клеток, могут быть захвачены методами, обычно используемыми для обогащения образца экзосомами, такими как иммуноспецифические взаимодействия (например, иммуномагнитный захват). Иммуномагнитный захват, также известный как иммуномагнитная сепарация клеток, обычно включает прикрепление антител, направленных на белки, обнаруженные на конкретном типе клеток, на мелкие парамагнитные гранулы. Когда гранулы, покрытые антителом, смешивают с образцом, таким как кровь, они прикрепляются к конкретной клетке и окружают ее. Затем образец помещают в сильное магнитное поле, заставляя гранулы оседать в одну сторону. После удаления крови, захваченные клетки остаются с гранулами. Многие вариации этого общего метода хорошо известны в данной области техники и пригодны для использования в выделении экзосом. В одном примере экзосомы могут быть прикреплены к магнитным гранулам (например, альдегидные/сульфатные гранулы), а затем к смеси добавляют антитело для распознавания эпитопа на поверхности экзосом, которые прикреплены к шарикам. Иллюстративные белки, которые, как известно, обнаружены на экзосомах, полученных из раковых клеток, включают 6-й член А-подсемейства АТФ-связывающих кассетных белков; (ABCA6), тетраспанин-4 (TSPAN4), SLIT и NTRK-подобный белок 4 (SLITRK4), предполагаемый протокадгерин бета-18 (PCDHB18), миелоидный клеточный поверхностный антиген CD33 (CD33) и глипикан-1 (GPC1). Экзосомы, полученные из клетки рака, могут быть выделены с использованием, например, антител или аптамеров к одному или более из этих белков.

Используемый в данном документе анализ включает любой способ, который позволяет осуществлять прямую или косвенную визуализацию экзосом и может быть выполнен *in vivo* или *ex vivo*. Например, анализ может включать, но не ограничиваясь ими, микроскопическую или цитометрическую детекцию *ex vivo* и визуализацию экзосом, связанных с твердым субстратом, проточной цитометрией, флуоресцентной визуализацией и тому подобное. В иллюстративном аспекте экзосомы, полученные из раковых клеток, детектируются с использованием антител, направленных на один или более 6-ой член А-подсемейства АТФ-связывающих кассетных белков (ABCA6), тетраспанин-4 (TSPAN4), SLIT и NTRK-подобный белок 4 (SLITRK4), предполагаемый протокадгерин бета-18 (PCDHB18), миелоидный клеточный поверхностный антиген CD33 (CD33), глипикан-1 (GPC1), гистон H2A type 2-A (HIST1H2AA), гистон H2A 1-A типа (HIST1H1AA), гистон H3. 3 (H3F3A), гистон H3. 1 (HIST1H3A), гомолог белка 37 "цинковые пальцы" (ZFP37), субъединица ламинина бета-1 (LAMB1), подобный антиген тубулоинтерстициального нефрита (TINAGL1), пероксиредоксин-4 (PRDX4), цепь коллагена альфа-2 (IV) (COL4A2), предполагаемый белок C3P1 (C3P1), гемицентин-1 (HMCN1), предполагаемый рофилин-2-подобный белок (RHPN2P1), белок 62, содержащий повторяющийся домен анкирина (ANKRD62), белок 42, содержащий трехкомпонентный мотив (TRIM42), соединительный плакоглобин (JUP), цепь тубулина бета-2B (TUBB2B), эндорибонуклеазный дайсер (DICER1), E3 убикитвин лигаза TRIM71 (TRIM71), катанин p60 субъединица А-подобного 2, содержащая АТФазу (KATNAL2), белок S100-A6 (S100A6), белок 3, содержащий 5'-нуклеотидазный домен (NT5DC3), валин-тРНК лигаза (VARS), казрин (KAZN), EELAV-подобный белок 4 (ELAVL4), цинковый палец RING 166 (RNF166), FERM и PDZ доменсодержащий белок 1 (FRMPD1), 78 кДа регулируемый глюкозой белок (HSPA5), субъединицу 6A комплекса частиц транспортного белка (TRAPPC6A), сквален-монооксигеназа (SQLE), белок гена предрасположенности 101 к опухоли (TSG101), вакуолярный белок, сортирующего гомолога 28 (VPS28), негативный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN), изобутирил(изопропанол)-CoA-дегидрогеназу, митохондриальную (ACAD8), регуляторную субъединицу 6B 26S-протеасомы (PSMC4), фактор удлинения гамма-1 (EEF1G), титин (TTN), тирозин-протеинфосфатаза 13 типа (PTPN13), триозофосфатизомеразу (TP11), или карбоксипептидазу E (CPE) и затем связываются с твердым субстратом и/или визуализируются с использованием микроскопического или цитометрического детектирования.

Следует отметить, что не все белки, экспрессирующие в клетке, обнаруживаются в экзосомах, сек-

ретируемых этой клеткой (см. фиг. 11). Например, кальнексин, GM130 и LAMP-2 представляют собой все белки, экспрессируемые в клетках MCF-7, но не обнаруженные в экзосомах, секретируемых клетками MCF-7 (Baietti et al., 2012). В качестве другого примера, одно исследование показало, что 190/190 пациентов с проточной аденокарциномой поджелудочной железы имели более высокие уровни GPC1+ экзосом, чем здоровые контрольные группы (Melo et al., 2015, который включен в данный документ в виде ссылки во всей ее полноте). Примечательно, что только 2,3% здоровых контролей, в среднем, имели GPC1+ экзосомы.

#### 1. Иллюстративный протокол для сбора экзосом из культуры клеток.

На 1 сутки достаточное количество клеток (например, около пяти миллионов клеток) в колбах T225 в средах, содержащих 10% FBS, так что на следующие сутки примерно 70% клеток будут конфлюентными. На 2-е сутки распылите среду на клетки, дважды промойте клетки PBS и затем добавьте 25-30 мл базовых сред (то есть PenStrep или FBS) к клеткам. Инкубируйте клетки в течение 24-48 часов. Рекомендуется 48-часовая инкубация, но некоторые линии клеток более чувствительны к бессывороточной среде и поэтому время инкубации должно быть уменьшено до 24 часов. Обратите внимание, что FBS содержит экзосомы, которые сильно искажают результаты NanoSight.

В 3/4сутки соберите среду и центрифугируйте при комнатной температуре в течение пяти минут при 800×g для осаждения мертвых клеток и крупного дебриса. Перенесите супернатант в новые конические пробирки и снова центрифугируйте среду в течение 10 минут при 2000×g для удаления других крупного дебриса и крупных везикул. Пропустите среду через 0,2 мкм фильтр и затем аликвоты в ультрацентрифужные пробирки (например, 25×89 мм Beckman Ultra-Clear) с использованием 35 мл на пробирку. Если объем среды на пробирку составляет менее 35 мл, заполните оставшуюся часть пробирки PBS до 35 мл. Ультрацентрифугируйте среду в течение 2-4 ч при 28000 об/мин при 4°C с использованием ротора SW 32 Ti (k-фактор 266, 7, RCF (относительная сила центрифугирования) макс. 133907). Осторожно слейте супернатант, пока не останется примерно 1 дюйм жидкости.

Наклоните трубку и дайте остальным средам медленно поступать в аспирационную пипетку. При необходимости осадок экзосом можно повторно суспендировать в PBS, а ультрацентрифугирование при 28000 об/мин повторить в течение 1-2 ч для дальнейшей очистки популяции экзосом.

Наконец, ресуспендируйте осадок экзосом в 210 мкл PBS. Если для каждого образца есть несколько ультрацентрифужных пробирок, используйте один и тот же 210 мкл PBS для последовательного ресуспендирования любого осадка экзосом. Для каждого образца берут 10 мкл и добавляют к 990 мкл H<sub>2</sub>O для использования в анализе отслеживания наночастиц. Используйте оставшиеся 200 мкл суспензии, содержащие экзосомы, для последующих процессов или сразу помещайте на хранение при -80°C.

#### 2. Примерный протокол экстракции экзосом из образцов сыворотки.

Во-первых, оставьте образцы сыворотки оттаивать на льду. Затем разведите 250 мкл образцов бесклеточной сыворотки в 11 мл PBS; отфильтруйте через фильтр с 0,2 мкм порами. Ультрацентрифугируйте разбавленный образец при 150000×g в течение ночи при 4°C. На следующий день осторожно слейте супернатант и промойте осадок экзосом в 11 мл PBS. Выполните второй цикл ультрацентрифугирования при 150000×g при 4°C в течение 2 ч. Наконец, осторожно слейте супернатант и ресуспендируйте осадок экзосом в 100 мкл PBS для анализа.

#### С. Примерный протокол электропорации экзосом и липосом.

Смешивайте  $1 \times 10^8$  экзосом (измеряется при помощи анализа NanoSight) или 100 нм липосом (например, приобретаются у Encapsula Nano Sciences) и 1 мкг миРНК (Qiagen) или кшРНК в 400 мкл буфера для электропорации (1, 15 ммоль/л фосфата калия, pH 7, 2, 25 ммоль/л хлорида калия, 21% Optiprep). Электропорируйте экзосомы или липосомы с помощью 4-миллиметровой кюветы (см., например, Alvarez-Erviti et al., 2011; El-Andaloussi et al., 2012). После электропорации обработайте экзосомы или липосомы безпротеазной РНКазой с последующим добавлением  $10 \times$  концентрированного ингибитора РНКазы. Наконец, промойте экзосомы или липосомы с помощью PBS при ультрацентрифугировании, как описано выше.

#### II. Диагностика, прогноз и лечение заболеваний.

Детекция, выделение и характеристика экзосом, полученных из раковых клеток, с использованием способов согласно изобретению, полезны в оценке прогноза рака и контроле терапевтической эффективности для раннего выявления неудачной терапии, которая может привести к рецидиву заболевания. Кроме того, анализ экзосом, полученных из раковых клеток в соответствии с изобретением, позволяет выявить ранний рецидив у предсимптоматических пациентов, которые прошли курс терапии. Это возможно, потому что присутствие экзосом, полученных из раковых клеток, может сопутствовать и/или коррелировать с прогрессированием опухолей и ее распространением, слабым ответом на терапию, рецидивом заболевания и/или снижением выживаемости в течение определенного периода времени. Таким образом, подсчет и характеристика экзосом, полученных из раковых клеток, обеспечивают методы разделения пациентов по базовым характеристикам, которые предсказывают первоначальный риск и последующий риск, основанный на ответе на терапию.

Экзосомы, полученные из раковых клеток, выделенные в соответствии с описанными в данном до-

кументе способами, могут быть проанализированы для диагностики или прогнозирования рака у субъекта. Таким образом, способы данного изобретения могут быть использованы, например, для оценки больных раком и тех, кому грозит рак. В любом из способов диагностики или прогнозирования, описанных в данном документе, может быть использовано или присутствие, или отсутствие одного или более показателей рака, таких как геномная мутация или рак-специфический маркер поверхности экзосом, или любого другого расстройства, диагноза или прогноза.

В одном аспекте образец крови отбирают у пациента, и экзосомы, полученные из раковых клеток, детектируют и/или выделяют, как описано в данном документе. Например, экзосомы могут быть помечены одним или более антителами, или аптамерами, которые связываются с 6-ым членом А-подсемейства АТФ-связывающих кассетных белков (ABCA6), тетраспанином-4 (TSPAN4), SLIT и NTRK-подобным белком 4 (SLITRK4), предполагаемым протокадгерином бета-18 (PCDHB18), миелоидным клеточным поверхностным антигеном CD33 (CD33) и/или глипикином-1 (GPC1), и антитела могут иметь ковалентно связанную флуоресцентную метку. Затем может быть проведен анализ, чтобы определить количество и характеристику экзосом в клетках, полученных из раковых клеток, в образце, и из этого измерения можно определить количество экзосом, полученных из раковых клеток, присутствующих в исходном образце крови. Экзосомы, идентифицированные как экзосомы, полученные из раковых клеток, могут быть проверены как таковые путем обнаружения второго (или более) маркера, который, как известно, избирательно или специфически обнаруживается в экзосомах, полученных из раковых клеток, такого как, например, гистон H2A 2-A типа (HIST1H2AA), гистон H2A1-A типа (HIST1H1AA), гистон H3.3 (H3F3A), гистон H3.1 (HIST1H3A), гомолог белка 37 "цинковые пальцы" (ZFP37), субъединица ламинина бета-1 (LAMB1), подобный антиген тубулоинтерстициального нефрита (TINAGL1), перокси-редоксин-4 (PRDX4), цепь коллагена альфа-2 (IV) (COL4A2), предполагаемый белок C3P1 (C3P1), гемичес-тин-1 (HMCN1), предполагаемый рофилин-2-подобный белок (RHPN2P1), белок 62, содержащий повторяющийся домен анкирина (ANKRD62), белок 42, содержащий трехкомпонентный мотив (TRIM42), соединительный плакоглобин (JUP), цепь тубулина бета-2B (TUBB2B), эндорибонуклеазный дайсер (DICER1), E3 убикитин лигаза TRIM71 (TRIM71), катании р60 субъединица А-подобного 2, содержащая АТФазу (KATNAL2), белок S100-A6 (S100A6), белок 3, содержащий 5'-нуклеотидазный домен (NT5DC3), валин-тРНК лигаза (VARS), казрин (KAZN), ELAV-подобный белок 4 (ELAVL4), цинковый палец RING 166 (RNF166), FERM и PDZ доменсодержащий белок 1 (FRMPD1), 78 кДа регулируемый глюкозой белок (HSPA5), субъединица 6A комплекса частиц транспортного белка (TRAPPC6A), сквален-монооксигеназа (SQLE), белок гена предрасположенности 101 к опухоли (TSG101), вакуолярный белок, сортирующего гомолога 28 (VPS28), негативный регулятор рецептора простагландина F2 (PTGFRN), изобутирил(изопропанол)-CoA-дегидрогеназа, митохондриальная (ACAD8), регуляторная субъединица 6B 26S-протеасомы (PSMC4), фактор удлинения гамма-1 (EEF1G), титин (TTN), тирозин-протеинфосфатаза 13 типа (PTPN13), триозофосфатизомерераза (TPI1) или карбоксипептидаза E (CPE). Количество экзосом, полученных из раковых клеток, может быть определено с помощью цитометрических или микроскопических методов визуального количественного определения и характеристики экзосом. Экзосомы, полученные из раковых клеток, могут быть детектированы и количественно определены другими способами, известными в данной области техники (например, ИФА).

В различных аспектах анализ количества и характеристик экзосом, полученных из раковых клеток субъекта, может проводиться в течение определенного времени в разные интервалы времени для оценки прогрессирования и патологии у субъекта. Например, анализ можно проводить с регулярными интервалами, такими как одни сутки, двое суток, трое суток, одна неделя, две недели, один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев или один год, чтобы отслеживать уровень и характеристики экзосом, полученных из раковых клеток, в виде временной зависимости. В случае с существующими раковыми больными это обеспечивает полезный показатель прогрессирования заболевания и помогает врачам в принятии соответствующих терапевтических решений, основанных на увеличении, уменьшении или отсутствии изменений в экзосомах, полученных из раковых клеток. Любое увеличение, будь то в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз или выше, в экзосомах, полученных из раковых клеток, со временем ухудшает прогноз пациента и является ранним показателем того, что пациент должен изменить терапию. Аналогично, любое увеличение, будь то в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз или выше, указывает на то, что пациент должен пройти дальнейшую диагностику, например, визуализацию для дальнейшей оценки прогноза и ответа на терапию. Любое уменьшение, будь то в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз или выше, в экзосомах, полученных из раковых клеток, со временем демонстрирует стабилизацию заболевания и ответ пациента на терапию и является показателем того, чтобы не изменять терапию. Для тех, кто подвержен риску развития рака, внезапное увеличение числа обнаруженных экзосом, полученных из раковых клеток, может обеспечить раннее предупреждение о том, что у пациента развилась опухоль, тем самым обеспечивая раннюю диагностику. В одном варианте реализации изобретения обнаружение экзосом, полученных из раковых клеток, увеличивается со стадией рака.

В любом из предложенных в данном документе способов может быть также проведен дополнительный анализ для описания характеристик экзосом, полученных из раковых клеток, для обеспечения дополнительной клинической оценки. Например, в дополнение к анализу изображений и количественным

измерениям могут применяться методы ПЦР, такие как мультиплексирование с праймерами, специфичными к конкретным маркерам рака, для получения информации, такой как тип опухоли, из которой возникли экзосомы, полученные из раковых клеток, метастатическое состояние, и степени злокачественности. Кроме того, анализ ДНК или РНК, протеомный анализ или метаболомный анализ могут быть выполнены в качестве средства для оценки дополнительной информации о характеристике рака пациента.

Например, дополнительный анализ может обеспечить данные, достаточные для определения чувствительности субъекта к определенному терапевтическому режиму или для определения эффективности кандидата-агента при лечении рака. Соответственно, данное изобретение относится к способу определения чувствительности субъекта к определенному терапевтическому режиму или определению эффективности агента-кандидата при лечении рака путем обнаружения/выделения экзосом субъекта, полученных из раковых клеток, как описано в данном документе, и анализа указанных экзосом, полученных из раковых клеток. Например, как только лекарственную терапию применяют к пациенту, можно определить эффективность лекарственной терапии с использованием способов согласно изобретению. Например, образец, взятый у пациента до лекарственной терапии, а также один или более образцов, взятых у пациента одновременно или после лекарственной терапии, могут быть обработаны с использованием способов согласно изобретению. Сравнивая результаты анализа каждого обработанного образца, можно определить эффективность лекарственной терапии или ответа пациента на агент. Таким образом, ранняя идентификация может быть выполнена из неудачных соединений или в начале проверки может быть выполнена из перспективных соединений.

Некоторые аспекты данного изобретения предусматривают лечение пациента экзосомами, которые экспрессируют или содержат терапевтический агент или диагностический агент. Используемый в данном документе "терапевтический агент" представляет собой атом, молекулу или соединение, которое полезно для лечения рака или других патологических состояний. Примеры терапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, лекарственные средства, химиотерапевтические агенты, терапевтические антитела и фрагменты антител, токсины, радиоизотопы, ферменты, нуклеазы, гормоны, иммуномодуляторы, антисмысловые олигонуклеотиды, хелаторы, соединения бора, фотоактивные агенты и красители. "Диагностический агент", используемый в данном документе, представляет собой атом, молекулу или соединение, которое полезно для диагностики, обнаружения или визуализации болезни. В соответствии с описанными в данном документе вариантами реализации изобретения диагностические агенты могут включать, но не ограничиваются ими, радиоактивные вещества (например, радиоизотопы, радионуклиды, радиоактивные метки или радиоизотопы), красители, контрастирующие агенты, флуоресцентные соединения или молекулы, биолюминесцентные соединения или молекулы, ферменты и усиливающие агенты (например, парамагнитные ионы).

В некоторых аспектах терапевтический рекомбинантный белок может представлять собой белок, имеющий активность, которая была потеряна в клетке пациента, белок, имеющий желаемую ферментативную активность, белок, обладающий желательной ингибиторной активностью и т.д. Например, белок может быть фактором транскрипции, ферментом, белковым токсином, антителом, моноклональным антителом и т.д. Моноклональное антитело может специфически или избирательно связываться с внутриклеточным антигеном. Моноклональное антитело может ингибировать функцию внутриклеточного антигена и/или нарушать взаимодействие белок-белок. Другие аспекты данного изобретения обеспечивают диагностику заболевания на основе присутствия экзосом, полученных из раковых клеток, в образце пациента.

Как известно, экзосомы содержат механизм, необходимый для завершения транскрипции мРНК и трансляции белка (см. PCT/US2014/068630, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), нуклеиновые кислоты мРНК или ДНК, кодирующие терапевтический белок, могут быть трансфицированы в экзосомы. Альтернативно, сам терапевтический белок может быть электропорирован в экзосомы или включен непосредственно в липосому. Иллюстративные терапевтические белки включают, но не ограничиваются ими, белок-супрессор опухолевого роста, пептиды, аналоги белка дикого типа мутантного белка, репаративный белок ДНК, протеолитический фермент, белковый токсин, белок, который может ингибировать активность внутриклеточного белка, белок, который может активировать активность внутриклеточного белка или любого белка, потеря функции которого должна быть восстановлена. Конкретные примеры иллюстративных терапевтических белков включают 123F2, Abcb4,

Abcc1, Abcg2, Actb, Ada, Ahr, Akt, Akt1, Akt2, Akt3, Amhr2, Anxa7, Apc, Ar, Atm, Axin2, B2m, Bard1, Bcl2l1, Becn1, Bhlha5, Bin1, Blm, Braf, Brca1, Brca2, Brca3, Braf, Brcata, Brinp3, Bripl, Bub1b, Bwscrla, Cadm3, Cascl, Casp3, Casp7, Casp8, Cav1, Ccam, Ccnd1, Ccr4, Ccs1, Cd28, Cdc25a, Cd95, Cdh1, Cdkn1a, Cdkn1b, Cdkn2a, Cdkn2b, Cdkn2c, Cftr, Chek1, Chek2, Crcl1, Crcl10, Crcl11, Crcl2, Crcl3, Crcl4, Crcl5, Crcl6, Crcl7, Crcl8, Crcl9, Ctnnb1, Cts1, Cyp1a1, Cyp2a6, Cyp2b2, Cyld, Dcc, Dkl1, Dicer1, Dmtf1, Dnmt1, Dpc4, E2f1, Eaf2, Eef1a1, Egfr, Egfr4, Erbb2, Erbb4, Ercc2, Ercc6, Ercc8, Errfil, Esr1, Etv4, Faslg, Fbxo10, Fcc, Fgfr3, Fntb, Foxm1, Foxn1, Fus1, Fzd6, Fzd7, Fzrl, Gadd45a, Gast, Gna12, Gpc1, Gpr124, Gpr87, Gprc5a, Gprc5d, Grb2, Gstm1, Gstm5, Gstpl, Gsttl, H19, H2afx, Hck, Lims1, Hdac, Hexa, Hic1, Hin1, Hmnr, Hnpcc8, Hprr, Hras, Htatip2, Il1b, Il10, Il2, Il6, Il8rb, Inha, Itgav, Jun, Jak3, Kit, Klf4, Kras, Kras2, Kras2b, Lig1, Lig4, Lkb1, Lmo7, Lncr1, Lncr2, Lncr3, Lncr4, Ltbp4, Luca1, Luca2, Lyz2, Lzts1, Mad1l1, Mad2l1, Madr2/Jv18, Mapk14, Mcc, Mcm4, Men1, Men2, Met, Mgat5, Mif, Mlh1, Mlh3, Mmac1, Mmp8, Mnt, Mpo, Msh2, Msh3, Msh6, Msmb, Mthfr, Mts1, Mutyh, Myh11, Nat2, Nbn, Ncoa3, Neil1, Nf1, Nf2, Nfe2l1, Nhej1, Nkx2-1, Nkx2-9, Nkx3-1, Npr12, Nqo1, Nras, Nudt1, Ogg1, Oxgr1, p16, p19, p21, p27, p27mt, p57, p14ARF, Palb2, Park2, Pgg1b, Pgr, Pi3k, Pik3ca, Piwil2, Pl6, Pla2g2a, Plg, Plk3, Pms1, Pms2, Pold1, Pole, Ppard, Pparg, Ppfia2, Ppmd, Prdm2, Prdx1, Prkar1a, Ptch, Pten, Prom1, Psca, Ptch1, Ptfla, Ptger2, Ptpn13, Ptprr, Rara, Rad51, Rassf1, Rb, Rb1, Rb1cc1, Rb12, Recgl4, Ret, Rgs5, Rhoc, Rint1, Robo1, Rpl38, S100a4, SCGB1A1, Skp2, Smad2, Smad3, Smad4, Smarcb1, Smo, Snx25, Spata13, SrpX, Ssic1, Sstr2, Sstr5, Stat3, St5, St7, St14, Stk11, Suds3, Tap1, Tbx21, Terc, Tnf, Tp53, Tp73, Trpm5, Tsc2, Tsc1, Vhl, Wrn, Wt1, Wt2, Xrcc1, Xrcc5, Xrcc6, and Zac1.

Одним конкретным типом белка, который может быть желательно ввести во внутриклеточное пространство больной клетки, является антитело (например, моноклональное антитело). Такое антитело может нарушать функцию внутриклеточного белка и/или нарушать внутриклеточное взаимодействие белок-белок. Иллюстративные мишени таких моноклональных антител включают, но не ограничиваются ими, белки, вовлеченные в путь РНКи, теломеразу, факторы транскрипции, которые контролируют течение болезни, киназы, фосфатазы, необходимые для синтеза ДНК, белок, необходимый для трансляции белка. Конкретные примеры иллюстративных целевых терапевтических антител включают белки, кодируемые следующими генами: Dicer, Ago1, Ago2, Trbp, Ras, raf, wnt, btk, Bcl-2, Akt, Sis, src, Notch, Stathmin, mdm2, abl, hTERT, c-fos, c-jun, c-myc, erbB, HER2/Neu, HER3, VEGFR, PDGFR, c-kit, c-met, c-ret, flt3, API, AML1, axl, alk, fins, fps, gip, lck, Stat, Hox, MLM, PRAD-I, и trk. В дополнение к моноклональным антителам также рассматривается любой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, Fab-фрагмент, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, пептид, диатело, триатело или минитело. Любые такие антитела или фрагмент антитела могут быть или гликозилированными, или агликозилированными.

Как известно, экзосомы содержат дайсер и активный комплекс RISC (РНК-индуцируемый комплекс выключения гена), процессируемый РНК (см. PCT Publ. WO 2014/152622, который включен в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте), кшРНК, трансфицированная в экзосомы, может со-

зреть в связанной с RISC-комплексом кшРНК с экзосомами. Альтернативно, зрелая миРНК может трансфицироваться в экзосомы или липосомы. Таким образом, в качестве примера, следующие классы возможных целевых генов, которые могут быть использованы в способах данного изобретения для модуляции или ослабления экспрессии целевого гена: варианты генов развития дикого типа или мутанты (например, молекулы адгезии, ингибиторы циклинзависимой киназы, члены семейства Wnt, члены семейства Рах, члены семейства Winged helix, члены семейства Нох, цитокины/лимфокины и их рецепторы, факторы роста или дифференцировки и их рецепторы, нейротрансмиттеры и их рецепторы), гены-супрессоры опухолей (например, APC, CYLD, HIN-1, KRAS2b, p16, p19, p21, p27, p27mt, p53, p57, p73, PTEN, Rb, утереглобин, Skp2, BRCA-1, BRCA-2, CHK2, CDKN2A, DCC, DPC4, MADR2/JV18, MEN1, MEN2, MTS1, NF1, NF2, VHL, WRN, WT1, CFTR, C-CAM, CTS-1, zac1, ras, MMAC1, FCC, MCC, FUS1, Gene 26 (CACNA2D2), PL6, бета\* (BLU), Luca-1 (HYAL1), Luca-2 (HYAL2), 123F2 (RASSF1), 101F6, ген 21 (NPRL2) или ген, кодирующий полипептид SEM A3), проапоптотические гены (например, CD95, каспаза -3, Вах, Bag-1, CRADD, TSSC3, bax, hid, Bak, MKP-7, PARP, bad, bcl-2, MST1, bbc3, Sax, BIK и BID), цитокины (например, ГМ-КСФ, Г-КСФ, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-28, ИЛ-29, ИЛ-30, ИЛ-31, ИЛ-32, ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TФР- $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ТцФР (тромбоцитарный фактор роста) и mda7), онкогены (например, ABLI, BCL1, BCL6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS1, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3 и YES) и ферменты (например, ацилпереносающий белок десатуразы ACP (ацилпереносающий белок) и гидроксилазы, АДФ-глюкозо-пирофосфорилазы, АТФазы, алкогольдегидрогеназы, амилазы, амилоглюкозидазы, каталазы, целлюлазы, циклооксигеназы, декарбоксилазы, декстраназы, эстеразы, ДНК и РНК-полимеразы, галактозидазы, глюканазы, глюкозооксидазы, ГТФазы, геликазы, гелицеллюлазы, интегразы, инвертазы, изомеразы, киназы, лактазы, липазы, липоксигеназы, лизоцимы, нуклеазы, пектинэстеразы, пероксидазы, фосфатазы, фосфолипазы, фосфорилазы, полигалактуроназы, протеиназы и пептидазы, пулланазы, рекомбиназы, обратные транскриптазы, топоизомеразы, ксиланазы). В некоторых случаях кш/миРНК может быть сконструирована так, чтобы специально нацеливать на мутантную версию гена, экспрессированного в раковой клетке, не влияя на экспрессию соответствующей версии дикого типа. Фактически любая ингибиторная нуклеиновая кислота, которая может быть применена в композициях и способах согласно данному изобретению, если такая ингибиторная нуклеиновая кислота была обнаружена любым средством, является проверенным ингибитором представляющего интерес белка.

При разработке РНКи необходимо учитывать несколько факторов, таких как природу миРНК, продолжительность эффекта сайленсинга и выбор системы доставки. Для получения эффекта РНКи, миРНК, которая вводится в организм, обычно будет содержать экзонные последовательности. Кроме того, процесс РНКи зависит от гомологии, поэтому последовательности должны быть тщательно подобраны таким образом, чтобы максимизировать генную специфичность, минимизируя при этом возможность перекрестной интерференции между гомологичными, но не ген-специфическими последовательностями. Предпочтительно, чтобы миРНК проявляла более 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или даже 100% идентичности между последовательностью миРНК и геном, подлежащего ингибированию. Последовательности менее чем на около 80% идентичные целевому гену существенно менее эффективны. Таким образом, чем выше гомология между миРНК и ингибируемым геном, тем меньше вероятность экспрессии несвязанных генов.

В дополнение к терапевтическим средствам на основе белков и нуклеиновых кислот экзосомы могут быть использованы для доставки низкомолекулярных лекарственных средств или отдельно, или в сочетании с любым терапевтическим средством на основе белка или нуклеиновой кислоты. Иллюстративные низкомолекулярные лекарственные средства, которые предназначены для использования в настоящих вариантах реализации изобретения, включают, но не ограничиваются ими, токсины, химиотерапевтические агенты, агенты, которые ингибируют активность внутриклеточного белка, агенты, которые активируют активность внутриклеточных белков, агенты для профилактики рестеноза, агенты для лечения заболеваний почек, агенты, используемые при синдроме Шарко, агенты, используемые для лечения гипотензии и шока, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, антиангинальные средства, антиаритмические средства, антигипертензивные средства, антагонисты рецепторов ангиотензина 2, антитромбоцитарные препараты, селективные  $\beta$ -блокаторы  $\beta_1$ , бета-блокирующие агенты, растительные лекарственные средства для сердечно-сосудистой системы, блокаторы кальциевых каналов, сердечно-сосудистые/диагностика, агонисты центральных альфа-2, средства, расширяющие коронарные сосуды, диуретики и ингибиторы почечных канальцев, ингибиторы нейтральной эндопептидазы/ангиотензинпревращающего фермента, периферические сосудорасширяющие средства, вещества, открывающие калиевые каналы, соли калия, противосудорожные средства, противорвотные средства, противоопухолевые средства, противопаркинсонические средства, спазмолитики, стимуляторы головного мозга, средства, которые могут быть применены при лечении травмы, агенты, которые могут приме-

няться при лечении болезни Альцгеймера или деменции, агенты, которые могут применяться при лечении мигрени, агенты, которые могут быть применены при лечении нейродегенеративных заболеваний, агенты, которые могут быть применены при лечении саркомы капюши, агенты, которые могут быть применены при лечении СПИДа, химиотерапевтические агенты рака, агенты, которые могут применяться при лечении иммунных расстройств, агенты, которые могут применяться при лечении психических расстройств, анальгетиков, эпидуральных и интратекальных анестетиков, общих, локальных, регионарных нервно-мышечных блокаторов, адренолиновый/адренокортикотропный анестетик, вводимый при премедикации, анаболические стероиды, агенты, которые могут применяться при лечении диабета, агонисты дофамина, гормон роста и аналоги, гипергликемические агенты, гипогликемические агенты, пероральные препараты инсулина, лекарственные формы для парентерального применения большого объема (lvps), липид-изменяющие агенты, метаболические исследования и врожденные нарушения обмена веществ, питательные вещества/аминокислоты, пищевые lvps, лекарственные средства против ожирения (анорексии), соматостатин, тиреоидные агенты, вазопрессин, витамины, кортикостероиды, муколитические агенты, противовоспалительные средства для легких, легочные сурфактанты, антациды, антихолинергические средства, противодиарейные препараты, противорвотные средства, холелитолитические средства, агенты против воспалительного заболевания кишечника, агенты против синдрома раздраженного кишечника, печеночные агенты, металлические хелаторы, различные желудочные секреторные агенты, агенты против панкреатита, ферменты поджелудочной железы, простагландины, простагландины, ингибиторы протонной помпы, склерозирующие агенты, сукральфат, антипрогестины, контрацептивы, оральные контрацептивы, непероральные дофаминимитические препараты, эстрогены, гонадотропины, агонисты GnRH, антагонисты GnRH, окситоциты, прогестины, агенты, действующие в матке, препараты против анемии, антикоагулянты, антифибринолитики, антитромбоцитарные средства, антитромбиновые препараты, коагулянты, фибринолитики, гематология: ингибиторы гепарина, металлические хелаторы, простагландины, витамин К, антиандрогены, аминогликозиды, антибактериальные агенты, сульфонамиды, цефалоспорины, клиндамицины, дерматологические препараты, детергенты, эритромицины, антигельминтные средства, противогрибковые средства, противомаларийные средства, антимикробактериальные агенты, противопаразитарные средства, противопротозойные средства, средства против трихомонад, противотуберкулезные агенты, иммуномодуляторы, иммуностимулирующие агенты, макролиды, антипаразитарные агенты, кортикостероиды, ингибиторы циклооксигеназы, блокаторы ферментов, иммуномодуляторы для ревматических заболеваний, ингибиторы металлопротеиназы, нестероидные противовоспалительные средства, анальгетики, жаропонижающие средства, альфа-адренергические агонисты/блокаторы, антибиотики, противовирусные препараты, бета-адреноблокаторы, ингибиторы карбоангидразы, кортикостероиды, регуляторы иммунной системы, ингибиторы тучных клеток, нестероидные противовоспалительные средства и простагландины.

Экзосомы также могут использоваться для доставки диагностических агентов. Иллюстративные диагностические агенты включают, но не ограничиваются ими, агенты для улучшения магнитно-резонансной томографии, агенты для позитронно-эмиссионной томографии, радиоактивные диагностические агенты, радиоактивные терапевтические агенты, рентгеноконтрастные агенты, радиофармацевтические препараты, ультразвуковые средства для визуализации и агенты для ангиографической диагностики.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к любому человеку или пациенту, по отношению к которым применяют данные способы. Как правило, субъект является человеком, хотя, как будет понятно специалистам в данной области техники, субъект может быть животным. Таким образом, другие животные, включая млекопитающих, таких как грызуны (включая мышей, крыс, хомячков и морских свинок), кошек, собак, кроликов, сельскохозяйственных животных (включая коров, лошадей, коз, овец, свиней и т.д.) и приматов (включая обезьян, шимпанзе, орангутанов и горилл) включены в определение субъекта.

"Лечение" и "лечить" относятся к введению или применению терапевтического агента к субъекту или выполнению процедуры, или способу воздействия на субъект с целью получения терапевтического эффекта в заболевании или состоянии здоровья. Например, лечение может включать применение химиотерапии, иммунотерапии или лучевой терапии, хирургического вмешательства или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое действие" или "терапевтически эффективный" относится ко всему, что способствует или улучшает самочувствие субъекта в отношении медицинского лечения этого патологического состояния. Это включает, но не ограничивается этим, снижение частоты или тяжести признаков, или симптомов заболевания. Например, лечение рака может включать, например, снижение инвазивности опухоли, снижение скорости роста рака или предотвращение метастазирования. Лечение рака также может относиться к увеличению выживаемости пациента с раком.

Используемый в данном документе термин "рак" может быть использован для описания солидной опухоли, метастатического рака или неметастатического рака. В некоторых вариантах реализации изобретения рак может возникать в мочевом пузыре, крови, кости, костном мозге, мозге, груди, толстой

кишке, пищеводе, двенадцатиперстной кишке, тонком кишечнике, толстой кишке, толстой кишке, прямой кишке, анусе, десне, голове, почке, печени, легком, носоглотке, шее, яичнике, поджелудочной железе, предстательной железе, коже, желудке, яичке, языке или матке.

Рак может специфически иметь следующий гистологический тип, хотя он не ограничивается ими: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантоклеточная и веретеноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома, злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидная кистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный коли-полипоз; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярно-клеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; некапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; карцинома эндометрия; рак из придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; аденокарцинома серных желез; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидноклеточный рак; инфильтративно-протоковая карцинома; медуллярная карцинома; дольковая карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, маммарный; ацинозно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома, злокачественная; стромальная опухоль яичника, злокачественная; текома, злокачественная; аденома граафовых пузырьков, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома из клеток Сертолли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; адренокортикоидная аденома яичника, злокачественная; параганглиома, злокачественная; внемаммарная параганглиома, злокачественная; феохромоцитома; злокачественная гломангиома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментированном невусе; эпителиоидная меланома; синий невус, злокачественный; саркома; фибросаркомы; фиброзная гистиоцитома, злокачественная; злокачественная миксома, липосаркома; леймиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; мулерианская смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы, злокачественная; опухоль бреннера, злокачественная; филлоидная цистосаркома, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дисгермиома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; зоб, злокачественный; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома капюши; гемангиоперицитомы, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластическая одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; мозжечковая саркома; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; ольфакторная нейробластома; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; нейриллемомы, злокачественная; зернистоклеточная миобластома, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; Ходжкина; парагранулома; злокачественная лимфома, из малых лимфоцитов; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; фунгоидная гранулема; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; саркома тучных клеток; иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника; лейкемия; лимфоидный лейкоз; плазмноклеточный лейкоз; эритролейкоз; лимфосаркома, клеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; полиморфно-клеточная саркома; и волосатоклеточный лейкоз. Тем не менее, также признано, что данное изобретение также может быть использовано для лечения нераковых заболеваний (например, микоз, бактериальная инфекция, вирусная инфекция, нейродегенеративное заболевание и/или генетическое расстройство).

Термины "контактируют" и "подвергаются" при применении к клетке, используются в данном документе для описания процесса, посредством которого терапевтический агент доставляется в целевую клетку или помещается в прямое контактное положение с целевой клеткой. Для достижения уничтожения клеток, например, один или более агентов доставляются в клетку в количестве, эффективном для уничтожения клетки или препятствующем ее делению.

Эффективный ответ пациента или "отзывчивость" пациента на лечение относится к клиническому или терапевтическому эффекту, обеспечиваемому пациенту, которому угрожает или который страдает от

болезни или расстройства. Такой эффект может включать клеточные или биологические ответы, полный ответ, частичный ответ, стабилизация заболевания (без прогрессирования или рецидива) или ответ с последующим рецидивом. Например, эффективным ответом может быть уменьшение размера опухоли или выживаемость без прогрессирования у пациента с диагнозом рака.

Результаты лечения могут быть предсказаны и контролироваться, и/или пациенты, получающие пользу от такого лечения, могут быть идентифицированы или выбраны с помощью способов, описанных в данном документе.

Что касается лечения неопластического состояния, в зависимости от стадии неопластического состояния, лечение неопластического состояния включает один или более следующих методов: хирургическое вмешательство для удаления неопластической ткани, лучевую терапию и химиотерапию. Другие схемы лечения могут комбинироваться с введением противораковых агентов, например, терапевтических композиций и химиотерапевтических агентов. Например, пациент, который должен лечиться с использованием таких противораковых агентов, может также получать лучевую терапию и/или может подвергаться хирургическому вмешательству.

Для лечения болезни соответствующая доза терапевтической композиции будет зависеть от типа болезни, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и хода болезни, истории болезни пациента и реакции на агент, а также на усмотрение лечащего врача. Агент соответствующим образом вводят пациенту один раз или в течение курса лечения.

Терапевтические и профилактические методы и композиции могут быть представлены в объединенном количестве, эффективном для достижения желаемого эффекта. Ткань, опухоль или клетка могут контактировать с одной или более композициями, или фармакологическим препаратом(ами), содержащим один или более агентов, или путем приведения в контакт ткани, опухоли и/или клетки с двумя или более различными композициями или препаратами. Кроме того, предполагается, что такая комбинированная терапия может использоваться в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, хирургическим лечением или иммунотерапией.

Введение в комбинации может включать одновременное введение двух или более агентов в одной и той же лекарственной форме, одновременное введение в отдельных лекарственных формах и отдельное введение. То есть данная терапевтическая композиция и другой терапевтический агент могут быть приготовлены вместе в одной и той же лекарственной форме и введены одновременно. Альтернативно, данная терапевтическая композиция и другой терапевтический агент могут одновременно вводиться, причем оба агента присутствуют в отдельных препаратах. В другом варианте терапевтический агент можно вводить сразу после другого терапевтического агента или наоборот. В отдельном протоколе применения данной терапевтической композиции и другого терапевтического агента могут вводиться через несколько минут или несколько часов друг от друга, или через несколько суток друг от друга.

Первая противоопухолевая терапия (например, экзосомы, которые экспрессируют рекомбинантный белок или рекомбинантный белок, выделенный из экзосом), может применяться до, во время, после или в различных комбинациях по сравнению со второй противораковой терапией. Введения могут выполняться в интервале от одновременного введения до нескольких минут, до нескольких суток, до нескольких недель. В вариантах реализации изобретения где первую терапию обеспечивают пациенту отдельно от второй терапии, можно было бы, как правило, гарантировать, чтобы значительный промежуток времени не истек между временем каждой доставки, так что два соединения по-прежнему могли бы оказывать предпочтительный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагается, что пациенту можно обеспечить первую терапию и вторую терапию в пределах от 12 около до 24 или 72 часа друг от друга и, более конкретно, в течение около 6-12 часов друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно увеличить период времени для лечения, при котором период между соответствующими введениями составит от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8).

В некоторых вариантах реализации изобретения курс лечения длится 1-90 суток или более (этот диапазон включает промежуточные дни). Предполагается, что один агент может быть предоставлен в любые сутки от 1-х суток до 90-х суток (этот диапазон включает промежуточные дни) или любую их комбинацию, а другой агент предоставляется в любой день от 1-х суток до 90-х суток (этот такой диапазон включает промежуточные дни) или любую их комбинацию. В течение одних суток (24-часовой период) пациенту может быть назначено одно или более введений агента(ов). Кроме того, после курса лечения предполагается, что существует период времени, при котором не проводится противораковая терапия. Этот период может длиться 1-7 суток и/или 1-5 недель и/или 1-12 месяцев или более (этот диапазон включает промежуточные дни), в зависимости от состояния пациента, например, прогноза, силы, здоровья и т.д. Ожидается, что циклы лечения будут повторяться по мере необходимости.

Могут использоваться различные комбинации. Для примера ниже первая противораковая терапия - "А", а вторая противораковая терапия - "В":

A/B/AB/A/BB/B/AA/A/BA/B/BB/A/AA/B/B/BB/A/B/V  
B/V/B/AB/B/A/BA/A/B/BA/B/A/BA/B/B/AB/B/A/A  
V/A/B/AB/A/A/BA/A/A/BB/A/A/AA/B/A/AA/A/B/A

При введении любого соединения или терапии согласно данному изобретению пациенту будут следовать общим протоколам для введения таких соединений с учетом токсичности, если таковая имеется, у агентов. Поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения существует этап контроля токсичности, который можно отнести к комбинированной терапии.

#### 1. Химиотерапия.

В соответствии с настоящим изобретением может быть использовано большое количество химиотерапевтических агентов. Термин "химиотерапия" относится к применению лекарств для лечения рака. "Химиотерапевтический агент" используется для обозначения соединения или композиции, которая вводится при лечении рака. Эти агенты или лекарственные средства классифицируются по их способу действия внутри клетки, например, независимо от того, влияют ли они на какой-либо этап клеточного цикла. Альтернативно, агент может быть охарактеризован на основе его способности напрямую сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические aberrации, влияя на синтез нуклеиновых кислот.

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоклен, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметиллолмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатаинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекана); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая синтетические аналоги адозелезина, карцелезина и бизелезина); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембичин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихимицин, особенно калихимицин гамма II и калихимицин омега II); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамидин; а также хромофор неокарциностаина и связанные с ними хромопротеиновые энедииновые хромофоры-антибиотики, аклациномизины, актиномицин, ауторницин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, ногаларцицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурумицин, келамицин, родорубицин, стрептогрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, таких как деноптерин, птероптерин и триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флуксуридин; андрогены, такие как каластоун, пропионат дромонастола, эпитиотонол, мепитиостан и тестостерон; антагонисты функции надпочечников, такие как митотан и трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK-полисахаридный комплекс; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин, трихотечены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин), уретан, виндезин, дакарбазин, манномустин, митобронит, митолактол, пипроброман, гацитозин, арабинозид ("Ара-С"), циклофосфамид, таксоиды, например паклитаксел и доцетаксел гемцитабин, 6-тиогуанин, меркаптопурин, координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин, винбластин, платина, этопозид (VP-16), ифосфамид, митоксантрон, винкрестин, винорелбин, новатрон, тенипозид, эудратрек, дауномицин, аминоптерин, кселода, ибандронат, иринотекан (например, CPT-11), ингибитор топоизомеразы RFS 2000, дифторометалгилорнитин (DMFO), ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, капецитабин, карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабены, навелбин, ингибиторы фарнезил-протеинтрансферазы, трансплатина и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ.

#### 2. Радиотерапия.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают то, что широко известно, как  $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов в опухолевые клетки. Также рассматриваются другие формы факторов повреждения ДНК, такие как микроволновое радиоизлучение, протонное облучение (патенты США 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Скорее всего, все эти факторы влияют на широкий диапазон повреждений ДНК, предшественников ДНК, на

репликацию и восстановление ДНК, а также на сборку и сохранение хромосом. Диапазоны доз для рентгеновских лучей варьируются от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до единичных доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз для радиоизотопов сильно различаются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа излучения, а также поглощения неопластических клеток.

### 3. Иммунотерапия.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что дополнительные иммунотерапии могут использоваться в комбинации или в сочетании со способами согласно изобретению. В контексте лечения рака, иммунотерапия, как правило, основывается на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и уничтожения раковых клеток. Ритуксимаб (Rituxan®) является таким примером. Иммуногенным эффектором может быть, например, антитело, специфичное для определенного маркера на поверхности опухолевой клетки. Только антитело может выполнять функцию эффектора в терапии или может рекрутировать другие клетки, чтобы фактически влиять на уничтожение клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтический, радионуклидный, цепь рицина А, холерный токсин, коклюшный токсин и т.д.) и служит в качестве специфического агента. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или косвенно взаимодействует с мишенью опухолевой клетки. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки.

В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна иметь некоторый маркер, который поддается нацеливанию, то есть не присутствует в большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте данного изобретения. Общие опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, антиген сиалил-Льюиса, MucA, MucB, PLAP, ламининовый рецептор, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противораковых эффектов с иммуномодулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, в том числе: цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12, ГМКСФ, ИФНгамма, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8 и факторы роста, такой как лиганд FLT3.

Примерами иммунотерапии, которые в данное время исследуются или используются, являются иммуноадьюванты, например *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США 5801005 и 5739169, Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); цитокиновая терапия, например, интерфероны  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$ , ИЛ-1, ГМКСФ и ФНО (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); генная терапия, например ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США 5830880 и 5844945); и моноклональные антитела, например, анти-CD20, анти-ганглиозид GM2 и анти-p185 (Hollander, 2013; Hanibuchi et al., 1998; патент США 5824311). Предполагается, что одна или более противораковых терапий могут использоваться с описанными в данном документе терапиями антителами.

### 4. Хирургия.

Примерно 60% людей с раком будут подвергаться хирургическому вмешательству какого-либо типа, которое включает профилактическое, диагностическое или этапное, излечивающее и паллиативное хирургическое вмешательство. Излечивающее хирургическое вмешательство включает резекцию, при которой все или часть раковой ткани физически удаляют, вырезают и/или разрушают и могут использовать в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение согласно данному изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли лечение хирургическим путем включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и микроскопически контролируемую операцию (микрографическая хирургия Моса).

При удалении части или всех раковых клеток, ткани или опухоли может быть образована полость в организме. Лечение может быть выполнено путем перфузии, прямой инъекции или местной аппликации на область с дополнительной противораковой терапией. Такое лечение может повторяться, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти способы лечения могут также иметь различные схемы применения.

### 5. Другие агенты.

Предполагается, что другие агенты могут использоваться в комбинации с некоторыми аспектами данного изобретения для улучшения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные агенты включают агенты, которые влияют на повышение количества рецепторов клеточной поверхности и щелевых соединений, цитостатических и дифференцирующих агентов, ингибиторов клеточной адгезии, агентов, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптотическим индукторам или другим биологическим агентам. Увеличение межклеточного сигналинга за счет увеличения количества щелевых соединений увеличило бы антигиперпролиферативный эффект на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах реализации изобретения цитостатиче-

ские или дифференцирующие агенты могут использоваться в комбинации с некоторыми аспектами данного изобретения для улучшения антигиперпролиферативной эффективности лечения. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность данного изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и ловастатина. Кроме того, предполагается, что другие агенты, повышающие чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело с225, могут быть использованы в комбинации с некоторыми аспектами данного изобретения для улучшения эффективности лечения.

### III. Фармацевтические композиции.

Предполагается, что экзосомы, которые экспрессируют или содержат рекомбинантный белок, ингибиторную РНК и/или низкомолекулярное лекарственное средство препарат, могут вводиться системно или локально для ингибирования роста опухолевых клеток и, наиболее предпочтительно, для уничтожения раковых клеток у больных раком с местно-распространенным или метастатическим раком. Их можно вводить внутривенно, интратекально и/или внутрибрюшинно. Их можно вводить отдельно или в комбинации с антипролиферативными препаратами. В одном варианте реализации изобретения их вводят для снижения раковой нагрузки у пациента до операции или других процедур. Альтернативно, они могут быть введены после операции, чтобы гарантировать, что любой оставшийся рак (например, рак, который операция не устранил) не будет жизнеспособен.

Не предполагается, что данное изобретение ограничено конкретным свойством терапевтического препарата. Например, такие композиции могут быть представлены в составах вместе с физиологически переносимой жидкостью, гелем, твердыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Эти терапевтические препараты можно вводить млекопитающим для ветеринарного применения, например, домашним животным, и для клинического применения у людей аналогично другим терапевтическим агентам. В общем, рекомендуемая доза, требуемая для терапевтической эффективности, будет варьироваться в зависимости от типа использования и способа введения, а также от конкретных требований отдельных субъектов.

В тех случаях, когда предполагаются клинические применения, может быть необходимо приготовить фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантные белки и/или экзосомы, в форме, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, фармацевтические композиции, которые могут быть парентеральными препаратами, могут содержать эффективное количество одного или более рекомбинантных белков и/или экзосом, и/или дополнительных агентов, растворенных или диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе. Выражения "фармацевтические или фармакологически приемлемые" относятся к молекулярным субстанциям и композициям, которые не приводят к неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при введении животному, например, человеку, когда это необходимо. Препарат фармацевтической композиции, содержащий рекомбинантный белок и/или экзосомы, как раскрыто в данном документе, или дополнительные активные ингредиенты, как показано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей полноте для всех целей. Кроме того, для назначения животным (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление по биологическим стандартам FDA.

Кроме того, в соответствии с некоторыми аспектами данного изобретения композиция, подходящая для введения, может быть представлена в фармацевтически приемлемом носителе с инертным разбавителем или без него. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все водные растворители (например, воду, спиртовые/водные растворы, этанол, солевые растворы, парентеральные носители, такие как хлорид натрия, декстроза Рингера и т.д.), неводные растворители (например, жиры, масла, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), растительное масло и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат), липиды, липосомы, дисперсионные среды, покрывающие вещества (например, лецитин), поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные или противогрибковые агенты, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы, парабены (например, метилпарабен, пропилпарабен), хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тимеросал или их комбинации), изотонические агенты (например, сахара и хлорид натрия), агенты, замедляющие абсорбцию (например, моностеарат алюминия и желатин), соли, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственного средства, гели, смолы, наполнители, связующие вещества, вспомогательные вещества, разрыхляющие средства, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, красители, жидкие и питательные наполнители, такие как вещества и их комбинации, как известно специалисту в данной области техники. Носитель должен быть ассимилируемым и содержать жидкие, полутвердые, то есть пасты, или твердые носители. Кроме того, при желании композиции могут содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, стабилизирующие агенты или pH-буферные средства. pH и точная концентрация различных компонентов в фармацевтической композиции корректируются в соответствии с хорошо известными параметрами. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрывающего вещества, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных

веществ.

Фармацевтически приемлемый носитель, в частности, предназначен для введения человеку, хотя в некоторых вариантах реализации изобретения может быть желательно использовать фармацевтически приемлемый носитель, который готовят для введения животному, отличному от человека, но это неприемлемо (например, из-за правительственных правил) для введения человеку. Предполагается его применение в терапевтических или фармацевтических композициях, за исключением того, что любой обычный носитель является несовместимым с активным ингредиентом (например, вредный для реципиента или для терапевтической эффективности композиции, содержащейся в ней). В соответствии с некоторыми аспектами данного изобретения композицию объединяют с носителем любым удобным и практичным способом, то есть при помощи растворения, суспендирования, эмульгирования, подмешивания, инкапсулирования, абсорбции и тому подобного. Такие методики являются обычными для специалистов в данной области техники.

Некоторые варианты реализации данного изобретения могут содержать различные типы носителей в зависимости от того, следует ли вводить их в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и должны ли они быть стерильными для пути введения, такого как инъекция. Композиции можно вводить внутривенно, внутрикочно, чресочно, интратекально, внутриартериально, внутрибрюшинно, интраназально, интравагинально, внутривисцерально, внутримышечно, подкожно, через слизистую оболочку, перорально, местно, локально, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции) путем инъекции, путем инфузии, путем непрерывной инфузии, путем локализованной перфузии непосредственно через клетки-мишени, при помощи катетера, через лаваж, в липидных композициях (например, липосомах) или другими способами или любой комбинацией вышеуказанных, которые описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 18th Ed., 1990, включенной в данный документ посредством ссылки.

Активные соединения могут быть приготовлены для парентерального введения, например, для инъекций через внутривенные, внутримышечные, подкожные или даже внутрибрюшинные пути введения. Таким образом, варианты реализации изобретения включают парентеральные препараты. Обычно такие композиции могут быть приготовлены в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть приготовлены твердые формы, пригодные для использования для получения растворов или суспензий при добавлении жидкости перед введением; и препараты также могут быть эмульгированы.

В соответствии с конкретными вариантами реализации изобретения парентеральные препараты могут содержать экзосомы, как описано в данном документе, вместе с одним или более растворенными веществами и/или растворителями, одним или более буферными агентами, и/или одним или более противомикробными агентами, или любой их комбинацией. В некоторых аспектах растворитель может содержать воду, смешивающиеся с водой растворители, например, этиловый спирт, жидкий полиэтиленгликоль и/или пропиленгликоль, и/или несмешивающиеся с водой растворители, такие как твердые масла, включая, например, кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло и/или кунжутное масло. В некоторых вариантах реализации изобретения растворенные вещества могут содержать один или более противомикробных агентов, буферов, антиоксидантов, регуляторы тоничности, криопротекторов и/или лиопротекторов.

Противомикробные агенты согласно данному изобретению могут включать те, которые приведены в другом месте данного изобретения, а также бензиловый спирт, фенол, ртуть и/или парабены. Противомикробные агенты могут включать хлорид бензалкония, бензетония хлорид, бензиловый спирт, бромопол, центримид, цетилпиридиний хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексэтидин, имидомочевина, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути, пропиленгликоль и/или тимеросал, или любую их комбинацию. В различных аспектах противомикробные агенты могут присутствовать в концентрации, необходимой для обеспечения стерильности, которая требуется для фармацевтических агентов. Например, агенты могут присутствовать в бактериостатических или фунгистатических концентрациях в препаратах, например, препаратах, содержащихся в упаковках для многократного приема. В различных вариантах реализации изобретения агенты могут быть консервантами и/или могут присутствовать в достаточной концентрации во время применения для предотвращения размножения микроорганизмов, таких как микроорганизмы, непреднамеренно введенные в препарат, во время, например, набора части содержимого с использованием подкожной иглы и шприца. В различных аспектах агенты имеют максимальный объем и/или пределы концентрации (например, 0,01% нитрат фенилртути и тимеросал, 0,01% хлорид бензетония и хлорид бензалкония, 0,5% фенол или крезол и 0,5% хлорбутанол). В различных случаях агенты, такие как нитрат фенилртути, используют в концентрации 0,002%, 0,18% метил-п-гидроксибензоат и 0,02% пропилен-п-гидроксибензоат в комбинации, и 2% бензиловый спирт также может быть применен в соответствии с вариантами реализации изобретения. Противомикробные агенты могут также включать 0,5% гексилрезорцинол, 0,1% бензоат фенилртути и/или терапевтические соединения.

Антиоксиданты в соответствии с данным изобретением могут включать аскорбиновую кислоту и/или ее соли и/или натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Регуляторы тоничности, как описано в данном документе, могут включать электролиты и/или моно- или дисахариды. Криопротекторы и/или лиопротекторы являются добавками, которые защищают биофармацевтические препара-

раты от вредных эффектов, вызванных замораживанием и/или высушиванием продукта во время лиофилизации. Криопротекторы и/или лиопротекторы могут включать сахара (нередуцирующие), такие как сахароза или трегалоза, аминокислоты, такие как глицин или лизин, полимеры, такие как жидкий полиэтиленгликоль или декстран, и полиолы, такие как маннит или сорбит, все из них являются возможными крио- или лиопротекторами. Варианты реализации данного изобретения могут также включать противогрибковые агенты, такие как бутилпарабен, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бензойная кислота, сорбат калия, бензоат натрия, пропионат натрия и/или сорбиновая кислота или любую их комбинацию. Дополнительные растворы и противомикробные агенты, буферы, антиоксиданты, регуляторы тоничности, криопротекторы и/или лиопротекторы и их характеристики, которые могут быть использованы в соответствии с данным изобретением, а также аспекты способов получения заявленных парентеральных препаратов описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 21-е изд., 2005, например, глава 41, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте для всех целей.

Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включая кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить. Она также должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Терапевтические средства могут быть составлены в виде композиции в форме свободного основания, нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли, например, соли, образованные с помощью свободных аминогрупп белковой композиции, или которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота и тому подобное. Соли, образованные с помощью свободных карбоксильных групп, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа; или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин и тому подобное. После приготовления растворы вводят способом, совместимым с лекарственным средством, и в таком количестве, которое терапевтически эффективно. Композиции легко вводятся во множестве лекарственных форм, такие как составленные для парентерального введения, такие как инъекционные растворы или аэрозоли для доставки в легкие, или составленные для перорального введения, такие как капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

В конкретном варианте реализации данного изобретения композицию объединяют или тщательно перемешивают с полутвердым или твердым носителем. Смешивание может осуществляться любым удобным способом, таким как перемалывание.

Стабилизаторы также могут быть добавлены в процессе смешивания, чтобы защитить композицию от потери терапевтической активности, то есть денатурации в желудке. Примеры стабилизаторов для использования в композиции включают буферы, аминокислоты, такие как глицин и лизин, углеводы, такие как декстроза, манноза, галактоза, фруктоза, лактоза, сахароза, мальтоза, сорбит, маннит и т.д.

В других вариантах реализации данное изобретение может относиться к использованию фармацевтической композиции с липидным носителем, содержащей один или более липидов и водный растворитель. Используемый в данном документе термин "липид" будет определяться как включающий любой из широкого спектра веществ, который характерно нерастворим в воде и экстрагируется органическим растворителем. Этот широкий класс соединений хорошо известен специалистам в данной области техники, и как термин "липид" используется в данном документе, он не ограничивается какой-либо конкретной структурой. Примеры включают соединения, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные. Липид может быть природным или синтетическим (т. е. сконструированным или произведенным человеком). Однако липид обычно является биологическим веществом. Биологические липиды хорошо известны в данной области техники и включают, например, нейтральные жиры, фосфолипиды, фосфоглицериды, стероиды, терпены, лизолипиды, гликофинголипиды, гликолипиды, сульфатиды, липиды с эфирными и сложноэфирными связями жирных кислот, полимеризуемые липиды и их комбинации. Конечно, соединения, отличные от тех, которые конкретно описаны в данном документе, которые понимаются специалистом в данной области техники как липиды, также охватываются при помощи композиций и способов.

Специалист в данной области техники будет знаком с рядом методик, которые могут быть использованы для диспергирования композиции в липидном носителе. Например, терапевтический агент может быть диспергирован в растворе, содержащем липид, растворен с липидом, эмульгирован с липидом, смешан с липидом, комбинирован с липидом, ковалентно связан с липидом, содержащимся в виде суспензии в липиде, содержащиеся или образующие комплекс с мицеллой или липосомой, или иным образом связанные с липидом или липидной структурой любыми способами, известными специалистам в данной области техники. Дисперсия может или не может привести к образованию липосом.

Термин "единичная доза" или "доза" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования у субъекта, причем каждая единица содержит predetermined количество терапевтической композиции, рассчитанной для получения желаемых ответов, обсуждаемых выше в связи с ее введением, то есть соответствующим путем введения и режимом лечения. Количество, которое должно вводиться, как по количеству процедур, так и по единичной дозе, зависит от желаемого эффекта. Фактическая величина дозы композиции согласно данному изобретению, вводимая пациенту или субъекту, может определяться физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, возраст, состояние здоровья и пол субъекта, тип заболевания, подлежащего лечению, степени проникновения болезни, предшествующих или одновременных терапевтических вмешательств, идиопатии пациента, способ введения и эффективности, стабильности и токсичности конкретного терапевтического вещества. Например, доза может также содержать от около 1 мкг/кг/массу тела до около 1000 мг/кг/массу тела (этот диапазон включает промежуточные дозы) или больше для каждого введения, и любой диапазон, выводимый из него. В неограничивающих примерах выводимого диапазона из приведенных в данном документе чисел, можно вводить диапазон от около 5 мкг/кг/массы тела до около 100 мг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 500 мг/кг/массы тела и т.д. Практикующий, ответственный за введение, в любом случае определит концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта.

Фактическая величина дозы композиции, вводимой животному, может быть определена физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть патологического состояния, тип лечения, предшествующие или параллельные терапевтические вмешательства, идиопатия пациента и путь введения. В зависимости от дозы и способа введения количество введений предпочтительной дозы и/или эффективного количества может варьироваться в зависимости от ответа субъекта. Практикующий, ответственный за введение, в любом случае определит концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере около 0, 1% активного соединения. В других вариантах реализации изобретения активное соединение может содержать от около 2% до около 75% от массы единицы или от около 25% до около 60%, например, и любой выводимый из них диапазон. Естественно, количество активного соединения(ий) в каждой терапевтически полезной композиции может быть получено таким образом, что подходящая доза будет получена в любой заданной разовой дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические факторы, которые необходимо учитывать, будут рассмотрены специалистами в данной области техники при приготовлении таких фармацевтических препаратов, и, таким образом, могут потребоваться различные дозы и схемы лечения.

В других неограничивающих примерах доза может также содержать от около 1 мкг/кг/массы тела, около 5 мкг/кг/массы тела, около 10 мкг/кг/массы тела, около 50 мкг/кг/массы тела, около 100 мкг/кг/массы тела, около 200 мкг/кг/массы тела, около 350 мкг/кг/массы тела, около мкг/кг/массы тела, около 1 мкг/кг/массы тела, около 5 мкг/кг/массы тела, около 10 мкг/кг/массы тела, около 50 мкг/кг/массы тела, около 100 мкг/кг/массы тела, около 200 мкг/кг/массы тела, около 350 мкг/кг/массы тела, около 500 мкг/кг/массы тела, до около 1000 мкг/кг/массы тела или более для каждого введения и любого выводимого из них диапазона. В неограничивающих примерах выводимого диапазона из приведенных в данном документе чисел, можно вводить диапазон от около 5 мкг/кг/массы тела до около 100 мкг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 500 мкг/кг/массы тела и т.д., исходя из чисел, описанных выше.

#### IV. Нуклеиновые кислоты и векторы.

В некоторых аспектах изобретения могут быть описаны последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие терапевтический белок или гибридный белок, содержащий терапевтический белок. В зависимости от того, какая система экспрессии используется, последовательности нуклеиновых кислот могут быть выбраны на основе обычных методов. Например, соответствующие гены или их варианты могут быть оптимизированы кодоном для экспрессии в определенной системе. Различные векторы могут также использоваться для экспрессии представляющего интерес белка. Иллюстративные векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмидные векторы, вирусные векторы, транспозоны или векторы на основе липосом.

#### V. Рекомбинантные белки и ингибиторные РНК.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к рекомбинантным белкам и полипептидам. Конкретные варианты реализации изобретения относятся к рекомбинантному белку или полипептиду, который проявляет по меньшей мере одну терапевтическую активность. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок или полипептид может быть терапевтическим антителом. В некоторых аспектах терапевтическое антитело может быть антителом, которое специфически или селективно связывается с внутриклеточным белком. В других аспектах белок или полипептид могут быть модифицированы для повышения стабильности сыворотки. Таким образом, если настоящая заявка относится к функции или активности "модифицированного белка" или "модифицированного полипептида", специалисту в данной области техники будет понятно, что она включает, например, белок или полипептид,

который обладает дополнительным преимуществом перед немодифицированным белком или полипептидом. В частности, предполагается, что варианты реализации изобретения, относящиеся к "модифицированному белку", могут быть реализованы применительно к "модифицированному полипептиду" и наоборот.

Рекомбинантные белки могут обладать делециями и/или заменами аминокислот; таким образом, белок с делецией, белок с заменой и белок с делецией и заменой представляют собой модифицированные белки. В некоторых вариантах реализации изобретения эти белки могут дополнительно содержать вставки или добавленные аминокислоты, такие как, например, гибридные белки или белки с линкерами. "Модифицированный белок с удалением" не содержит одного или более остатков нативного белка, но может обладать специфичностью и/или активностью нативного белка. "Модифицированный белок с удалением" также может иметь сниженную иммуногенность или антигенность. Примером модифицированного белка с удалением является тот, который имеет аминокислотный остаток, удаленный из по меньшей мере одной антигенной области, который представляет собой область белка, определенную как антигенная в конкретном организме, таком как тип организма, в который может быть введен модифицированный белок.

Варианты замещения или замены обычно содержат замену одной аминокислоты на другую в одном или более местах внутри белка и могут быть сконструированы для модуляции одного или более свойств полипептида, особенно его эффекторных функций и/или биодоступности. Замены могут быть или не быть консервативными, то есть одна аминокислота заменяется одной с аналогичной формой и зарядом. Консервативные замены хорошо известны в данной области техники и включают, например, замену: аланина на серин; аргинина на лизин; аспарагина на глутамин или гистидин; аспартата на глутамат; цистеина на серин; глутамина на аспарагин; глутамата на аспартат; глицина на пролин; гистидина на аспарагин или глутамин; изолейцина на лейцин или валин; лейцина на валин или изолейцин; лизина на аргинин; метионина на лейцин или изолейцин; фенилаланина на тирозин, лейцин или метионин; серина на треонина; треонина на серин; триптофана на тирозин; тирозина на триптофан или фенилаланин; и валин на изолейцин или лейцин.

В дополнение к делеции или замене модифицированный белок может содержать вставку остатков, которая обычно включает добавление по меньшей мере одного остатка в полипептид. Это может включать введение целевого пептида или полипептида, или просто одного остатка. Концевые добавления, называемые гибридными белками, обсуждаются ниже.

Термин "биологически функциональный эквивалент" хорошо известен в данной области техники и дополнительно подробно описан в данном документе. Соответственно, последовательности, которые имеют от около 70% до около 80% или от около 81% до около 90% или даже от около 91% до около 99% аминокислот, которые идентичны или функционально эквивалентны аминокислотам контрольного полипептида, при условии сохранения биологической активности белка. Рекомбинантный белок может быть биологически функционально эквивалентен его нативному аналогу в определенных аспектах.

Следует также понимать, что последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот могут включать дополнительные остатки, такие как дополнительные N- или C-концевые аминокислоты или 5'- или 3'-последовательности, и все же по существу такие же, как указано в одной из последовательностей, раскрытой в данном документе, при условии, что последовательность соответствует указанным выше критериям, включая сохранение биологической активности белка, в которой участвует белок. Добавление концевых последовательностей, в частности, применимо к последовательностям нуклеиновых кислот, которые могут, например, содержать различные некодирующие последовательности, фланкирующие одну из 5'- или 3'-частей кодирующей области или могут включать различные внутренние последовательности, то есть интроны, которые, как известно, встречаются внутри генов.

Как используется в данном документе, белок или пептид обычно относится, но не ограничивается этим, к белку, содержащему более чем около 200 аминокислот, вплоть до полноразмерной последовательности, транслируемой из гена; к полипептиду, содержащему более чем около 100 аминокислот; и/или к пептиду, содержащему от около 3 до около 100 аминокислот. В данном документе для удобства термины "белок", "полипептид" и "пептид" используются взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин "аминокислотный остаток" относится к любой природной аминокислоте, любому производному аминокислоты или любого имитатора аминокислоты, известного в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения остатки белка или пептида являются последовательными, без каких-либо отличных от аминокислот, прерывающих последовательность аминокислотных остатков. В других вариантах реализации изобретения последовательность может содержать один или более остатков, отличных от аминокислотных. В конкретных вариантах реализации изобретения последовательность остатков белка или пептида может быть прервана одним или более остатками, отличных от аминокислотных.

Соответственно, термин "белок или пептид" охватывает аминокислотные последовательности, содержащие по меньшей мере одну из 20 общих аминокислот, встречающихся в природных белках, или по меньшей мере одну модифицированную или необычную аминокислоту.

Некоторые варианты реализации данного изобретения относятся к гибридным белкам. Эти молеку-

лы могут содержать терапевтический белок, связанный на N- или С-конце, с гетерологичным доменом. Например, для слияний можно также использовать лидерные последовательности из других видов, чтобы обеспечить рекомбинантную экспрессию белка в гетерологичном хозяине. Другое применяемое слияние включает добавление аффинной метки белка, такой как аффинная метка сывороточного альбумина или шесть гистидиновых остатков, или иммунологически активный домен, такой как эпитоп антитела, предпочтительно расщепляемый, для облегчения очистки гибридного белка. Неограничивающие аффинные метки включают полигистидин, хитинсвязывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP) и глутатион-S-трансферазу (GST).

В конкретном варианте реализации изобретения терапевтический белок может быть связан с пептидом, который увеличивает период полувыведения *in vivo*, такой как полипептид XTEN (Schellenberger et al., 2009), домен Fc IgG, альбумин или альбуминсвязывающий пептид.

Способы получения гибридных белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие белки могут быть получены, например, путем синтеза *de novo* полного гибридного белка или путем присоединения последовательности ДНК, кодирующей гетерологичный домен, с последующей экспрессией интактного гибридного белка.

Получение гибридных белков, которые восстанавливают функциональную активность исходных белков, может быть облегчено путем соединения генов с мостиком сегмента ДНК, кодирующим пептидный линкер, который соединяет полипептиды, связанные в тандеме. Линкер будет иметь достаточную длину, чтобы обеспечить правильную укладку полученного гибридного белка.

МиНК (например, миРНК) хорошо известны в данной области техники. Например, миРНК и двухцепочечная РНК были описаны в патенте США №№ 6506559 и 6573099, а также в заявках на патент США 2003/0051263, 2003/0055020, 2004/0265839, 2002/0168707, 2003/0159161 и 2004/0064842, все из которых включены в данное описание посредством ссылки во всей их полноте.

В пределах миНК компоненты нуклеиновой кислоты необязательно должны быть одного и того же типа или гомогенны повсюду (например, миНК может содержать нуклеотид и нуклеиновую кислоту или нуклеотидный аналог). Как правило, миНК образуют двухцепочечную структуру; двухцепочечная структура может образовываться из двух отдельных нуклеиновых кислот, которые частично или полностью комплементарны. В некоторых вариантах реализации данного изобретения миРНК может содержать только одну нуклеиновую кислоту (полинуклеотид) или аналог нуклеиновой кислоты и образовывать двухцепочечную структуру путем дополнения самой себя (например, образуя петлю шпильки). Двухцепочечная структура миРНК может содержать 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более смежных нуклеиновых оснований, включая все диапазоны. МиРНК может содержать от 17 до 35 смежных нуклеотидных оснований, более предпочтительно от 18 до 30 смежных нуклеотидных оснований, более предпочтительно от 19 до 25 нуклеотидных оснований, более предпочтительно от 20 до 23 смежных нуклеотидных оснований или от 20 до 22 смежных нуклеотидных оснований или 21 смежных нуклеотидных оснований, которые гибридизуются с комплементарной нуклеиновой кислотой (которая может быть другой частью той же нуклеиновой кислоты или отдельной комплементарной нуклеиновой кислотой) с образованием двухцепочечной структуры.

Агенты данного изобретения, пригодные для реализации способов данного изобретения, включают, но не ограничиваются ими, миРНК. Как правило, введение двухцепочечной РНК (дцРНК), которая в альтернативном варианте может упоминаться в данном документе как малая интерферирующая РНК (миРНК), индуцирует сильный и специфический сайленсинг генов, процесс, называемый интерференцией РНК или РНКи. РНК-интерференция называлась "косуппрессией", "посттранскрипционным сайленсингом генов", "смысловой суппрессией" и "подавлением". РНКи является привлекательным биотехнологическим инструментом, поскольку он обеспечивает средство для инактивации определенных генов.

При разработке РНКи необходимо учитывать несколько факторов, таких как природу миРНК, продолжительность эффекта сайленсинга и выбор системы доставки. Для получения эффекта РНКи, миРНК, которая вводится в организм, обычно будет содержать экзонные последовательности. Кроме того, процесс РНКи зависит от гомологии, поэтому последовательности должны быть тщательно подобраны таким образом, чтобы максимизировать генную специфичность, минимизируя при этом возможность перекрестной интерференции между гомологичными, но не ген-специфическими последовательностями. Предпочтительно, чтобы миРНК проявляла более 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или даже 100% идентичности между последовательностью миРНК и геном, подлежащим ингибированию. Последовательности менее чем на около 8 0% идентичные целевому гену существенно менее эффективны. Таким образом, чем выше гомология между миРНК и ингибируемым геном, тем меньше вероятность экспрессии несвязанных генов.

Кроме того, важное значение имеет размер миРНК. В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к молекулам миРНК, которые включают по меньшей мере около 19-25 нуклеотидов и способны модулировать экспрессию генов. В контексте данного изобретения миРНК предпочтительно составляет менее 500, 200, 100, 50 или 25 нуклеотидов в длину. Более предпочтительно, миРНК составляет от около 19 нуклеотидов до около 25 нуклеотидов в длину.

Целевой ген обычно означает полинуклеотид, содержащий область, которая кодирует полипептид

или полинуклеотидную область, которая регулирует репликацию, транскрипцию или трансляцию, или другие процессы, важные для экспрессии полипептида, или полинуклеотид, включающий как область, которая кодирует полипептид, так и область, функционально связанную с ней, которая регулирует экспрессию. Любой ген, экспрессируемый в клетке, может быть целевым. Предпочтительно, целевым геном является тот, который вовлечен или связан с прогрессированием клеточных функций, важных для болезни или представляющих особый интерес в качестве объекта исследования.

МиРНК может быть получена из коммерческих источников, природных источников или может быть синтезирована с использованием любого из нескольких методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, одним коммерческим источником предварительно разработанной миРНК является Ambion®, Остин, Техас. Другим - Qiagen® (Валенсия, Калифорния). Ингибиторная нуклеиновая кислота, которая может быть применена в композициях и способах согласно данному изобретению, может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая была обнаружена любым средством, является проверенным ингибитором представляющего интерес белка. Без излишнего экспериментирования и использования раскрытия этого изобретения понятно, что дополнительные миРНК могут быть разработаны и использованы для осуществления способов согласно данному изобретению.

МиРНК может также содержать изменение одного или более нуклеотидов. Такие изменения могут включать добавление вещества, отличного от нуклеотида, такого как конец (ы) от 19 до 25 нуклеотидов РНК или внутри (у одного или более нуклеотидов РНК). В некоторых аспектах молекула РНК содержит 3'-гидроксильную группу. Нуклеотиды в молекулах РНК согласно данному изобретению также могут содержать нестандартные нуклеотиды, включая не встречающиеся в природе нуклеотиды или дезокси-рибонуклеотиды. Двухцепочечный олигонуклеотид может содержать модифицированный остов, например, фосфоротиоат, фосфородитиоат или другие модифицированные остовы, известные в данной области техники, или могут содержать неприродные межнуклеозидные связи. Дополнительные модификации миРНК (например, 2'-О-метил-рибонуклеотиды, 2'-дезоксид-2'-фтор-рибонуклеотиды, "универсальные основные" нуклеотиды, 5-С-метилнуклеотиды, одна или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей и вставка инвертированного дезоксигенного остатка) можно найти в публикации US 2004/0019001 и в патенте США № 6673611 (каждый из которых включен посредством ссылки в полном объеме). В совокупности все такие измененные нуклеиновые кислоты или РНК, описанные выше, называются модифицированными миРНК.

#### VI. Наборы и диагностика.

В различных аспектах изобретения предлагается набор, содержащий необходимые компоненты для очистки экзосом от биологической жидкости или среды для культивирования ткани. В других аспектах предлагается набор, содержащий необходимые компоненты для выделения экзосомы и трансфекции их с терапевтической нуклеиновой кислотой, терапевтическим белком или нуклеиновой кислотой, кодирующей терапевтический белок. В других аспектах предлагается набор, содержащий необходимые компоненты для выделения экзосом и определения наличия экзосом-специфического маркера, полученного из раковых клеток, в выделенных экзосомах.

Набор может содержать один или более герметичных флаконов, содержащих любой из таких компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения набор может также содержать подходящее контейнерное устройство, которое представляет собой контейнер, который не будет реагировать с компонентами набора, такими как трубка Эппендорфа, аналитическая пластина, шприц, бутылка или трубка. Контейнер может быть изготовлен из стерилизуемых материалов, таких как пластик или стекло.

Комплект может дополнительно включать инструкцию по применению, которая описывает процедурные этапы способов, изложенных в данном документе, и будет соответствовать по существу тем же самым процедурам, которые описаны в данном документе или известны специалистам. Информация инструкции может быть на машиночитаемом носителе, содержащем машиночитаемые инструкции, которые при выполнении с использованием компьютера вызывают отображение реальной или виртуальной процедуры очистки экзосом из образца и трансфекции терапевтической нуклеиновой кислоты в них, экспрессию рекомбинантного белка в них, электропорацию рекомбинантного белка в них или определение маркера, полученного из раковой клетки, на них или в них.

#### VII. Примеры.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов реализации изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что способы, описанные в следующих примерах, представляют собой способы, обнаруженные автором изобретения, для нормального функционирования при применении изобретения, и, следовательно, можно считать, что они представляют собой предпочтительные способы для его применения. Однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, в свете данного описания, что многие изменения могут быть совершены в конкретных описанных вариантах реализации изобретения, и по-прежнему получится похожий или аналогичный результат без отступления от сущности и объема изобретения.

#### Материалы и методы.

Выделение и очистка экзосом. Экзосомы очищали при помощи процессов дифференциального цен-

трифугирования, как описано ранее (Alvarez-Erviti et al., 2011; El-Andaloussi et al., 2012). Супернатант собирали из клеток, которые культивировали в средах, содержащих обедненный экзосомами FBS, в течение 48 ч, и затем подвергали последовательным стадиям центрифугирования при 800 g в течение 5 мин и 2000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант затем фильтровали с использованием фильтров 0,2 мкм в культуральный сосуд и осадок извлекали при 28000 g в роторе SW 32 Ti после 2 часов ультрацентрифугирования (Beckman). Супернатант отсасывали и осадок ресуспендировали в PBS и затем ультрацентрифугировали еще в течение 2 ч. Затем очищенные экзосомы анализировали и использовали для экспериментальных методик.

Электропорация экзосомилипосом.  $1 \times 10^8$  экзосом (измеренных при помощи анализа траекторий наночастиц, разработанного NanoSight) и 1 мкг миРНК (Qiagen) или кшРНК смешивали в 400 мкл буфера для электропорации (1,15 ммоль/л фосфата калия, pH 7, 2,25 ммоль/л хлорида калия, 21% Optiprep™).

Экзосомы электропорировали с использованием 4-миллиметровой кюветы с использованием системы для электропорации Gene Pulser Xcell™ (BioRad), как описано ранее (Alvarez-Erviti et al., 2011; El-Andaloussi et al., 2012). Аналогичную процедуру проводили с использованием липосом (100 нм, приобретенных у Encapsula Nano Sciences). После электропорации экзосомы обрабатывали безпротеазной РНКазой А (Sigma Aldrich) с последующим добавлением  $10 \times$  концентрированного ингибитора РНКазы (Ambion) и промывали PBS при ультрацентрифугировании, как описано выше.

Мечение антител коллоидным золотом и электронная микроскопия. Фиксированные образцы с оптимальной концентрацией помещали на с углеродную/формваровую пленку-подложку с 300 ячейками и позволяли поглощать формвар в течение минимум одной минуты. Для иммунологического окрашивания золотом подложки помещали в блокирующий буфер для стадии блокирования/пермеабиллизации в течение одного часа. Без промывки подложки немедленно помещали в раствор первичных антител при соответствующем разведении в течение ночи при 4°C (моноклональные антитела против CD9, 1:10, Abcam). В качестве контролей некоторые подложки не подвергали воздействию первичным антителом. На следующие сутки все подложки промывали PBS, затем помещали на поверхность капель соответствующего вторичного антитела, прикрепленного 10%-ными частицами золота (AURION, Hatfield, PA) в течение двух часов при комнатной температуре. Подложки промывали PBS и помещали в 2,5% глутаровый альдегид в 0,1 М фосфатном буфере в течение 15 мин. После промывки в PBS и дистиллированной воде подложкам давали высохнуть и окрашивали для контраста с использованием уранилацетата. Образцы просматривали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа Tecnai™ Bio Twin (FEI, Хиллсборо, Орегон), а изображения были сняты при помощи видеокамеры на основе устройства с зарядовой связью AMT (Advanced Microscopy Techniques, Дэнверс, Массачусетс).

Количественная оценка Alexa Fluor 647 в клетках, обработанных экзосомами или липосомами. Экзосомы, выделенные из фибробластов BJ, подвергали электропорации с помощью миРНК, меченных Alexa Fluor® 647, (Qiagen, SEQ ID NO: 1) и обрабатывали PBS, протеиназой K (Qiagen, 1×, 15 минут при комнатной температуре и ультрацентрифугировали с PBS в течение 1 часа при 4°C) или трипсином (Life Technologies, 10×, 15 минут при комнатной температуре и ультрацентрифугировали с PBS в течение 1 часа при 4°C), промывали PBS в течение 2 ч и добавляли к культурам клеток Рапс-1 на покровные стекла в течение 3 ч. Затем клетки фиксировали промыванием холодным PBS и инкубированием с 4% PFA (полиформальдегид) при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем клетки промывали PBS, инкубировали с 0,05% Triton X в течение 10 мин, промывали PBS и окрашивали зеленым ядерным красителем Sytox® (Invitrogen). Покровные стекла затем устанавливали на стеклянные слайды с помощью флуоресцентных фиксирующих сред. Фокальное накопление Alexa Fluor® 647 было визуализировано с использованием инвертированного микроскопа Zeiss Observer Z1. Количество клеток с метками Alexa Fluor® 647 подсчитывали на каждое поле зрения (400×), а результаты выражали как процент клеток с положительной меткой из общего количества клеток, подсчитанных в поле зрения.

ПЦР-анализ в реальном времени. РНК была обратно транскрибирована с помощью обратной транскриптазы MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) и олиго (dT) праймеров после полной очистки РНК с помощью TRIzol® (Invitrogen) в соответствии с указаниями производителя. ПЦР-анализ в реальном времени проводили на секвенаторе ABI PRISM® 7300HT с использованием SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Представляющие интерес транскрипты были нормализованы до уровней 18S транскриптов. Праймеры для Kras<sup>G12D</sup> были сконструированы, как описано (Rachagani et al., 2011), а праймеры для Kras дикого типа были сконструированы, как описано (Poliseno et al., 2010). Каждое измерение выполняли в трех повторностях. Определяли пороговый цикл, количество неполных циклов, при котором количество амплифицированной мишени достигало фиксированного порога, и измеряли экспрессию с использованием формулы  $2^{-\Delta Ct}$ . Последовательности праймеров перечислены в таблице.

Последовательности праймеров для ПЦР-РВ

| Ген                  | Прямой праймер (5'–3') | SEQ ID NO: | Обратный праймер (5'–3') | SEQ ID NO: |
|----------------------|------------------------|------------|--------------------------|------------|
| KRAS <sup>G12D</sup> | ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA  | 3          | TTGGATCATATTCGTCCACAA    | 4          |
| KRAS ДИКОГО ТИПА     | ATTGTGAATGTTGGTGT      | 5          | GAAGGTCTCAACTGAAATT      | 6          |
| 18S                  | GTAACCCGTTGAACCCCAT    | 7          | CCATCCAATCGGTAGTAGCG     | 8          |

Культура клеток. Клетки фибробластов крайней плоти человека (BJ) культивировали в DMEM (DMEM - минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), дополненной 20% обедненного экзосомы FBS и 1% пенициллином-стрептомицином. Клетки Рапс-1 и ВхРС-3 (полученные из Американской коллекции типовых культур [ATCC]) культивировали в среде RPMI с 10% FBS. Клетки Рапс-1 и ВхРС3 (трансфицированные промотором люциферазы) были любезно предоставлены доктором Тиру Арумугамом, из UT MDACC (Онкологического центра им. М.Д. Андерсона Техасского университета). Фибробласты Ptf1acre/+; LSL-KRAS<sup>G12D/+</sup>; Tgfb2<sup>lox/lox</sup> мышей (PKT) выделяли из поджелудочной железы мышей PKT путем измельчения выделенной опухоли в неполной DMEM и коллагеназе 4 (400 ед./мл) и инкубировали в течение ночи. Затем среду аспирировали на следующие сутки, после чего клетки культивировали в DMEM, дополненной 20% обедненной экзосомы FBS и 1% пенициллин-стрептомицин-ампициллином.

Стратегии РНКи. Последовательность миРНК Kras<sup>G12D</sup> (GUUGGAGCUGAUGGCGUAGTT (SEQ ID NO: 1)) и последовательность кшРНК Kras<sup>G12D</sup> (CCGGGTTGGAGCTGATGGCGTAGTTCTCGAGCTACGCCATCAGCTCCAACTTTTTT (SEQ ID NO: 2)) обе отражают отклонения нуклеотидов от G на A из последовательности гена Kras дикого типа, чтобы специфически нацеливать аминокислотную замену глицина на аспартат в мутации Kras<sup>G12D</sup> и содержать нуклеотид ТТ на липких концах для повышения эффективности сайленсинга. Центральное положение нуклеотида, отклоняющегося от нормы в этой миРНК Kras<sup>G12D</sup>, повышает его специфичность против последовательности мРНК дикого типа. Данное также было помечено флуорофором Alexa Fluor® 647 на 3'-концесмысловой цепи для отслеживания его доставки. МиРНК получали из Qiagen (кат. № 1027424). Для использования в качестве скремблированной миРНК, QIAGEN AllStars Negative Control миРНК был получен из Qiagen (кат. № 1027287). В качестве скремблированной shRNA использовали нацеленную на GFP (зеленый флуоресцентный белок) кшРНК.

Трансфекция экзосомы. Для трансфекции *in vitro* с использованием экзосом и липосом, обе электропорировали и промывали PBS, как описано выше, и 200000 клеток в 6-луночном планшете обрабатывали экзосомы и липосомами в течение требуемого времени, как описано для каждого анализа, и затем промывали PBS и использовали для дальнейшего анализа.

Исследования кинетики роста и апоптоза. Клетки Рапс-1 и ВхРС-3 высевали в 6-луночный планшет (2,5×10<sup>5</sup>) и оставляли расти в течение 12 ч, после чего их обрабатывали экзосомы, электропорированными с ми/кшРНК. Затем каждые 24 часа количество жизнеспособных клеток подсчитывали трипсинизацией клеток и смешиванием с трипановым синим перед подсчетом клеток с использованием гемоцитометра. Этот процесс повторяли каждые 24 часа, до 84 часов после посева. Апоптоз при помощи TUNEL (терминальное дезоксиуридиновое мечение концов) оценивали с использованием набора In Situ Cell Death Kit, TMR red (Roche), в соответствии с указаниями производителя. Клетки фиксировали, как описано выше, и Sytox® green (Invitrogen, 1: 10000 в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре) использовали для окрашивания ядер. Изображения получали с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 и определяли количественно, подсчитывая количество TUNEL-позитивных клеток на поле зрения (400х), а результаты были выражены как процент клеток с положительной меткой от общего количества клеток, подсчитанных в поле зрения.

Вестерн-блоттинг. Чтобы вывести экспрессию белка клеток после лечения экзосомы через 24 часа, клетки Рапс-1 собирали в радиоиммунопреципитационном буфере, а лизаты белков нормировали с использованием количественной оценки Брэдфорда. 40 мкг лизатов загружали на акриламидные гели для электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях и переносили на ПВДФ-мембраны (ImmobilonP) путем мокрого электрофоретического переноса. Затем мембраны блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре с 5% обезжиренным сухим молоком в PBS/0,05% Твин-20 и инкубировали в течение ночи при 4°C со следующими первичными антителами: антикроличьи p-Erk-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr 204) (Cell Signaling, 4376, 1: 1000), антикроличьи p-AKT-анти AKT1 (фосфо-S473) (Abcam, ab81283, 1: 5000), антикроличьи β-актин (Cell Signaling, 4967, 1: 1000). Вторичные антитела инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Промывки после инкубации антител проводили на орбитальном шейкере, три раза с интервалом 15 минут, с 1×PBS 0,05% Tween®-20. Мембраны были обнаружены с использованием хемилюминесцентных реагентов от Pierce в соответствии с указаниями производителя и хемилюминесценцией, снятой на пленку.

Нозерн-блот. 15% гелей мочевины/акриламида использовали для загрузки 20 мкг экзосомальной РНК градиента сахарозы вместе с 1х РНК-загрузочным красителем в течение 2 мин при 95°C, затем 2

мин на льду. Маркерную микроРНК использовали в соответствии с инструкциями производителя (N2102, New England BioLabs). Электрофорез проводили при 4°C в течение 3 ч с использованием 1×TBE (Трис-борат-ЭДТА). Перенос проводили с использованием хроматографической бумаги Whatman и положительной заряженной нейлоновой мембраны BrightStar®-Plus Positively Charged Nylon Membrane (Ambion) в течение 2 ч при 4°C с 0,5×TBE. РНК была перекрестно сшита с мембраной с использованием прибора для УФ-просвечивания в течение 20 мин. Мембраны предварительно гибридизировали путем вращения в течение 1 ч при 42°C в ультрачувствительном буфере для гибридизации ULTRAhyb®-Oligo Ambion (Ambion). Затем зонды оттаивали на льду и добавляли по 150 нг на мл буфера для гибридизации после 5-минутной инкубации при 95°C, после чего мембраны оставляли вращаться в течение ночи при 42°C. Затем выполняли промывки: 2× SSPE/0,5% SDS - дважды в течение 15 мин; 0,2×SSPE/0,5% SDS - дважды в течение 30 мин и 2×SSPE - 5 мин. Эти начальные стадии промывки сопровождалось большим количеством промывок, и затем блоты изучали с использованием набора BrightStar® BioDetect™ в соответствии с инструкциями производителя (Ambion). Блоты экспонировали в течение ночи с четырьмя многослойными пленками. Флюорофор Alexa Fluor® 647 детектировали непосредственно с использованием инфракрасной системой визуализации LI-COR Biosciences Odyssey.

Иммуноцитохимия. Клетки высевали на покровные стекла и обрабатывали в течение 3 ч или экзосомами, или липосомами, электропорированными миРНК Kras<sup>G12D</sup>. Покровные стекла затем промывали холодным 1× PBS и клетки фиксировали в течение 20 мин при комнатной температуре с 4% параформальдегидом, пермеабиллизированным в течение 10 мин при комнатной температуре с 0,5% Triton™ X-100 в PBS, и ядра окрашивали Sytox green, ресуспендированным в 2% BSA (бычий сывороточный альбумин). Изображения были получены с использованием Zeiss LSM510 Upright Confocal System с использованием утилиты для повторного использования, чтобы сохранять идентичные настройки.

Агрегированные экзосомы, содержащие миРНК Alexa Fluor® 647, позволили визуализировать фокальное накопление метки, детектируемой конфокальной микроскопией. Для анализа данных изображения выбирали из пула, взятого из по меньшей мере двух независимых экспериментов. Количество клеток с метками Alexa Fluor 647 подсчитывали на каждое поле зрения (×400), а результаты выражали как процент клеток с положительной меткой из общего количества клеток, подсчитанных в поле зрения.

Мыши и визуализация. Самок бестимусных nu/nu мышей (Charles Rivers) в возрасте от 4 до 6 недель размещали в отдельных вентилируемых клетках в 12-часовом свето-темновом цикле при температуре 21-23°C и влажности 40-60%. Мышам был разрешен свободный доступ к облученной пище и стерилизованной воде. Под общей анестезии клетки Panc-1 или BXPC-3 (10<sup>6</sup>, ресуспендированные в 10 мкл PBS) вводили в хвост поджелудочной железы с использованием шприца с иглой 27 калибра. Для обнаружения экспрессии люциферазы мышам вводили и/п с 100 мг/кг люциферина (200 мкл в 10 мг/мл в PBS) за 12-15 мин до визуализации, проводили анестезию изофлюраном и визуализировали с использованием IVIS (Xenogen Spectrum). Касательно исследования ортотопической опухоли для количественной оценки всех опухолевых показателей использовали Living Image версии 4. 4 (Caliper Life Sciences). Была определена круговая область интереса (ROI) вокруг поджелудочной железы и опухоли и установлена в качестве стандарта для сравнения всех изображений в пределах той же экспериментальной группы. Кроме того, условия экспозиции (время, апертура, положение сцены, биннинг) были одинаковыми для всех измерений во всех экспериментальных группах. Последующие измерения опухоли (ф/с/см<sup>2</sup>/ср) затем получали в тех же условиях для всех экспериментальных групп. Мышей регулярно визуализировали и случайным образом делили на группы для лечения. Мыши получали 2×10<sup>8</sup> экзосом или липосом и/п в 100 мкл объеме PBS через сутки. Экзосомы или липосомы электропорировали с использованием 2 мкг миРНК или кшРНК и промывали PBS перед инъекцией. При использовании генно-модифицированных мышей PKT (Ptf1acre/+; LSL-KrasG12D/+; Tgfr2flox/flox) (Ozdemir и др., 2014) лечение экзосомами было начато в возрасте 33 суток, когда у мышей присутствовали поражения PaNIN (интраэпителиальная неоплазия поджелудочной железы) и PDAC (панкреатическая интраэпителиальная неоплазия). Все процедуры на животных были рассмотрены и одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию в UT MDACC (Онкологический центр им. М.Д. Андерсона Техасского университета).

Макрофаговый клиренс. Иммунокомпетентным взрослым мышам и/п вводили экзосомы или липосомы, содержащие миРНК, меченные Alexa Fluor® 647. Кровь этих мышей собирали через 12 ч после инъекции и подвергали обработке для проточного цитометрического анализа. Эритроциты лизировали с использованием АСК буфера для лизиса (Invitrogen), а периферические клетки блокировали с использованием FC-блокатора (1:1000, BD Pharmingen), окрашивали Sytox Green (1:200, Invitrogen) и CD11b (1:200, BD Pharmingen, PerCP/Cy5 5.5) в течение 30 мин, промывали PBS и анализировали с использованием анализатора клеток LSR Fortessa™ X-20. Предварительная инкубация суспензий клеток мыши с FC-блокатором в течение нескольких минут перед окрашиванием специфическими антителами гарантирует, что любое наблюдаемое окрашивание связано с взаимодействием антигенсвязывающей части антитела с антигеном на поверхности клеток.

Гистология, гистопатология и иммуногистохимия. Ткани фиксировали в формалине и обрабатывали

для введения парафинов. Тканевые срезы толщиной 5 мкм нарезали и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и трихромом по Массону (МТС) (Leica). Для гистопатологического скрининга препараты, окрашенные H&E, оценивали на основе морфологической стадии рака поджелудочной железы: Нормальная, интраэпителиальная неоплазия поджелудочной железы (PanIN) и протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (PDAC). Для каждого среза ткани балл в процентах для каждой из трех стадий (Нормальная, PanIN, PDAC) был получен вручную в слепом режиме специалистами по гистологии поджелудочной железы, которые затем усредняли, чтобы получить общий балл из 100 для каждой когорты. Затем для каждой мыши в соответствующих когортах использовали среднее значение этих баллов в процентах.

Для анализа фиброза у мышей было отобрано восемь полей зрения размером 200× для каждого участка окрашенной МТС поджелудочной железы, а фиброз был вручную оценен с помощью анализа точек пересечения координатной сетки с использованием Adobe Photoshop. Для каждой оценки изображения, сеткой из 100 квадратов перекрывали каждое изображение, и каждое пересечение считали синим (фибротическая область) и фиолетовым/красным (нефибротическая область). Затем для каждого участка ткани получали балл в процентах. Срезы тканей также подвергали демаскировке антигена (15 мин в 10 нмоль/л цитратном буфере при pH 6 и 98°C) перед иммуноокрашиванием. Срезы тканей инкубировали с 4% желатином холодноводных рыб (Aurion) в TBS или PBS, за 1 ч до инкубации в течение ночи с первичными антителами. Для окрашивания использовали следующие первичные антитела: антикроличьи p-Erk-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, 4376, 1:400), анти-кроличьи p-AKT-Anti AKT1 (фосфо-S473) (Abcam, ab81283, 1:100), анти-кроличьи Ki-67 (Thermo Scientific, RM-9106-S, 1:400). Для всех окрашиваний срезы инкубировали с биотинилированными козьими антикроличьими антителами комплексов стрептавидин-пероксидаза хрена (Bioss Medical), каждый в течение 10 мин и контрастировали с использованием гематоксилина. При помощи DAB была проанализирована позитивность (диаминобензидин). Окрашивание Ki-67 определяли количественно подсчетом количества положительно окрашенных ядер на поле зрения (400×), тогда как окрашивание p-Erk и p-AKT определяли количественно с помощью ImageJ, создавая макросы, чтобы включать только темноокрашенную часть изображения, которую затем рассматривали как положительно окрашенную область для соответствующих антител. Данное было выполнено для восьми 200× изображений на срез ткани, а среднее значение положительной оценки было получено для каждого среза ткани. Анализ методом TUNEL проводили с использованием набора In Situ Cell Death Kit, TMR red (Roche), в соответствии с указаниями производителя. Alexa 647 детектировали на срезах замороженных тканей путем окрашивания ядер ткани Sytox® green (1:10000 в PBS в течение 10 мин). Изображения получали с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 и определяли количественно, подсчитывая количество TUNEL-позитивных клеток на поле зрения (×400), а результаты были выражены как процент клеток с положительной меткой от общего количества клеток, подсчитанных в поле зрения.

Статистический анализ. Статистические анализы подробно описаны в описаниях фигур. Для определения статистической значимости с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software) использовали однофакторный дисперсионный анализ или непарный двухсторонний t-тест Стьюдента. Для анализа выживаемости были сделаны графики Каплана-Мейера, а статистические различия были оценены с использованием логарифмического рангового критерия по Мантелу-Коксу. Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

Пример 1 - Противоопухолевые свойства экзосом, содержащих ингибиторные РНК.

Конструкции миРНК и кшРНК были разработаны для специфического нацеливания на Kras<sup>G12D</sup>. Последовательность миРНК (GUUGGAGCUGAUGGCGUAGTT; SEQ ID NO: 1) отражает отклонение нуклеотида от G на A из последовательности гена Kras дикого типа (подчеркнуто и жирным шрифтом), чтобы специфически нацеливать аминокислотную замену глицина на аспартат в мутации Kras<sup>G12D</sup>, обнаруженной в клеточных линиях и животных моделях, а также содержать нуклеотид ТТ на липких концах (подчеркнуто) для повышения эффективности сайленсинга (Rejiba et al., 2007; Ma et al., 2004; Du et al., 2005). Центральное положение нуклеотида, отклоняющегося от нормы в этой миРНК Kras<sup>G12D</sup>, повышает его специфичность против последовательности мРНК дикого типа (Du et al., 2005). Последовательность кшРНК (SEQ ID NO: 2) была сконструирована так, чтобы содержать специфическое отклонение нуклеотидов от G на A в затравочной последовательности, чтобы способствовать специфическому нацеливанию на мРНК Kras<sup>G12D</sup>. Олигонуклеотиды миРНК для Kras<sup>G12D</sup> также были помечены флуорофором Alexa Fluor® 647 для отслеживания их доставки (фиг. 4А).

Были разработаны и оптимизированы новые методы электропорации для вставки конструкций кшРНК и миРНК в экзосомы (siKrasG12D/shKrasG12D экзос.) без функционально повреждающих экзосом (фиг. 4А-С). С этой целью экзосомы выделяли из фибробластов крайней плоти человека (фибробласты BJ) с использованием установленных методов ультрацентрифугирования (Kahlert et al., 2014). Чистота и гомогенность (частицы диаметром 80-150 нм) экзосом были подтверждены измерениями при помощи Nanosight™ (фиг. 4В), трансмиссионной электронной микроскопии (фиг. 4С) и меченая антител к CD9 коллоидным золотом (фиг. 4D). Ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и но-

зерн-блот также подтвердили чистоту экстракции экзосом, а также присутствие Alexa Fluor 647 в экзосомах (фиг. 4Е). Также были получены экзосомы, содержащие скремблированные миРНК и кшРНК (siScrbl/shScrbl экзос.), липосомы, содержащие скремблированные миРНК и кшРНК (siScrbl/shScrbl), и липосомы, содержащие миРНК/кшРНК Kras<sup>G12D</sup> (siKras<sup>G12D</sup>/shKras<sup>G12D</sup> липос.). Туморогенные клетки Panc-1 поджелудочной железы человека (Kras<sup>asp12</sup> (Rejiba et al., 2007; Sun et al., 2001)) инкубировали с экзосомами и липосомами, содержащими миРНК, меченные Alexa Fluor® 647, в течение 3 ч, а иммунофлюоресценция показала значительное количество фокального накопления метки в клетках, обработанных экзосомами, по сравнению с клетками, обработанными липосомами (фиг. 1А). Обработка экзосом с использованием протеиназы К или трипсина уменьшала клеточное окрашивание, в то время как протеиназа К или обработка трипсином липосом сохраняли низкое клеточное окрашивание, подтверждая, что поверхностные белки экзосом увеличивают доставку меченой миРНК в клетки (фиг. 1А). siKras<sup>G12D</sup> и shKras<sup>G12D</sup> экзос. уменьшали уровни мРНК Kras<sup>G12D</sup> (~70% и ~50%, соответственно) в клетках Panc-1 по сравнению с siScrbl/shScrbl экзос. или неэлектropорированными экзос. (контроль, без полезной нагрузки РНКи) (фиг. 1В). Обработка siKras<sup>G12D</sup> и shKras<sup>G12D</sup> липос. также уменьшала уровни мРНК Kras<sup>G12D</sup> (снижение каждого на ~20%) в клетках Panc-1 по сравнению с siScrbl/shScrbl липос. (фиг. 1В). Специфический нокдаун мутантных транскриптов Kras<sup>G12D</sup> измеряли с использованием количественной ПЦР (кПЦР) в реальном времени с праймерами, которые специфически амплифицировали Kras<sup>G12D</sup>, но не Kras дикого типа (таблица), а обработка siKras<sup>G12D</sup> и shKras<sup>G12D</sup> экзос. не уменьшала мРНК Kras дикого типа, подтверждая специфическое нацеливание мРНК KrasG12D с использованием данной методики (фиг. 1С). Эффективность нокдауна мутантных транскриптов Kras<sup>G12D</sup> была больше при использовании экзосом вместо липосом (фиг. 1В), возможно, отражая нарушение доставки липосом по сравнению с экзосомами (фиг. 1А). Увеличение концентрации siKras<sup>G12D</sup> и shKras<sup>G12D</sup> липос. или время инкубации липосом с клетками Panc-1 не повышали эффективность нацеливания мРНК Kras<sup>G12D</sup> (фиг. 4F), подтверждая превосходные внутренние свойства экзосом над липосомами при доставке РНКи-карго для эффективного нацеливания на мРНК. Дальнейшая экспериментальная оптимизация показала, что отношение приблизительно 400 экзосомов на клетку Panc-1 превосходит уровни транскрипции Kras<sup>G12D</sup>, чем отношение 700 экзосомов на клетку Panc-1 (фиг. 4G). Наконец, в качестве контроля использовали раковые клетки поджелудочной железы ВхРС3, которые не содержат мутацию Kras<sup>G12D</sup> (Kras<sup>wt, Gly</sup> (Sun et al., 2001)), а лечение siKras<sup>G12D</sup> и shKras<sup>G12D</sup> экзос. не подавляло экспрессию Kras в этих клетках (фиг. 4Н), что еще больше подтверждает специфичность конструкций миРНК и кшРНК Kras<sup>G12D</sup> для подавления уровней мРНК онкогенного Kras. Подавление онкогенного Kras в клетках Panc-1, обработанных siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос., было связано с уменьшением уровней фосфорилированного ERK и фосфорилированного белок протеинкиназы В, что подтвердило нисходящий сигналинг онкогенного Kras (фиг. 1D). В отличие от клеток Panc-1, обработанных shScrbl экзос. или неэлектropорированными контрольными экзос., пролиферация клеток Panc-1, подвергнутых инкубации с siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос., была значительно снижена (фиг. 1Е). В отличие от пролиферации клеток ВхРС3, которых не подвергали обработке siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. (фиг. 4I). Наконец, сниженная пролиферация клеток Panc-1, обработанных siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос., была связана с усиленным апоптозом, измеренным с помощью теста TUNEL, подтверждающим снижение пролиферации этих клеток при лечении с siKrasG12D или shKrasG12D экзос. (фиг. 1Е).

Эксперименты in vitro показали, что siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. специфически нацелены на онкогенный Kras и индуцированный апоптоз через нарушенный нисходящий сигналинг онкогенного Kras. Затем была исследована способность экзосом, содержащих siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup>, к экспрессии Kras<sup>G12D</sup> в опухолях поджелудочной железы. Фокальные накопления миРНК, меченных Alexa Fluor 647, из экзосом, введенных внутривенно мышам, были обнаружены в ткани поджелудочной железы через 24 часа после инъекции. Кроме того, экзосомы, содержащие миРНК, меченную Alexa Fluor 647, были обнаружены с использованием проточной цитометрии в сыворотке мышей через 24 ч после и/п (фиг. 5А). Эти результаты свидетельствуют о том, что экзосомы, вводимые и/п, у мышей поступают в большой круг кровообращения и достигают поджелудочной железы. После подтверждения того, что значительное количество экзосом приблизилось к паренхиме поджелудочной железы,  $1 \times 10^6$  люцифераза-экспрессирующих клеток Panc-1 поджелудочной железы человека (Panc-1-luc) были ортотопически имплантированы бестимусным мышам, которым делали и/п инъекции экзосомами или липосомами. Через десять суток после инъекции раковых клеток у всех мышей были обнаружены опухоли при помощи биоллюминесцентной визуализации и свечение которых варьировались от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  ф/с/см<sup>2</sup>/ср. Мышей рандомизировали и подвергали повторным и/п инъекциям с  $1 \times 10^6$  экзосомами или липосомами каждые 48 часов. Следует отметить, что используемые липосомы имели размер 100 нм, приближаясь к диапазону размеров экзосом, и вводились в аналогичных концентрациях и дозах, как экзосомы. Когортам мышей также вводили носитель PBS и неэлектropорированные экзосомы. В то время как опухоли мышей, которым вводили PBS или неэлектropорированные экзосомы, росли с экспоненциальной скоростью, опухоли мышей, обработанных siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос., значительно уменьшались до базовых уровней биоллюминесцентного обнаружения через 30 суток после начала лечения (фиг. 2А). Рост опухоли также

ослаблялся у мышей, получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> липос., однако в гораздо меньшей степени, чем при использовании экзосом (фиг. 2А). Кроме того, был обнаружен повышенный макрофагальный клиренс липосом по сравнению с экзосомами, при котором отмечали большее количество макрофагов, содержащих РНКи, меченных Alexa Fluor 647, в системном кровотоке мышей, получавших лечение липосомами, содержащими меченые РНКи, по сравнению с мышами, получавшими лечение экзосомами, содержащими меченые РНКи (фиг. 5А). Следует отметить, что siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. не влияли на рост ортотопической опухоли ВхРС3 (фиг. 2В), или общую выживаемость (фиг. 5Д), подтверждая специфический противоопухолевый эффект лечения siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. к раковым клеткам, несущим мутацию Kras<sup>G12D</sup>. Гистопатологические данные у подопытных мышей, получавших PBS и siKras<sup>G12D</sup> экзос., в течение 26 суток после инъекции раковыми клетками показали значительное снижение заболеваемости раком поджелудочной железы после короткого (16-дневного) лечения siKras<sup>G12D</sup> экзос. На 77-е сутки после инъекции раковых клеток контрольные мыши, получавшие лечение PBS, демонстрировали высокую опухолевую нагрузку, анализированную с помощью биоломинесцентной визуализации, в то время как масса опухоли мышей, получавших лечение shKras<sup>G12D</sup> экзос., была снижена до почти необнаружимых уровней (фиг. 2С, фиг. 6В). Продолжительное лечение проводили с использованием shKras<sup>G12D</sup> экзос. и в то время как мыши, имеющие опухоль Panc-1, получавшие лечение PBS и контрольными экзос., нуждались в эвтаназии, основанной на критериях умирания или чрезмерной опухолевой нагрузки через 130 суток после инъекции раковыми клетками, все мыши, получавшие лечение shKras<sup>G12D</sup> экзос., были здоровыми и имели минимальную опухолевую нагрузку, обнаруженную при помощи биоломинесцентной визуализации в течение 200 суток после инъекции раковыми клетками (фиг. 2Д, фиг. 6В). Иммунное мечение опухолей на p-ERK (фиг. 2Е) и p-AKT (фиг. 5С) также выявило подавленный сигналинг Kras в опухолях мышей, получавших лечение shKras<sup>G12D</sup> экзос. по сравнению с контрольными (получавшими лечение PBS) мышами. Эти данные свидетельствуют о том, что доставка экзосомами shKras<sup>G12D</sup> позволила снизить рост опухоли и сохранить подавление роста опухоли. Гистопатологическими анализами поджелудочной железы в эти моменты времени показаны опухоли на поздней стадии, поражающие всю поджелудочную железу у мышей, получавших лечение PBS (130 дней), в отличие от небольших опухолевых очагов с большей частью непораженной поджелудочной железы мышей, получавших лечение экзосомами shKras<sup>G12D</sup> (фиг. 2Д). Процентная опухолевая нагрузка (основанная на массе поджелудочной железы в экспериментальной конечной точке) (фиг. 2F) и выживаемость (фиг. 2G) также значительно улучшились у мышей, имеющих опухоль Panc-1, после shKras<sup>G12D</sup> экзос., при этом все контрольные мыши не выдерживали нагрузку опухоли поджелудочной железы. Мышей подвергали эвтаназии при достижении агонального состояния в группах, получавших PBS и контрольные экзос. на 88-130 сутки после прививки раковых клеток, тогда как почти все мыши оставались здоровыми и живыми на 200 сутки после прививки раковых клеток, в группе, получавшей лечение shKras<sup>G12D</sup> экзос. (одна мышь была найдена мертвой на 59-е сутки, однако анализ вскрытий выявил минимальную опухолевую нагрузку у этой мыши и анализ вскрытия подтвердил смерть, не связанную с раком).

Противоопухолевые свойства миРНК iExosomes (то есть экзосомы, содержащие лекарственное вещество, такое как миРНК) для бестимусных мышей с опухолями Panc-1, обеспечивали дальнейшую оценку генно-инженерных мышинных моделей (GEMM) PDAC. Быстро развивающиеся Ptf1acre/+; LSL-KRasG12D/+; Tgfb2flox/flox мыши (мыши PKT (Ozdemir et al., 2014)) получали лечение с siKras<sup>G12D</sup> экзос. У данных мышей спонтанно развивается аденокарцинома поджелудочной железы, которая достоверно повторяет клиническую картину и гистопатологию рака поджелудочной железы человека (Ozdemir et al., 2014). Модель полностью рабочая, а прогрессирование болезни высокосо поставимо между мышами (Ozdemir et al., 2014). У мышей PKT в возрасте около 28 суток развивается стадия интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы (PaNIN), в возрасте около 32 суток развивается инвазивная аденокарцинома и в возрасте 45-55 суток умирают. Мышам вводили и/п каждые 48 часов неэлектропорированные контрольные экзосомы или siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос., начиная в возрасте 33 суток (мыши с PDAC) (фиг. 3А). Фокальное накопление метки Alexa Fluor® 647 из экзос., содержащего меченую миРНК, было обнаружено в опухолях поджелудочной железы мышей при умерщвлении. Мыши, получавшие лечение siKras<sup>G12D</sup> или shKras<sup>G12D</sup> экзос. показали значительное увеличение продолжительности жизни при средней выживаемости 50 суток для мышей, получавших лечение shKras<sup>G12D</sup> экзос., и 60 суток для мышей, получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос., по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными экзос., которые показали среднюю выживаемость в 43 сутки (фиг. 3В). Повышенная выживаемость была связана со значительным снижением опухолевой нагрузки у мышей, получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос., по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными экзос. как во временных точках в соответствующей возрастной группе (фиг. 3С), так и в соответствующих экспериментальных конечных точках (фиг. 7А). В дополнение к значительному превосходству в выживаемости (фиг. 3В), гистопатологические особенности опухолей мышей, получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос. (возраст, соответствующий возрасту 44 суток у мышей, получавших лечение контрольными экзос.), выявили относительное увеличение поражений нормальных паренхиматозных и стадии PaNIN, в отличие от почти полного превращения поджелудочной железы в раковые ткани с признаками инвазии у контрольных мышей в возрасте 44 суток (фиг. 3Д). Поджелудочная железа мышей, получавших лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос., в

среднем возрасте 60 суток (экспериментальная конечная точка) все еще демонстрировала улучшенные гистопатологические признаки по сравнению с контрольными мышами (фиг. 7B). Эксперименты с GEMM первоначально проводили с использованием экзосом, полученных из фибробластов человека BJ. Чтобы устранить потенциальное влияние видовые различия в эффективности миРНК экзос. в GEMM, изогенные фибробласты были выделены из поджелудочной железы мышей РКТ, и siKras<sup>G12D</sup> экзос. были получены из этих первичных клеточных культур. Аналогичное улучшение выживаемости, опухолевой нагрузки и гистопатологических особенностей было отмечено при использовании миРНК экзос, полученных из мышинных фибробластов, и при использовании миРНК экзос, полученных из фибробластов BJ, и по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными экзос. (фиг. 3E-F; фиг. 7C). Лечение siKras<sup>G12D</sup> экзос. значительно уменьшало десмопластическую реакцию, связанную с прогрессированием рака поджелудочной железы у мышей РКТ (снижение количества внеклеточного матрикса, связанного с фиброзом в опухолях РКТ, увеличение апоптоза раковых клеток, исследованное при помощи TUNEL-окрашивания, уменьшение пролиферации раковых клеток (снижение окрашивания Ki67)) и уменьшения степени окрашивания фосфо-ERK и фосфо-AKT в опухолях (фиг. 3G, фиг. 7D).

Пример 2 - CD4 7 предотвращает поглощение экзосом циркулирующими моноцитами.

Было обнаружено, что циркулирующие моноциты поглощают липосомы (100 нм, приобретены у Encapsula Nanosciences), но не экзосомы (фиг. 8A-8B). Было обнаружено, что экзосомы, выделенные из фибробластов BJ, содержат CD47 на своей поверхности (фиг. 9A и 9C), в то время как было обнаружено, что липосомы не содержат CD47 на своей поверхности (фиг. 9B). Было обнаружено, что лечение экзосомами с анти-CD47 антителом стимулирует поглощение экзосом циркулирующими моноцитами *in vivo* (фиг. 10).

Все способы, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть сделаны и выполнены без излишнего экспериментирования в свете данного раскрытия. Хотя композиции и способы согласно данному изобретению были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов реализации изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что вариации могут применяться к способам и стадиям или в последовательности стадий описанного способа, не отступая от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые схожи и химически, и физиологически, могут быть использованы вместо агентов, описанных в данном документе, достигая тех же самых или подобных результатов. Все таковые аналогичные замены и модификации, очевидные специалистам в данной области техники, считаются не выходящими за пределы сущности, объема и концепции данного изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Ссылки.

Следующие ссылки, в той степени, в которой они обеспечивают иллюстративные процедурные или другие детали, дополняющие приведенные в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Патент США 4870287

Патент США 5739169

Патент США 5760395

Патент США 5801005

Патент США 5824311

Патент США 5830880

Патент США 5846945

Almoguera et al., Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53: 549-554, 1988.

Alvarez-Erviti et al., Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29: 341-345, 2011.

Austin-Ward and Villaseca, Gene therapy and its applications. *Rev. Med. Chil.*, 126: 838-845, 1998.

Baietti et al., Syndecan-syntenin-ALIX regulated the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.*, 14: 677-685, 2012.

Biankin et al., Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491: 399-405, 2012.

Bukowski et al., Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin. Cancer Res.*, 4: 2337-2347, 1998.

Chang et al., Pancreatic cancer genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*, 24: 74-81, 2014.

Christodoulides et al., Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144: 3027-3037, 1998.

Clayton et al., Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *European Journal of Immunology*, 33: 522-531, 2003.

Collins et al., Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 639-653, 2012a.

Collins et al., Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice. *PLoS One*, 7: e49707, 2012b.

Combes et al., A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma, *Thromb. Haemost.*, 77: 220, 1997.

Cooper et al., Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders*, 29: 1476-1485, 2014.

Davidson et al., Intralesional cytokine therapy in cancer: a pilot study of GM-CSF infusion in mesothelioma. *J. Immunother.*, 21: 389-398, 1998.

Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Research*, 33: 1671-1677, 2005.

El-Andaloussi et al., Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12: 347-357, 2013.

El-Andaloussi et al., Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nature Protocols*, 7: 2112-2126, 2012.

Eser et al., Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 111: 817-822, 2014.

Gomes-da-Silva et al., Lipid-based nanoparticles for siRNA

delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *Accounts of Chemical Research*, 45: 1163-1171, 2012.

Gysin *et al.*, Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes & Cancer*, 2: 359-372, 2011.

Hanibuchi *et al.*, Therapeutic efficacy of mouse-human chimeric anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody against multiple organ micrometastases of human lung cancer in NK cell-depleted SCID mice. *Int. J. Cancer*, 78: 480-485, 1998.

Hellstrand *et al.*, Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol.*, 37: 347-353, 1998.

Hingorani *et al.*, Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7: 469-483, 2005.

Hollander, Immunotherapy for B-cell lymphoma: current status and prospective advances. *Front Immunol.*, 3: 3, 2013.

Howlader *et al.*, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD. On the World Wide Web at [seercancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seercancer.gov/csr/1975_2011/), 2013.

Hruban *et al.*, K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *The American Journal of Pathology*, 143: 545-554, 1993.

Hui and Hashimoto, Pathways for Potentiation of Immunogenicity during Adjuvant-Assisted Immunizations with Plasmodium falciparum Major Merozoite Surface Protein 1. *Infect. Immun.*, 66: 5329-5336, 1998.

Ji *et al.*, Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology*, 137: 1072-1082, 82 e1-6, 2009.

Johnsen *et al.*, A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846: 75-87, 2014.

Kahlert *et al.*, Identification of Double Stranded Genomic DNA Spanning all Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in

the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *The Journal of biological chemistry* 2014.

Kowal et al., Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29: 116-125, 2014.

Luga et al., Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151: 1542-1556, 2012.

Ma et al., Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429: 318-322, 2004.

Marcus and Leonard, FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals* (Basel), 6: 659-680, 2013.

Melo et al., Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523: 177-182, 2015.

Ozdemir et al., Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25: 719-734, 2014.

Pecot et al., Therapeutic Silencing of KRAS using Systemically Delivered siRNAs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13: 2876-2885, 2014.

Peinado et al., Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18: 883-891, 2012.

Poliseno et al., A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465: 1033-1038, 2010.

Qin et al., Interferon-beta gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 14411-14416, 1998.

Rachagani et al., Activated KrasG12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. *Br. J. Cancer*, 104: 1038-1048, 2011.

Rejiba et al., K-ras oncogene silencing strategy reduces

tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Science*, 98: 1128-1136, 2007.

Siegel et al., Cancer statistics, 2014. *CA: A cancer journal for clinicians*, 64: 9-29, 2014.

Simoes et al., Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2: 237-254, 2005.

Smakman et al., Dual effect of Kras (D12) knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. *Oncogene*, 24: 8338-8342, 2005.

Sun et al., Characterization of the mutations of the K-ras, p53, p16, and SMAD4 genes in 15 human pancreatic cancer cell lines. *Oncology Reports*, 8: 89-92, 2001.

Thery et al., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2: 569-579, 2002.

Valadi et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9: 654-659, 2007.

van den Boorn et al., Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 331-335, 2013.

van der Meel et al., Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release*, 195: 72-85, 2014.

Wahlgren et al., Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research*, 40: e130, 2012.

Xue et al., Small RNA combination therapy for lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111: E3553-3561, 2014.

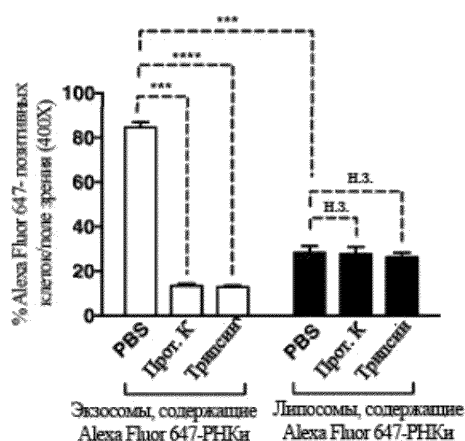
Ying et al., Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149: 656-670, 2012.

Yuan et al., Development of siRNA payloads to target KRAS-mutant cancer. *Cancer Discovery*, 4: 1182-1197, 2014.

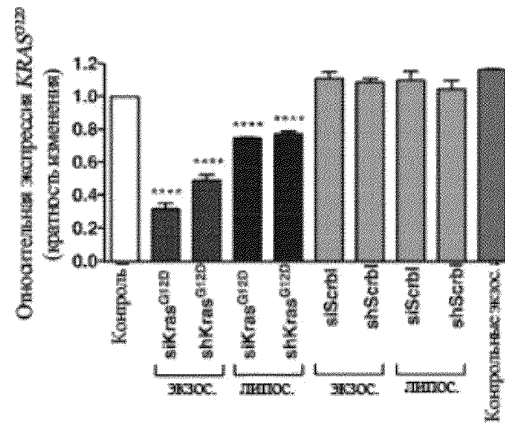
Zorde Khvalevsky et al., Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110: 20723-20728, 2013.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

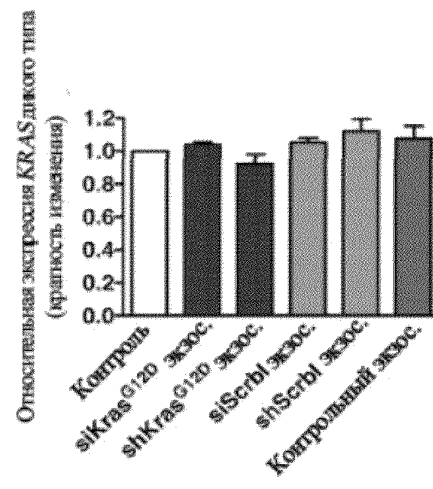
1. Фармацевтическая композиция для лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, где фармацевтическая композиция содержит экзосому и вспомогательное вещество, причем экзосома содержит ингибиторную РНК, нацеленную на Kras<sup>G12D</sup>, где ингибиторная РНК представляет собой миРНК, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или кшРНК, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2.
2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что экзосома содержит CD47 на своей поверхности.
3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композицию составляют для парентерального введения.
4. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композицию составляют для внутривенной, внутримышечной, подкожной или внутрибрюшинной инъекции.
5. Композиция по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая противораковый агент.
6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что противораковый агент содержит химиотерапевтический агент или иммунотерапевтический агент.
7. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту композиции по любому из пп.1-6, тем самым обеспечивая лечение рака у пациента.
8. Способ по п.7, дополнительно включающий применение по меньшей мере второй терапии пациенту.
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что вторая терапия включает хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию или иммунотерапию.
10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что пациент представляет собой человека.
11. Способ по любому из пп.7-10, где композицию вводят с помощью парентерального введения.
12. Способ по любому из пп.7-10, где композицию вводят с помощью внутривенной, внутримышечной, подкожной или внутрибрюшинной инъекции.
13. Способ по любому из пп.7-12, дополнительно включающий проведение противораковой терапии.
14. Способ по п.13, в котором противораковая терапия включает (i) химиотерапию, (ii) иммунотерапию, (iii) лучевую терапию, (iv) хирургическое лечение или (v) любую их комбинацию.
15. Применение композиции по любому из пп.1-6 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака у пациента.
16. Применение по п.15, где субъекту дополнительно проводят противораковую терапию.
17. Применение по п.16, где противораковая терапия включает (i) химиотерапию, (ii) иммунотерапию, (iii) лучевую терапию, (iv) хирургическое лечение или (v) любую их комбинацию.



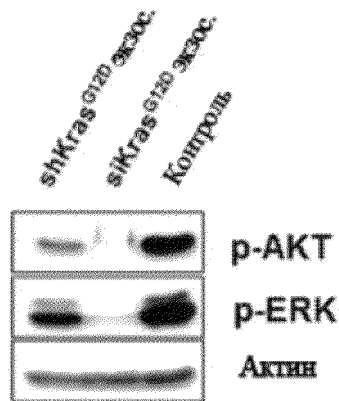
Фиг. 1А



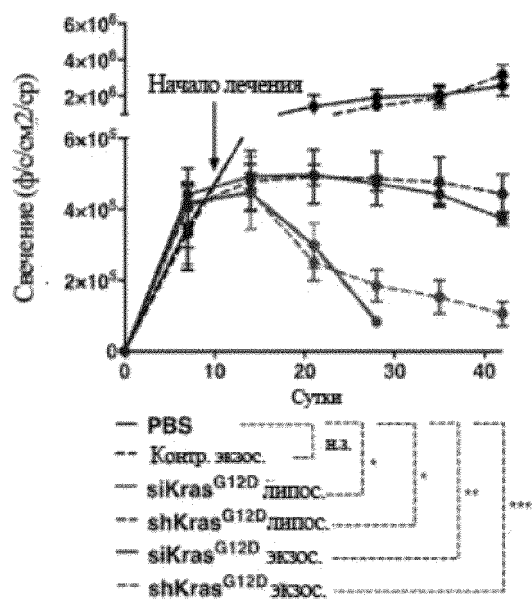
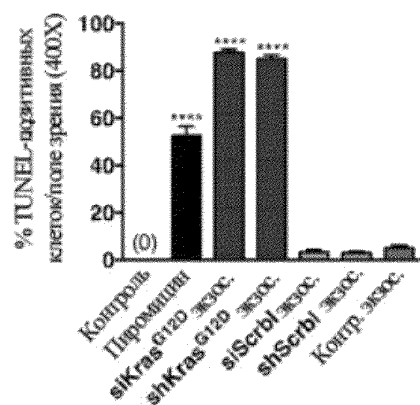
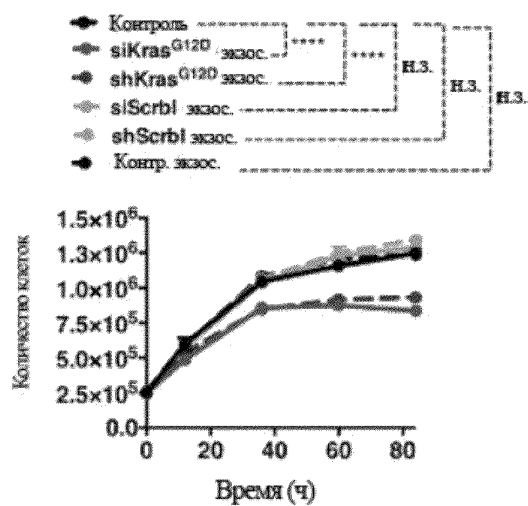
Фиг. 1В

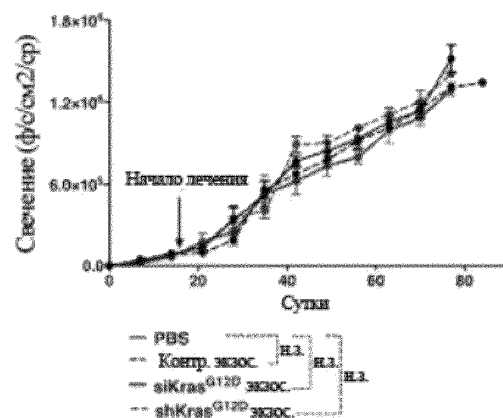


Фиг. 1С

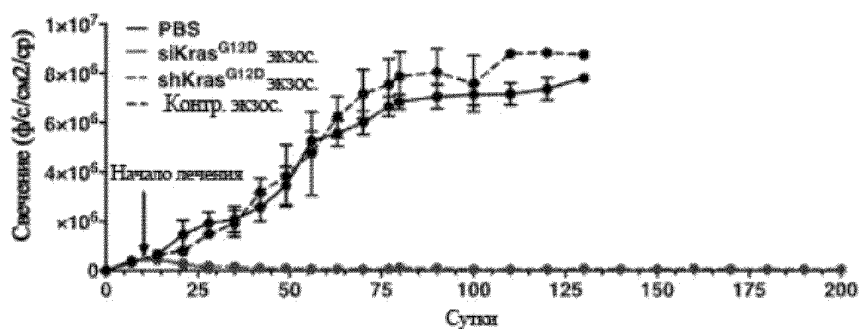


Фиг. 1D

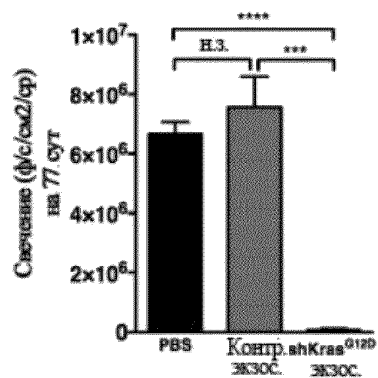




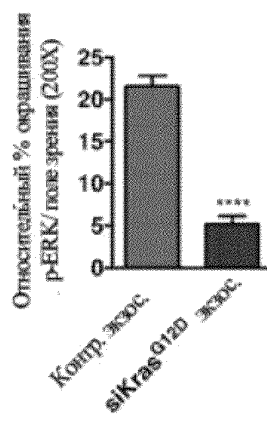
Фиг. 2В



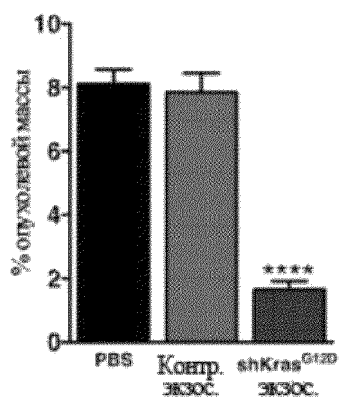
Фиг. 2С



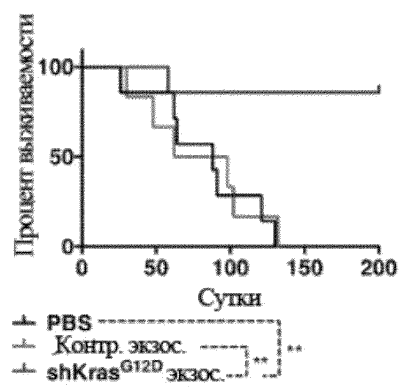
Фиг. 2Д



Фиг. 2Е



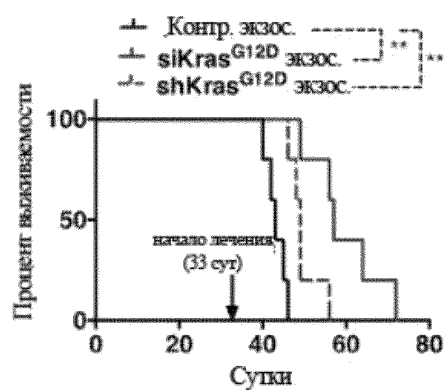
Фиг. 2F



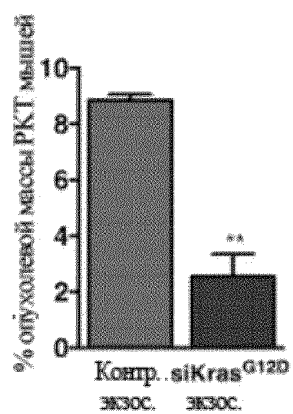
Фиг. 2G



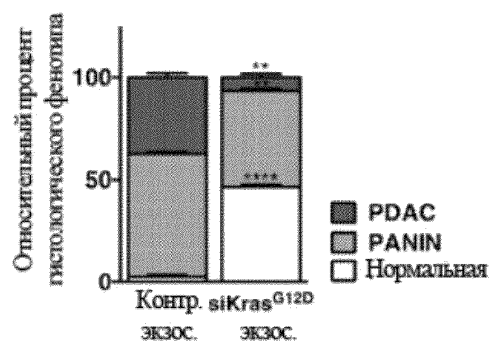
Фиг. 3А



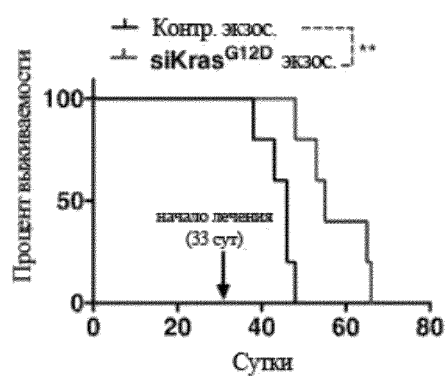
Фиг. 3В



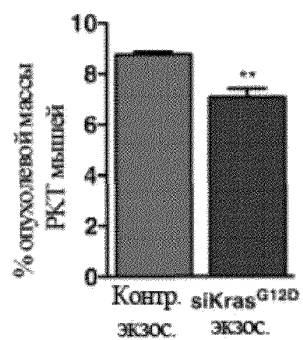
Фиг. 3С



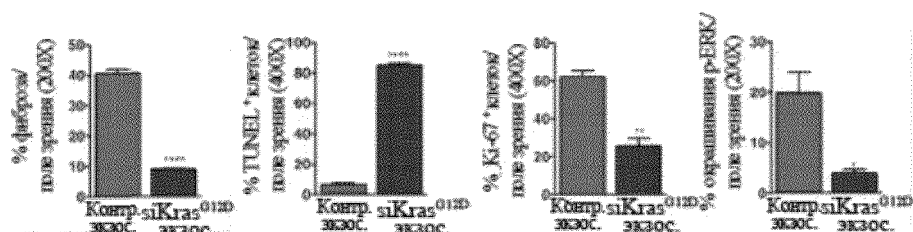
Фиг. 3D



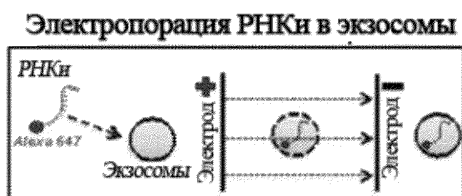
Фиг. 3Е



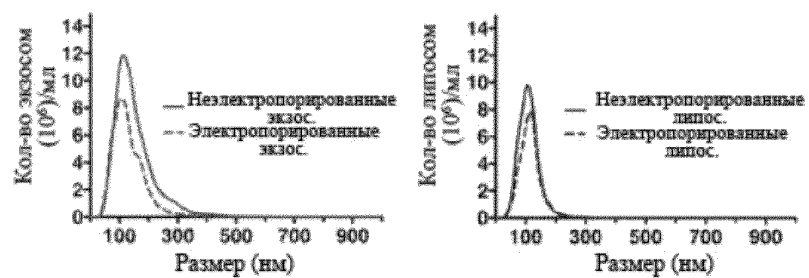
Фиг. 3F



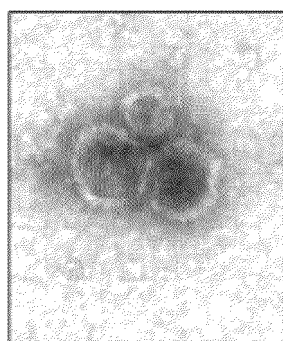
Фиг. 3G



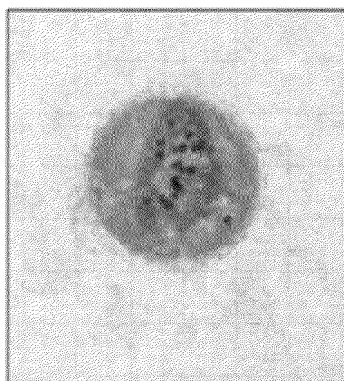
Фиг. 4A



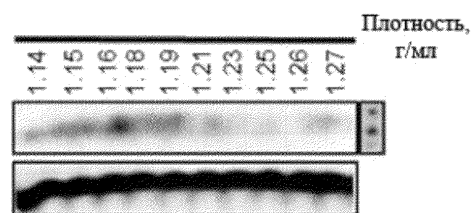
Фиг. 4B



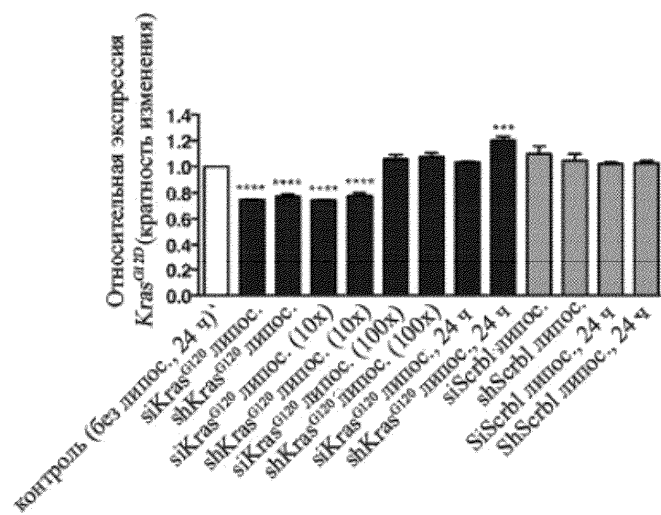
Фиг. 4C



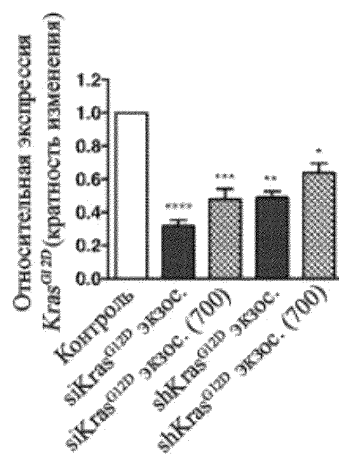
Фиг. 4D



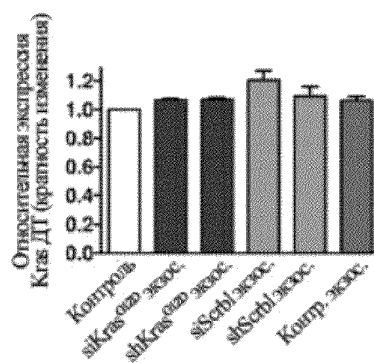
Фиг. 4Е



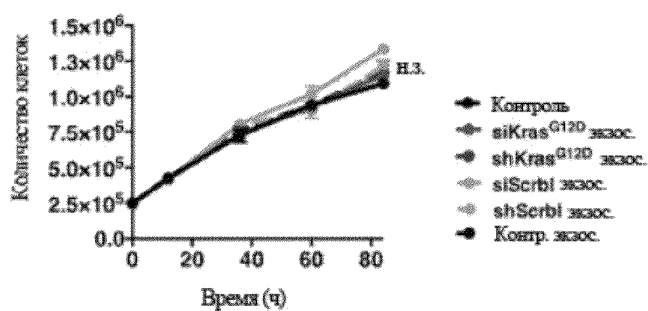
Фиг. 4F



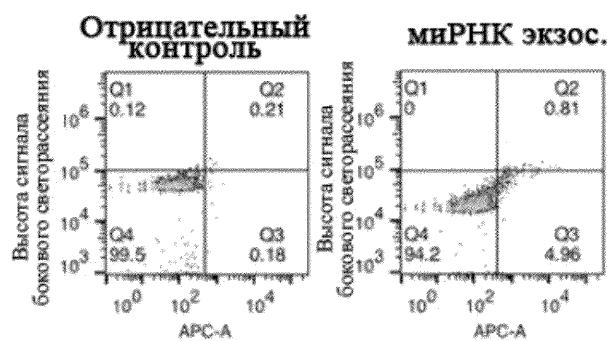
Фиг. 4G



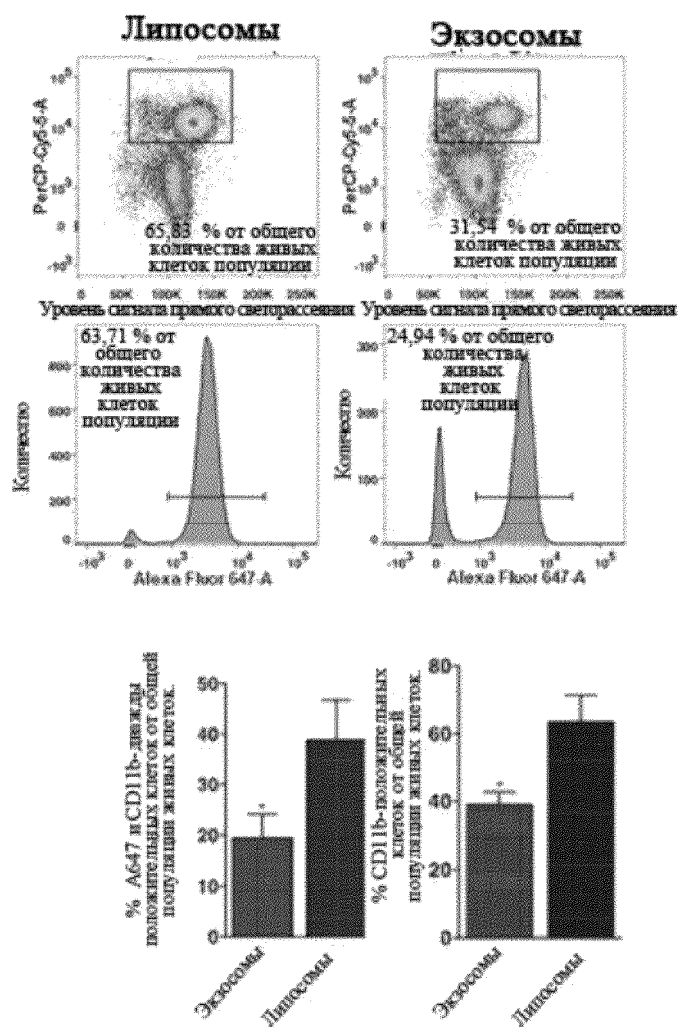
Фиг. 4H



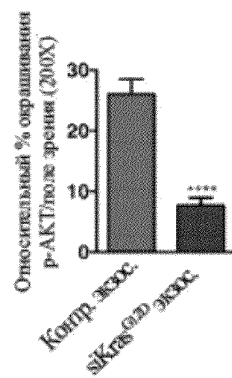
Фиг. 4I



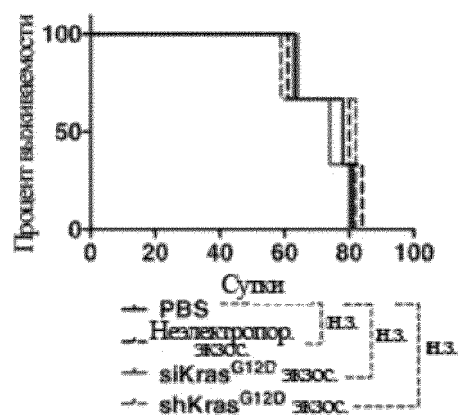
Фиг. 5A



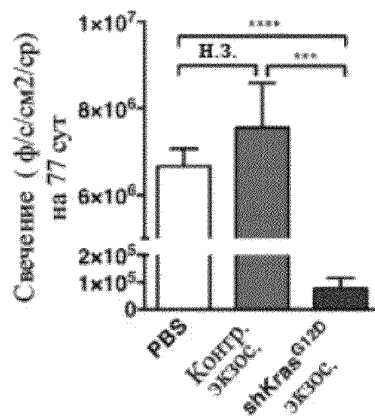
Фиг. 5B



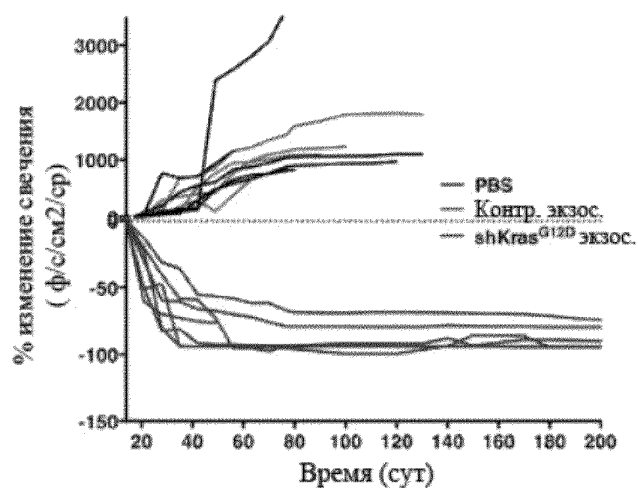
Фиг. 5С



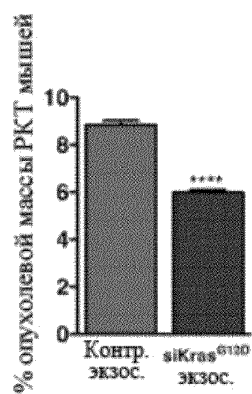
Фиг. 5D



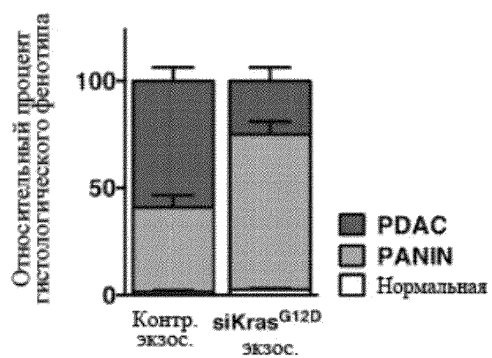
Фиг. 6А



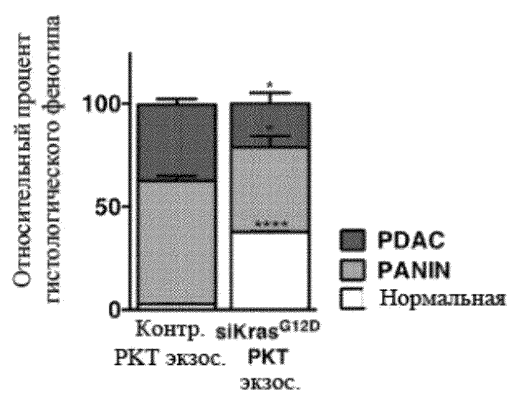
Фиг. 6В



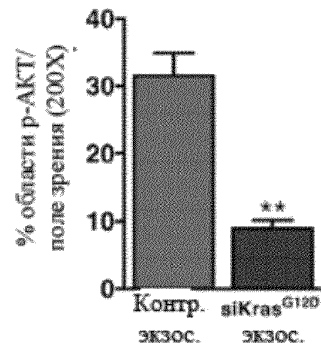
Фиг. 7А



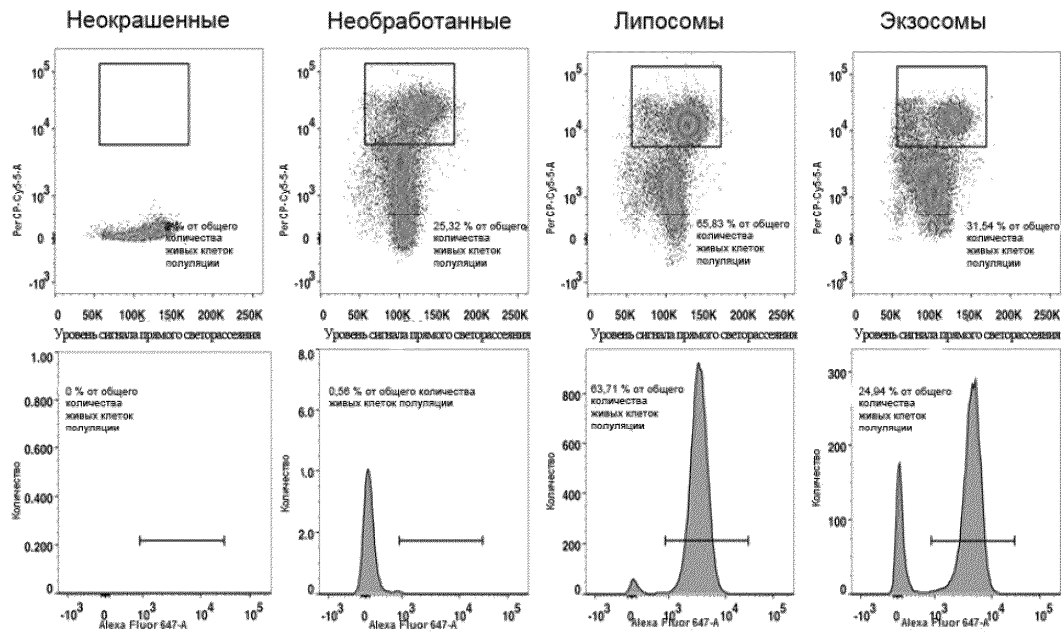
Фиг. 7В



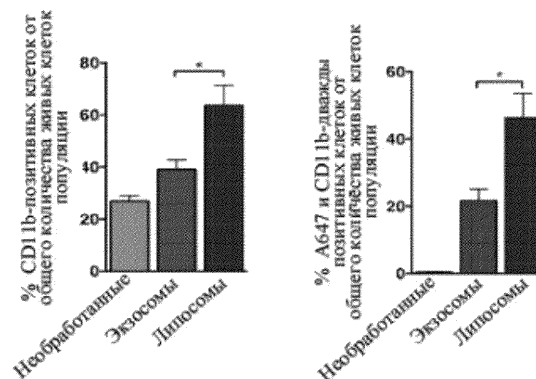
Фиг. 7С



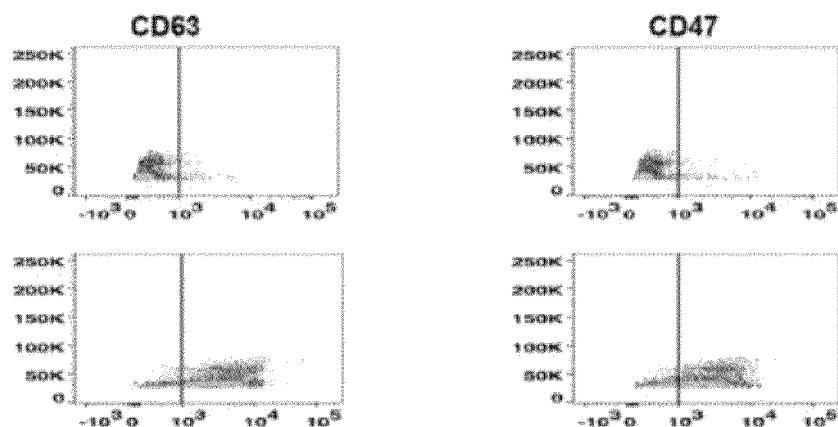
Фиг. 7D



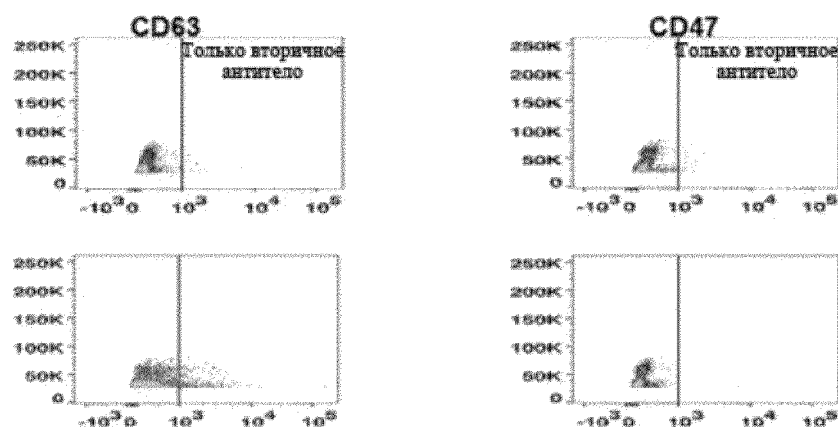
Фиг. 8A



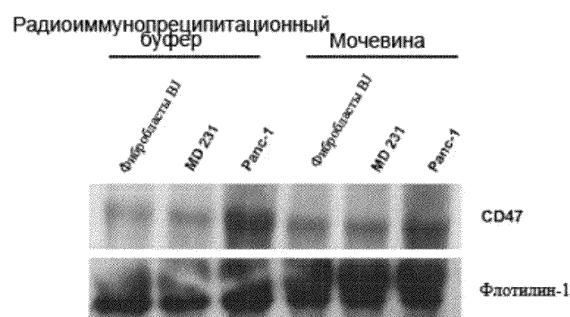
Фиг. 8Б



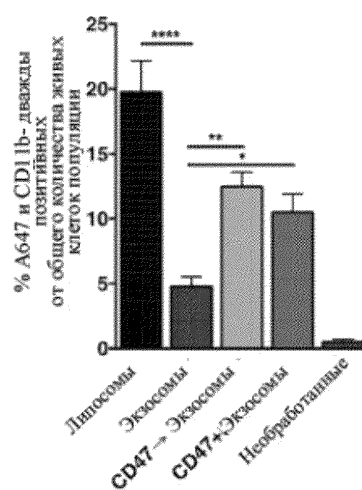
Фиг. 9А



Фиг. 9Б

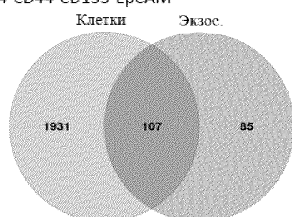


Фиг. 9С

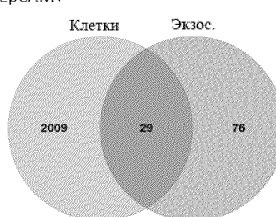


Фиг. 10

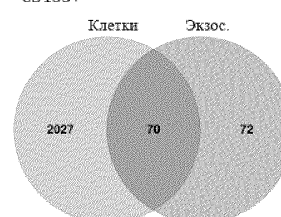
Субпопуляция клеточной линии  
рака поджелудочной железы Т3М4  
и соответствующие экзосомы:  
CD24-CD44-CD133-EpCAM-



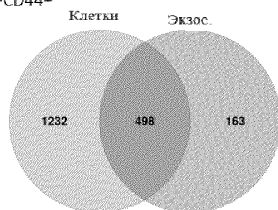
Субпопуляция клеточной линии  
рака поджелудочной железы Т3М4  
и соответствующие экзосомы:  
EpCAM+



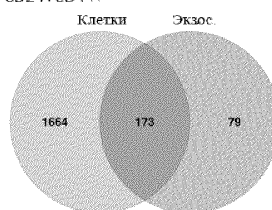
Субпопуляция клеточной линии  
рака поджелудочной железы Т3М4  
и соответствующие экзосомы:  
CD133+



Субпопуляция клеточной линии  
рака поджелудочной железы Т3М4  
и соответствующие экзосомы:  
CD24+CD44+



Субпопуляция клеточной линии  
рака поджелудочной железы Т3М4  
и соответствующие экзосомы:  
CD24+CD44+



Фиг. 11

