

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290482** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.01.25

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) **КОНСТРУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ВЕЗИКУЛА-ASO, НАЦЕЛЕННЫЕ НА СЕВР/β**

(31) 62/886,930; 62/900,136; 62/936,220;
62/944,204; 62/989,540; 63/023,065;
63/035,357

(32) 2019.08.14; 2019.09.13; 2019.11.15;
2019.12.05; 2020.03.13; 2020.05.11;
2020.06.05

(33) US

(86) PCT/US2020/046563

(87) WO 2021/030780 2021.02.18

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

(72) Изобретатель:

Бурзын Далия, Камеркар Сушрут,
Боутин Адам Т., Брум Венди,
Сатхианараянан Срирам, Верма
Аджай (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к внеклеточным везикулам, например экзосомам, содержащим антисмысловой олигонуклеотид (ASO), причем ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте СЕВР/β. В данном документе также предложены способы получения экзосом и способы применения указанных экзосом для лечения и/или предотвращения заболеваний или нарушений.

A1

202290482

202290482

A1

КОНСТРУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ВЕЗИКУЛА-ASO, НАЦЕЛЕННЫЕ НА СЕВР/ВЕТА

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

[0001] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя: 4000_058PC07_Seqlisting_ST25.txt; размер: 280024 байта; и дата создания: 13 августа 2020 г.), поданном вместе с заявкой, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Данная заявка РСТ испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/886930, поданной 14 августа 2019 г.; 62/900136 поданной 13 сентября 2019 г.; 62/936220 поданной 15 ноября 2019 г.; 62/944204, поданной 5 декабря 2019 г.; 62/989540, поданной 13 марта 2020 г.; 63/023065, поданной 11 мая 2020 г.; 63/035357, поданной 5 июня 2020 г.; каждая из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к внеклеточным везикулам (ВВ), например, экзосомам, содержащим антисмысловой олигонуклеотид (ASO), где ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в *транскрипте СЕВР/β*. В некоторых аспектах изобретения внеклеточная везикула дополнительно содержит каркасный белок.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Экзосомы представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, которые естественным образом продуцируются каждой эукариотической клеткой. Экзосомы содержат мембрану, которая закрывает внутреннее пространство (т.е. просвет). В качестве средств доставки лекарственных веществ ВВ, например, экзосомы, предлагают много преимуществ по сравнению с традиционными способами доставки лекарственных веществ, представляя новый способ лечения во многих терапевтических областях. В частности, экзосомы обладают изначально низкой иммуногенностью, даже при введении другим видам.

[0005] Антисмысловые олигонуклеотиды оказались мощным средством для регуляции экспрессии генов-мишеней *in vitro* или *in vivo*. Тем не менее, остается потребность в улучшении стабильности и нацеленности ASO *in vivo*. Соответственно, для

лучшего терапевтического применения и других применений технологий на основе ВВ необходимы новые и более эффективные сконструированные ВВ (например, экзосомы), особенно те, которые можно использовать для доставки терапевтических агентов, способных снижать экспрессию гена, связанного с заболеванием (например, N для злокачественного новообразования).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле, содержащей антисмысловой олигонуклеотид (ASO), который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β* (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13). В некоторых аспектах ASO не представляет собой TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO: 90).

[0007] В некоторых аспектах внеклеточная везикула нацелена на клетку, выбранную из группы, состоящей из макрофага, клетки-супрессора миелоидного происхождения (MDSC), моноцита, базофила, нейтрофила, эозинофила и любой их комбинации.

[0008] В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-518 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, или нуклеотидов 521-2113 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*. В некоторых аспектах ASO способна снижать экспрессию белка *CEBP/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), где клетка человека экспрессирует белок *CEBP/β*. В некоторых аспектах экспрессия белка *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55% по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.

[0009] В некоторых аспектах ASO способна снижать уровень мРНК *CEBP/β* в клетке

человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *CEBP/β*. В некоторых аспектах уровень мРНК *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55% по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.

[0010] В некоторых аспектах ASO представляет собой гэпмер, миксмер или тоталмер. В некоторых аспектах ASO содержит один или более аналогов нуклеозидов. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают 2'-О-алкил-РНК; 2'-О-метил РНК (2'-ОМе); 2'-алкокси-РНК; 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ); 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-РНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA; или бициклический аналог нуклеозида. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов представляют собой модифицированный по сахару нуклеозид. В некоторых аспектах модифицированный сахаром нуклеозид представляет собой повышающий аффинность модифицированный по сахару в положении 2' нуклеозид. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают LNA.

[0011] В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ), α-L-LNA, β- D-LNA, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-LNA, окси-LNA, тио-LNA и любой их комбинации. В некоторых аспектах ASO содержит одно или более 5'-метилцитозиновых азотистых оснований.

[0012] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в (i) 5'-нетранслируемой области (UTR); (ii) кодирующей области; или (iii) 3'-UTR транскрипта *CEBP/β*. В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей (i) нуклеотиды 1–600 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотиды 100–600 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 200–600 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 300–600 SEQ ID NO: 13; (v) 400–600 SEQ ID NO: 13, (vi) нуклеотиды 500–1000 SEQ ID NO: 13; (vii) нуклеотиды 900–1200 SEQ ID NO: 13; (viii) нуклеотиды 1000–1300 SEQ ID NO: 13; (ix) нуклеотиды 1300–1500 SEQ ID NO: 13; (x) 489–649 SEQ ID NO: 13; (xi) нуклеотиды 594–728 SEQ ID NO: 13; (xii) нуклеотиды 765–700 SEQ ID NO: 13; (xiii)

нуклеотиды 936–1076 SEQ ID NO: 13; (xiv) нуклеотиды 999–2068 SEQ ID NO: 13; (xv) 1203–1357 SEQ ID NO: 13; (xvi) нуклеотиды 1355–1487 SEQ ID NO: 13 (xvii) 529–609 SEQ ID NO: 13; (xviii) нуклеотиды 634–688 SEQ ID NO: 13; (xix) нуклеотиды 805-700 SEQ ID NO: 13; (xx) нуклеотиды 976–1036 SEQ ID NO: 13; (xxi) нуклеотиды 1039–2028 SEQ ID NO: 13; (xxii) 1243–1317 SEQ ID NO: 13; или (xxiii) нуклеотиды 1395–1447 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) 539-599 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотидов 644-678 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотидов 815-690 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотидов 986-1026 SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотидов 1049-2018 SEQ ID NO: 13; (vi) 1253-1307 SEQ ID NO: 13; или (vii) нуклеотидов 1405-1437 SEQ ID NO: 13.

[0013] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности, выбранной из последовательностей на Фиг. 1.

[0014] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность полностью комплементарна нуклеотидной последовательности в транскрипте СЕВР/β. В некоторых аспектах ASO содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 194-296, с одним или более несовпадениями. В некоторых аспектах ASO имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкций на Фиг. 1, где заглавная буква обозначает модифицированный сахаром нуклеозид, а строчная буква обозначает ДНК. В некоторых аспектах длина ASO составляет от 14 до 20 нуклеотидов.

[0015] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых аспектах одна или более модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатные связи. В некоторых аспектах модифицированы по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей. В некоторых аспектах каждая из межнуклеозидных связей в ASO представляет собой фосфоротиоатную связь.

[0016] В некоторых аспектах внеклеточный везикул дополнительно содержит заякоривающий фрагмент. В некоторых аспектах ASO связан с заякоривающим фрагментом. В некоторых аспектах внеклеточный везикул дополнительно содержит экзогенный нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химическое соединение, РНК-аптамер или любую их комбинацию. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит микропротеин, сконструированный белок с

анкириновыми повторами (дарпин), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжье наноантитело или любую их комбинацию.

[0017] В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, однодоменное антитело, содержащее только тяжелую цепь антитело (VHH), одноцепочечное антитело, содержащее только тяжелую цепь акулье антитело (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или любую их комбинацию.

[0018] В некоторых аспектах антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

[0019] В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на печень, сердце, легкие, мозг, почки, центральную нервную систему, периферическую нервную систему, мышцы, кости, сустав, кожу, кишечник, мочевого пузырь, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на опухолевые клетки, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, макрофаги, нейроны, гепатоциты, клетки Купфера, клетки миелоидного происхождения (например, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, гемопоэтическую стволовую клетку, MDSC (например, моноцитарные MDSC или гранулоцитарные MDSC)) или любую их комбинацию.

[0020] В некоторых аспектах ВВ содержит каркасный фрагмент, связывающий экзогенный нацеливающий фрагмент с ВВ. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас X. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас Y.

[0021] В некоторых аспектах каркас X представляет собой каркасный белок, способный прикреплять ASO на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

[0022] В некоторых аспектах каркас Y представляет собой каркасный белок, способный прикреплять ASO на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

[0023] В некоторых аспектах ASO связан с заякоривающим фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ. В некоторых аспектах ASO связан с заякоривающим фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит стерол, GM1, липид, витамин, небольшую молекулу, пептид или их комбинацию. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит холестерин. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит

фосфолипид, лизофосфолипид, жирную кислоту, витамин (например, витамин D и/или витамин E) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ASO связан с заякоривающим фрагментом и/или каркасным фрагментом с помощью линкера.

[0024] В некоторых аспектах ASO связан с ВВ с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер представляет собой полипептид. В некоторых аспектах линкер представляет собой неполипептидный фрагмент. В некоторых аспектах линкер содержит этиленгликоль. В некоторых аспектах линкер содержит HEG, TEG, PEG или любую их комбинацию.

[0025] В некоторых аспектах линкер включает акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (сложный эфир NHS), дигоксигенин (сложный эфир NHS), холестерин-TEG, I-LINKER™, аминомодификатор (например, аминомодификатор C6, аминомодификатор C12, аминомодификатор C6 dT или аминомодификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-TEG, двойной биотин, PC-биотин или дестиобиотин), модификацию тиола (модификатор тиола C3 S-S, дитиол или модификатор тиола C6 S-S), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат. В некоторых аспектах линкер содержит (i) малеимидный фрагмент и (ii) валин-аланин-р-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-р-аминобензилкарбамат.

[0026] В некоторых аспектах ВВ представляет собой экзосому.

[0027] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к антисмысловому олигонуклеотиду (ASO), содержащему непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β* (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13). В некоторых аспектах ASO не представляет собой или представляет собой TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO: 90). В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-518 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, или нуклеотидов 521-2113 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах их непрерывная нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*. В

некоторых аспектах ASO способна снижать экспрессию белка СЕВР/β в клетке человека (например, иммунной клетке), где клетка человека экспрессирует белок СЕВР/β. В некоторых аспектах экспрессия белка СЕВР/β снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55% по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка СЕВР/β в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO. В некоторых аспектах ASO способна снижать уровень мРНК *СЕВР/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *СЕВР/β*. В некоторых аспектах уровень мРНК *СЕВР/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55% по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *СЕВР/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.

[0028] В некоторых аспектах ASO представляет собой гэпмер, миксмер или тоталмер. В некоторых аспектах ASO содержит один или более аналогов нуклеозидов. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают 2'-О-алкил-РНК; 2'-О-метил РНК (2'-ОМе); 2'-алкокси-РНК; 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ); 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-РНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA; или бициклический аналог нуклеозида (LNA). В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов представляют собой модифицированный по сахару нуклеозид. В некоторых аспектах модифицированный по сахару нуклеозид представляет собой повышающий аффинность модифицированный по сахару в положении 2' нуклеозид. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах один или более аналогов нуклеозидов включают LNA. В некоторых аспектах LNA выбрана из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ), α-L-LNA, β- D-LNA, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-LNA, окси-LNA, тио-LNA и любой их комбинации. В некоторых аспектах ASO содержит одно или более 5'-метилцитозиновых азотистых оснований.

[0029] В некоторых аспектах ASO содержит любую из последовательностей от SEQ

ID NO: 194 до SEQ ID NO: 296. В некоторых аспектах ASO имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкций на Фиг. 1, где заглавная буква обозначает модифицированный по сахару нуклеозид, а строчная буква обозначает ДНК. В некоторых аспектах длина ASO составляет от 14 до 20 нуклеотидов.

[0030] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых аспектах одна или более модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатные связи. В некоторых аспектах модифицированы по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей. В некоторых аспектах каждая из межнуклеозидных связей в ASO представляет собой фосфоротиоатную связь.

[0031] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к конъюгату, содержащему ASO, описанный в данном документе, ковалентно присоединенный по меньшей мере к одному ненуклеотидному или неполинуклеотидному фрагменту. В некоторых аспектах ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент содержит белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

[0032] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточным везикулам, содержащим описанный в данном документе ASO или описанный в данном документе конъюгат.

[0033] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей внеклеточную везикулу, описанную в данном документе, ASO, описанный в данном документе, или конъюгат, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.

[0034] В некоторых аспектах фармацевтически приемлемая соль включает соль натрия, соль калия, соль аммония или любую их комбинацию. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

[0035] В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист СЕВР/β. В некоторых аспектах антагонист СЕВР/β представляет собой химическое соединение, кРНК, кШРНК, антисмысловый олигонуклеотид, белок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антагонист СЕВР/β представляет собой антитело к СЕВР/β или его фрагмент. В некоторых аспектах антагонист СЕВР/β включает антисмысловый олигонуклеотид (ASO).

[0036] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к набору, содержащему описанную в данном документе внеклеточную везикулу, описанный в

данному документу ASO, описанный в данном документе конъюгат или описанную в данном документе фармацевтическую композицию, а также инструкции по применению.

[0037] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к диагностическому набору, содержащему описанную в данном документе внеклеточную везикулу, описанную в данном документе ASO, описанный в данном документе конъюгат или описанную в данном документе фармацевтическую композицию, а также инструкции по применению.

[0038] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу ингибирования или снижения экспрессии белка СЕВР/β в клетке, включающему введение в клетку, экспрессирующую белок СЕВР/β, описанной в данном документе внеклеточной везикулы, описанного в данном документе ASO, описанного в данном документе конъюгата, или описанной в данном документе фармацевтической композиции, при этом экспрессия белка СЕВР/β в клетке ингибируется или снижается после введения.

[0039] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе внеклеточной везикулы, описанного в данном документе ASO, описанного в данном документе конъюгата или описанной в данном документе фармацевтической композиции.

[0040] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к применению описанной в данном документе внеклеточной везикулы, описанного в данном документе ASO, описанного в данном документе конъюгата или описанной в данном документе фармацевтической композиции в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта.

[0041] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе внеклеточной везикулы, описанного в данном документе ASO, описанного в данном документе конъюгата или описанной в данном документе фармацевтической композиции, при этом заболевание или нарушение выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, нарушения обмена веществ/ССЗ и любой их комбинации.

[0042] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к применению описанных в данном документе внеклеточных везикул, описанных в данном документе ASO, описанных в данном документе конъюгатов или описанных в данном документе фармацевтических композиций в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания или расстройства у нуждающемся в этом субъекту, при этом заболевание или нарушение выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания,

нарушения обмена веществ/ССЗ и любой их комбинации.

[0043] В некоторых аспектах ASO ингибирует или снижает экспрессию мРНК *СЕВР/β* в клетке после введения. В некоторых аспектах уровень мРНК *СЕВР/β* снижается на по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на около 100% после введения по сравнению с уровнем мРНК *СЕВР/β* в клетке, которая не подвергалась воздействию ASO. В некоторых аспектах экспрессия белка *СЕВР/β* снижается на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% после введения по сравнению с экспрессией белка *СЕВР/β* в клетке, которая не подвергалась воздействию ASO.

[0044] В некоторых аспектах внеклеточный везикул, ASO, конъюгат или фармацевтическую композицию вводят интракардиально, перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, пульмонально, местно или интравентрикулярно.

[0045] В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из следующего: фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, лимфома, лейкемия, рак печени, глиобластома, меланома, миелома, базальноклеточный рак, аденокарцинома, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатома, рак желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональный рак, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиома, глиобластома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, фолликулярная лимфома, лимфома Ходжкина, В-клеточная лимфома и любая их комбинация.

[0046] В некоторых аспектах заболевание или нарушение включает фиброз. В

некоторых аспектах заболевание или нарушение включает фиброз, выбранный из группы, состоящей из следующего: фиброз печени (НАСГ), цирроз, легочный фиброз, кистозный фиброз, хронический язвенный колит/ВЗК, фиброз мочевого пузыря, фиброз почек, CAPS (синдром Макла-Уэлса), предсердный фиброз, эндомикардиальный фиброз, перенесенный инфаркт миокарда, глиальный рубец, артериальная ригидность, артрофиброз, болезнь Крона, контрактура Дюпюитрена, келоидный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, болезнь Пейрони, нефрогенный системный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, ретроперитонеальный фиброз, склеродермия/системный склероз, адгезивный капсулит и любая их комбинация.

[0047] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу активации менингеальных макрофагов, лечения рака центральной нервной системы, индукции M1 поляризации менингеальных макрофагов или индукции инфльтрации менингеальных макрофагов у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение описанной в данном документе внеклеточной везикулы, описанного в данном документе ASO, описанного в данном документе конъюгата или описанной в данном документе фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0048] На Фиг. 1 представлена таблица, в которой перечислены различные последовательности ASO, нацеленные на транскрипт *СЕВР/β*. Таблицы включают следующую информацию (слева направо): (i) описание ASO, (ii) последовательность ASO без какой-либо конкретной конструкции или химической структуры, (iii) SEQ ID NO, предназначенный только для последовательности ASO, (iv) длину ASO, (v) последовательность ASO с химической структурой и (vi) начальное и конечное положения мишени в целевой последовательности транскрипта (SEQ ID: 13, как указано). Размер ASO от 5' до 3'. Символы в химических структурах следующие: Nb означает LNA; dN означает ДНК; 5MdC означает 5-метил-dC; Nm означает МОЕ; и s означает фосфоротиоат.

[0049] На Фиг. 2А-2Е представлены графические представления уровней Cy5, определенных по флуоресценции (СИФ) и нормализованных к контролю PBS. Cy5 используется в качестве маркера поглощения экзосом, содержащих ASO («Exo ASO»; слева) или свободных ASO (справа), как указано, для различных типов клеток, выделенных из крови (Фиг. 2А), печени (Фиг. 2В), селезенки (Фиг. 2С) и опухоли (СТ26; Фиг. 2D-2Е). Горизонтальные линии указывают на среднюю СИФ.

[0050] На Фиг. 2F-2К представлены флуоресцентные изображения образцов ткани костного мозга, взятых у двух мышей, каждая из которых демонстрирует поглощение

экзосом, содержащих ASO (Фиг. 2F-2G) или свободный ASO (Фиг. 2H-2I), по сравнению с отрицательным контролем PBS (Фиг. 2J-2K).

[0051] На Фиг. 2L представлено графическое представление результатов проточной цитометрии для количественного определения числа меченных Cy5 опухолевых клеток и макрофагов после внутриопухолевого введения флуоресцентно меченного ехоASO.

[0052] На Фиг. 2M представлено графическое представление результатов проточной цитометрии для количественного определения количества меченых Cy5 миелоидных супрессорных клеток, макрофагов и дендритных клеток после внутриопухолевого введения флуоресцентно меченного ехоASO. MDSC = супрессорные клетки миелоидного происхождения; mMDSC = моноцитарные MDSC; gMDSC = гранулоцитарные MDSC; cDC1 = обычные дендритные клетки 1 типа; cDC2 = обычные дендритные клетки 2 типа.

[0053] На Фиг. 2N представлено графическое изображение уровня экспрессии когнатных рецепторов PTGFRN при глиобластоме (GBM) в различных типах клеток по пяти мишеням.

[0054] На Фиг. 3A-3B представлено графическое представление нормализованной экспрессии генов (%) *CEBP/β* (Фиг. 3A) и *CD163* (Фиг. 3B) в поляризованных макрофагах после обработки *CEBP/β*-Ехо-ASO, свободным ASO к *CEBP/β*, или скремблированным Ехо ASO (отрицательным контролем), как указано (Фиг. 3A-3B).

[0055] На Фиг. 4A-4N представлены графические изображения экспрессии *TGFβ1* (Фиг. 4A), *CD163* (Фиг. 4B), *STAT5b* (Фиг. 4C), *STAT6* (Фиг. 4D), *CEBP/β* (Фиг. 4E), *IL12β* (Фиг. 4F), *AIF1* (Фиг. 4G), *MYC* (Фиг. 4H), *HLA DQA* (Фиг. 4I), *CD74 (MIF)* (Фиг. 4J), TNF-α (Фиг. 4K), IL12p40 (Фиг. 4L), IL-10 (Фиг. 4M), TARC/CCL17 (Фиг. 4N), и CD206 (Фиг. 4O) в первичных макрофагах человека, необработанных или обработанных скремблированным Ехо ASO, *CEBP/β*-Ехо-ASO, или свободным ASO к *CEBP/β*, как указано *** = $p < 0,001$; и **** = $P < 0,0001$.

[0056] На Фиг. 5A-5F представлено графическое представление результатов проточной цитометрии для выделения CD11b⁺ клеток. На Фиг. 5A-5C показана экспрессия CD45 перед обработкой (Фиг. 5A), после обработки отрицательным контролем (скремблированный Ехо-ASO; Фиг. 5B) или после обработки Ехо-ASO (Фиг. 5C). На Фиг. 5D-5F показана экспрессия CD11b перед обработкой (Фиг. 5D), после обработки отрицательным контролем (скремблированный Ехо-ASO; Фиг. 5E) или после обработки Ехо-ASO (Фиг. 5F). На Фиг. 5G представлено графическое изображение объема опухоли у мышей после лечения отрицательным контролем (скремблированный Ехо ASO) или после лечения Ехо-ASO.

[0057] На Фиг. 6A-6B представлено графические изображения экспрессии *CEBP/β*

(Фиг. 6А) и *ARG1* (Фиг. 6С) в CD11b-обогащенных клетках по сравнению с небогащенными клетками после воздействия скремблированного Echo-ASO (Фиг. 6А-6В), свободного ASO к *CEBP/β* (Фиг. 6А) или *CEBP/β*-Echo-ASO (Фиг. 6А-6В).

[0058] На Фиг. 7А-7V представлены графические представления экспрессии *STAT6* (Фиг. 7А), *CEBP/β* (Фиг. 7В), *TGFβ1* (Фиг. 7С), *STAT3* (Фиг. 7D), *SIRP-α* (Фиг. 7Е), *CD47* (Фиг. 7F), *NOS2* (Фиг. 7G), *ARG1* (Фиг. 7H), *CD206* (Фиг. 7I), *CD274* (Фиг. 7J), *NLRP3* (Фиг. 7K), *CSF1R* (Фиг. 7L), *CD36* (Фиг. 7M), *STAB1* (Фиг. 7N), *IL13* (Фиг. 7O), *PI3KG* (Фиг. 7P), *LY6C* (Фиг. 7Q), *LY6G* (Фиг. 7R), *IFNβ1* (Фиг. 7S), *IFNγ* (Фиг. 7T), *IFNα1* (Фиг. 7U), и *IL6Rα* (Фиг. 7V) в обогащенных CD11b клетках, обработанных скремблированным или Echo ASO или *CEBP/β*-Echo-ASO, как указано.

[0059] На Фиг. 7W представлено изображение иерархической кластеризации экспрессии генов в обогащенных CD11b опухолеассоциированных миелоидных клетках, выполненное с помощью Nanostring с использованием панели nCounter Human Myeloid Innate Immunity версии 2.

[0060] На Фиг. 8А и 8В представлено графическое представление нормализованной экспрессии генов (%) *CEBP/β* (Фиг. 8А) и *TGFβ1* (Фиг. 8В) в первичных макрофагах M2 человека, которые были поляризованы обработкой IL-13/TGFβ, а затем обработаны *CEBP/β* Echo ASO, свободным ASO к *CEBP/β* или скремблированным Echo ASO (отрицательным контролем), как указано.

[0061] На Фиг. 9 представлено графическое изображение поглощения экзосом, о чем свидетельствуют уровни Cy5, в TD2 легкого после назального введения отрицательного контроля (-С) или Echo-ASO-Cy5 («IN») мышам, не подвергавшимся лечению, или мышам, которым вводили блеомицин для индукции легочного фиброза («получавшие блеомицин мыши»).

[0062] На Фиг. 10А-10Н представлены изображения флуоресцентной гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом нормальной и индуцированной фиброзной тканью легкого.

[0063] На Фиг. 11А-11Н представлены изображения гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом нормальной и индуцированной фиброзной тканью легкого.

[0064] На Фиг. 12А-12В представлены изображения флуоресцентной гибридизации *in situ* для обнаружения поглощения экзосом легочной тканью у мышей Нера1-6.

[0065] На Фиг. 13А-13Н показана противоопухолевая активность echoASO-*CEBP/β* по сравнению со свободным ASO к *CEBP/β*, антителами к PD1 и антителами к CSF1R. На Фиг. 13А показана хронологическая шкала введения echoASO-*CEBP/β*, свободного ASO к

СЕВР/β, антитела к PD1 и антитела к CSF1R. На Фиг. 13В показан средний рост опухоли у мышей, получавших echo-ASO-СЕВР/β, ASO-СЕВР/β, антитела к PD1 или антитела к CSF1R (n=10 на группу). На Фиг. 13С-13Н показан рост опухоли у отдельных мышей, получавших что-нибудь из echo-ASO-СЕВР/β (Фиг. 13G), ASO-СЕВР/β (Фиг. 13H), отрицательного контроля PBS (Фиг. 13С), антитела к PD1 (Фиг. 13D), антитела к CSF1R и отрицательного контроля скремблированного echoASO (Фиг. 13F), как указано. CR = количество пациентов с полным ответом.

[0066] На Фиг. 14А показан средний рост опухоли у мышей, получавших echo-ASO-СЕВР/β, ASO-СЕВР/β, антитела к PD-1 или антитела к CSF1R. На Фиг. 14В показана хронологическая шкала введения echoASO-СЕВР/β, свободного ASO к СЕВР/β, антитела к PD-1 и антитела к CSF1R.

[0067] На Фиг. 15А-15Н показана противоопухолевая активность echoASO-СЕВР/β по сравнению со свободным ASO к СЕВР/β, антителами к PD-1 и антителами к CSF1R. На Фиг. 15В-15F показан индивидуальный рост опухоли у мышей, получавших что-нибудь из экзо-ASO-СЕВР/β (Фиг. 15С), ASO-СЕВР/β (Фиг. 15D), отрицательного контроля PBS (Фиг. 15А), антитела к PD-1 (Фиг. 15F), антитела к CSF1R (Фиг. 15Е) и отрицательного контроля скремблированного echoASO (Фиг. 15В), как указано. CR = количество пациентов с полным ответом.

[0068] На Фиг. 16 показан процент выживаемости животных после имплантации опухоли в различных группах лечения.

[0069] На Фиг. 17 показан измеренный объем опухоли после имплантации опухоли для пациентов с полным ответом (CR) при повторном заражении для различных групп лечения.

[0070] На Фиг. 18А показано окрашивание СЕВР/β и DAPI в опухолях Нера 1-6. На Фиг. 18В-18Н показаны образцы печени опухолей Нера 1-6 без лечения (Фиг. 18В) и после введения контроля носителем (Фиг. 18F), свободного ASO к СЕВР/β (Фиг. 18С), echo-СЕВР/β ASO (Фиг. 18D и 18G), и echo-СЕВР/β ASO плюс антитело к PD-1 (Фиг. 18H).

[0071] На Фиг. 19А-19В показаны процент определенных поражений после лечения антителом к PD-1 (Фиг. 19А и 19В), скремблированным echo-ASO с антителом к PD-1 (Фиг. 19В), echo-СЕВР/β ASO (Фиг. 19А и 19В), echo-СЕВР/β ASO с антителом к PD-1 (Фиг. 19В), свободным ASO к СЕВР/β (Фиг. 19А и 19В), анти-CSF1R (Фиг. 19А и 19В), контролем носителем (Фиг. 19В) и для не получавшей лечение группы (Фиг. 19А). На Фиг. 19С показана нормализованная экспрессия mСЕВР/β после лечения антителом к PD-1, скремблированным echo-ASO с антителом к PD-1, echo-СЕВР/β ASO, echo-СЕВР/β ASO с антителом к PD-1, свободным ASO к СЕВР/β, и контролем носителем. На Фиг. 19D и 19E

представлено гистологические изображения опухолевой ткани после введения контрольного носителя (Фиг. 19D) или *exo*-*CEBP*/ β ASO (Фиг. 19E).

[0072] На Фиг. 20 показано отношение массы печени к массе тела по сравнению с процентом определенных поражений после лечения анти-PD-1, *exo*-*CEBP*/ β ASO, свободным ASO к *CEBP*/ β , анти-CSF1R и для не получавшей лечение группы.

[0073] На Фиг. 21A-21L представлены изображения, демонстрирующие экспрессию провоспалительных маркеров M1 TNF α (Фиг. 21A, 21E и 21I), CD11b (Фиг. 21B, 21F и 21J), INOS (Фиг. 21C, 21G и 21K) и F4/80 (Фиг. 21D, 21H и 21L) после инъекции скремблированным *exo*ASO (Фиг. 21A-21D), свободным ASO к *CEBP*/ β (Фиг. 21E-21H) или *exo*-*CEBP*/ β ASO (Фиг. 21I-21L).

[0074] На Фиг. 22A-22D представлены схематические изображения иллюстративных слитых конструкций CD47-каркас X, которые могут экспрессироваться на внеклеточных везикулах, описанных в данном документе, вместе с ASO, нацеленным на транскрипт *CEBP*/ β . На Фиг. 22A показаны конструкции, содержащие внеклеточный домен CD47 дикого типа (с заменой C15S), слитый либо с меченым FLAG (1083 и 1084), либо не меченым FLAG (1085 и 1086) полноразмерным каркасом X (1083 и 1086) или укороченным каркасом X (1084 и 1085). На Фиг. 22B показаны конструкции, содержащие внеклеточный домен Velcro-CD47, слитый либо с меченым FLAG (1087 и 1088), либо не меченым FLAG (1089 и 1090) полноразмерным каркасом X (1087 и 1090), либо с укороченным каркасом X (1088 и 1089). На Фиг. 22C показаны конструкции, в которых первый трансмембранный домен CD47 дикого типа (с заменой C15S; 1127 и 1128) или Velcro-CD47 (1129 и 1130) заменен фрагментом каркаса X, содержащим трансмембранный домен и первый внеклеточный мотив каркаса X. На Фиг. 22D показаны различные конструкции, содержащие минимальный «аутологичный» пептид (GNYTCEVTELTREGETIHELK; SEQ ID NO: 628), слитый либо с меченым FLAG (1158 и 1159), или не меченым FLAG (1160 и 1161) полноразмерным каркасом X (1158 и 1161) или укороченным каркасом X (1159 и 1160).

[0075] На Фиг. 23 показана экспрессия иллюстративных слитых конструкций мышиный CD47-каркас X, которые могут экспрессироваться на поверхности модифицированных экзосом вместе с ASO, нацеленным на транскрипт *CEBP*/ β . Конструкции содержат внеклеточный домен мышинового CD47 дикого типа (с заменой C15S), слитый либо с меченым FLAG (1923 и 1925), либо не меченым FLAG (1924 и 1922) полноразмерным каркасом X (1923 и 1922) или укороченным каркасом X (1925 и 1924).

[0076] На Фиг. 24A представлена схематическая диаграмма иллюстративной внеклеточной везикулы (например, экзосомы), нацеленной на Tgks, с использованием

слитой конструкции нейротрофин-каркас X, которая может экспрессироваться вместе с ASO, нацеленной на транскрипт *CEBP/β*. Нейротрофины связываются с рецепторами Tgk в виде гомодимера и позволяют ВВ нацеливаться на сенсорный нейрон.

[0077] На Фиг. 24В показана схема иллюстративной внеклеточной везикулы (например, экзосомы), имеющей (i) нейротропизм, а также (ii) антифагоцитарный сигнал, например, CD47 и/или CD24, на внешней поверхности ВВ, который может экспрессироваться вместе с (iii) ASO, нацеленным на транскрипт *CEBP/β*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0078] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к внеклеточной везикуле (ВВ), например, экзосоме, содержащей антисмысловую олигонуклеотид (ASO), где ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*.

I. Определения

[0079] Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0080] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или несколько; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0081] Кроме того, использование в настоящем документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения фраз «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0082] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[0083] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и

научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в раскрытии этого изобретения.

[0084] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записывают слева направо в направлении от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записывают слева направо в направлении от amino-конца к карбокси-концу. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на спецификацию в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

[0085] В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «приблизительно» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значение с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже). Например, если утверждается, что «ASO снижает экспрессию белка СЕВР/β в клетке после введения ASO по меньшей мере примерно на 60%», подразумевается, что уровни СЕВР/β снижаются в диапазоне 50% до 70%.

[0086] Термин «антисмысловый олигонуклеотид» (ASO) относится к олигомеру или полимеру нуклеозидов, таких как встречающиеся в природе нуклеозиды или их модифицированные формы, которые ковалентно связаны друг с другом через межнуклеотидные связи. ASO, пригодный для изобретения, включает по меньшей мере один неприродный нуклеозид. ASO по меньшей мере частично комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, так что ASO гибридизуется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты.

[0087] Предполагается, что термин «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» охватывает множество нуклеиновых кислот. В некоторых аспектах термин «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относится к целевой последовательности, например, пре-

мРНК, мРНК или ДНК *in vivo* или *in vitro*. Когда этот термин относится к нуклеиновым кислотам или нуклеотидам в целевой последовательности, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть природными последовательностями внутри клетки. В других аспектах «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относятся к последовательности в ASO по данному изобретению. Когда этот термин относится к последовательности в ASO, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть не природными, то есть химически синтезированными, ферментативно полученными, рекомбинантно полученными или любой их комбинацией. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO получают синтетическим или рекомбинантным путем, но не являются природной последовательностью или ее фрагментом. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO не встречаются в природе, поскольку они содержат по меньшей мере один аналог нуклеозида, который не встречается в природе.

[0088] Используемый в данном документе термин «нуклеотид» относится к гликозиду, содержащему сахарный фрагмент, основной фрагмент и ковалентно связанную группу (линкерную группу), такую как фосфатная или фосфоротиоатная межнуклеотидная линкерная группа, и охватывает оба природных нуклеотида, такие как ДНК или РНК, и неприродные нуклеотиды, содержащие модифицированные сахарный и/или основные фрагменты, которые также упоминаются в данном документе как «аналоги нуклеотидов». В данном документе один нуклеотид может называться мономером или звеном. В некоторых аспектах термин «аналоги нуклеотидов» относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные сахарные фрагменты. Неограничивающие примеры нуклеотидов, содержащих модифицированные сахарные фрагменты (например, LNA), описаны в другом месте данного документа. В других аспектах термин «аналоги нуклеотидов» относится к нуклеотидам, имеющим фрагменты на основе модифицированных азотистых оснований. Нуклеотиды с фрагментами на основе модифицированных азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, 5-метилцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бром урацил, 5-пропинилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин. В некоторых аспектах термины «нуклеотид», «звено» и «мономер» используются взаимозаменяемо. Следует понимать, что когда речь идет о последовательности нуклеотидов или мономеров, имеется в виду последовательность оснований, таких как А, Т, G, С или U, и их аналогов.

[0089] Термин «нуклеозид», используемый в данном документе, используется для обозначения гликозида, включающего сахарный фрагмент и основной фрагмент, и, следовательно, может использоваться в отношении нуклеотидных звеньев, которые ковалентно связаны межнуклеотидными связями между нуклеотидами ASO. В области

биотехнологии термин «нуклеотид» часто используется для обозначения мономера или звена нуклеиновой кислоты. В контексте ASO термин «нуклеотид» может относиться только к основанию, т. е. к последовательности азотистых оснований, включающей цитозин (ДНК и РНК), гуанин (ДНК и РНК), аденин (ДНК и РНК), тимин (ДНК) и урацил (РНК), для которых подразумевается наличие сахарного остова и межнуклеотидных связей. Аналогичным образом, особенно в случае олигонуклеотидов, в которых модифицированы одна или более межнуклеотидных линкерных групп, термин «нуклеотид» может относиться к «нуклеозиду». Например, термин «нуклеотид» можно использовать даже при указании наличия или природы связей между нуклеозидами.

[0090] Используемый в данном документе термин «длина последовательности нуклеотидов» означает общее количество нуклеотидов (мономеров) в данной последовательности. Например, последовательность ASO-CEBP/ β -540 (SEQ ID NO: 194) имеет 15 нуклеотидов; таким образом, длина последовательности нуклеотидов составляет 15. Поэтому термин «длина последовательности нуклеотидов» используется в данном документе взаимозаменяемо с «количеством нуклеотидов».

[0091] Как понятно специалисту в данной области техники, 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида не содержит 5'-концевую межнуклеотидную линкерную группу, хотя он может содержать 5'-концевую группу.

[0092] Описанные в данном документе соединения могут содержать несколько центров асимметрии и могут присутствовать в форме оптически чистых энантиомеров, смесей энантиомеров, таких как, например, рацематы, смеси диастереоизомеров, диастереоизомерные рацематы или смеси диастереоизомерных рацематов. В некоторых аспектах центр асимметрии может представлять собой асимметрический атом углерода. Термин «асимметрический атом углерода» означает атом углерода с четырьмя различными заместителями. Согласно правилу Кана – Ингольда – Прелонга асимметрический атом углерода может иметь конфигурацию «R» или «S».

[0093] Используемый в данном документе термин «бициклический сахар» относится к модифицированному сахарному фрагменту, содержащему 4-7-членное кольцо, содержащее мостик, соединяющий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что приводит к бициклической структуре. В некоторых аспектах мостик соединяет C2' и C4' сахарного кольца рибоза нуклеозида (т.е. мостик 2'-4'), как это наблюдается в нуклеозидах LNA.

[0094] Используемый в данном документе термин «кодирующая область» или «кодирующая последовательность» представляет собой часть полинуклеотида, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA, или

ТАА) обычно не транслируется в аминокислоту, его можно рассматривать как часть кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области («UTR») и т.п. не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец полученного полипептида, и стоп-кодом трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец полученного полипептида.

[0095] Термин «некодирующая область», используемый в данном документе, означает нуклеотидную последовательность, которая не является кодирующей областью. Примеры некодирующих областей включают, но не ограничиваются ими, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области («UTR»), некодирующие экзоны и т.п. Некоторые из экзонов могут быть целой 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR) или 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) или их частью для каждого транскрипта. Нетранслируемые области важны для эффективной трансляции транскрипта и для контроля скорости трансляции и периода полужизни транскрипта.

[0096] Термин «область» при использовании в контексте нуклеотидной последовательности относится к области этой последовательности. Например, фраза «область в пределах нуклеотидной последовательности» или «область в пределах комплементарной нуклеотидной последовательности» относится к последовательности, которая короче, чем нуклеотидная последовательность, но длиннее, чем по меньшей мере 10 нуклеотидов, расположенных в пределах конкретной нуклеотидной последовательности, или комплементарна нуклеотидной последовательности, соответственно. Термин «подпоследовательность» может также относиться к области нуклеотидной последовательности.

[0097] Термин «расположенная по ходу транскрипции», когда он относится к нуклеотидной последовательности, означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположены на 3'-конце относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах расположенные по ходу транскрипции нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за начальной точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен по ходу транскрипции относительно сайта начала транскрипции.

[0098] Термин «расположенная против хода транскрипции» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной на 5'-конце относительно эталонной нуклеотидной последовательности.

[0099] Используемый в данном документе термин «регуляторная область» относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным против хода транскрипции (5'-некодирующие последовательности), внутри или по ходу транскрипции (3'-некодирующие последовательности) относительно кодирующей области и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов, UTR и структуры «петля-на-стебле». Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут расположены в положении 3' от кодирующей последовательности.

[0100] Используемый в данном документе термин «транскрипт» может относиться к первичному транскрипту, который синтезируется путем транскрипции ДНК и становится матричной РНК (мРНК) после процессинга, т.е. к матричной РНК-предшественнику (пре-мРНК), и к самой процессированной мРНК. Термин «транскрипт» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «пре-мРНК» и «мРНК». После того, как цепи ДНК транскрибируются в первичные транскрипты, вновь синтезированные первичные транскрипты модифицируются несколькими способами для превращения в их зрелые функциональные формы с образованием различных белков и РНК, таких как мРНК, тРНК, рРНК, днРНК, микроРНК и другие. Таким образом, термин «транскрипт» может включать экзоны, интроны, 5'-UTR и 3'-UTR.

[0101] Используемый в данном документе термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид. Она включает, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия приводит к образованию «генного продукта». Используемый в данном документе термин «генный продукт» может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, полученную путем транскрипции гена, либо полипептид, который транслируется с транскрипта. Генные продукты, описанные в данном документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

[0102] Термины «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или

более нуклеиновых кислот относятся к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании (внесении гэпов при необходимости) для максимального соответствия, не учитывая какие-либо консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательностей. Процент идентичности можно определять, используя программное обеспечение или алгоритм для сравнения последовательностей, или путем визуальной оценки. Различные алгоритмы и программное обеспечение, которые известны в данной области техники, могут использоваться для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей.

[0103] Одним из таких неограничивающих примеров алгоритма выравнивания последовательностей является алгоритм, описанный в Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, как модифицировано в Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, и включенный в программы NBLAST и XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). В определенных аспектах может использоваться Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) или Megalign (DNASTAR) представляют собой дополнительные общедоступные программы, которые можно использовать для выравнивания последовательностей. В некоторых аспектах процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяется с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (например, с использованием матрицы NWSgardna.CMP и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 90 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых альтернативных аспектах программа GAP в пакете программного обеспечения GCG, которая включает алгоритм Нидлмана — Вунша (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), может использоваться для определения процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями (например, с использованием матрицы BLOSUM 62 или матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, в некоторых аспектах процент идентичности между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS 4:11-17 (1989)). Например, процент идентичности можно определить с помощью программы ALIGN (версия 2.0) и использования PAM120 с таблицей остатков, штрафом за продолжение гэпа 12 и штрафом за открытие гэпа 4. Специалист в данной области техники может определить соответствующие параметры для максимального выравнивания с

помощью специального программного обеспечения для выравнивания. В некоторых аспектах для программного обеспечения для выравнивания используются параметры по умолчанию.

[0104] В определенных аспектах процент идентичности «X» первой нуклеотидной последовательности со второй нуклеотидной последовательностью рассчитывается как $100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков, оцениваемых как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (выровненных визуальным осмотром или специальной программой для выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности к второй последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности к первой последовательности.

[0105] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[0106] Используемые в данном документе термины «гомологичный» и «гомология» взаимозаменяемы с терминами «идентичность» и «идентичный».

[0107] Термин «его природный вариант» относится к вариантам полипептидной последовательности СЕВР/β или последовательности нуклеиновой кислоты СЕВР/β (например, транскрипт), которые существуют в природе в определенной таксономической группе, такой как млекопитающие, такие как мыши, обезьяны и человек. Как правило, когда речь идет о «природных вариантах» полинуклеотида, термин также может охватывать любой аллельный вариант геномной ДНК, кодирующей СЕВР/β, который находится в хромосомном положении 1q44 в положении 247,416,156-247,449,108 (т.е. нуклеотиды 247,416,156-247,449,108 по номеру доступа в GenBank NC_000001.11) путем хромосомной транслокации или дупликации, и РНК, например, мРНК, полученной из них. «Природные варианты» также могут включать варианты, полученные в результате альтернативного сплайсинга мРНК СЕВР/β. Когда речь идет о конкретной полипептидной последовательности, например, этот термин также включает природные формы белка, которые поэтому могут подвергаться процессингу, например, путем ко- или

посттрансляционных модификаций, таких как расщепление сигнального пептида, протеолитическое расщепление, гликозилирование и т. д.

[0108] При определении степени «комплементарности» между ASO по настоящему изобретению (или их областями) и целевой областью нуклеиновой кислоты, которая кодирует *CEBP/β* млекопитающих (например, ген *CEBP/β*), например, описанный в данном документе, степень «комплементарности» (также «гомология» или «идентичность») выражается как процентная идентичность (или процентная гомология) между последовательностью ASO (или ее областью) и последовательностью целевой области (или обратной комплементарной цепи целевой области), которая наилучшим образом выравнивается с ней. Процент рассчитывается путем подсчета количества выровненных оснований, идентичных между двумя последовательностями, деления на общее количество смежных мономеров в ASO и умножения на 100. При таком сравнении, если существуют гэпы, предпочтительно, чтобы такие гэпы были просто несовпадениями, а не областями, где количество мономеров в пределах гэпы различается между ASO по настоящему изобретению и целевой областью.

[0109] Используемый в данном документе термин «комплементарная цепь» означает последовательность, комплементарную эталонной последовательности. Хорошо известно, что комплементарность является основным принципом репликации и транскрипции ДНК, поскольку это свойство является общим для двух последовательностей ДНК или РНК, так что, когда они выровнены антипараллельно друг другу, нуклеотидные основания в каждом положении в последовательностях будут комплементарны, подобно тому, как если бы вы посмотрели в зеркало и увидели обратное. Поэтому, например, комплементарная цепь последовательности 5'"ATGC"3' может быть записана как 3'"TACG"5' или 5'"GCAT"3'. Термины «обратная комплементарная цепь», «обратная комплементарность» и «обратная комплементарность», используемые в данном документе, взаимозаменяемы с терминами «комплементарная цепь», «комплементарная» и «комплементарность». В некоторых аспектах термин «комплементарная» относится к 100% совпадению или комплементарности (т.е. полной комплементарности) непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*. В некоторых аспектах термин «комплементарная» относится к по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% совпадений или комплементарности непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*.

[0110] Термины «соответствующий» и «соответствует» при ссылке на две отдельные нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут использоваться для описания областей последовательностей, которые соответствуют или похожи друг на друга на основе гомологии и/или функциональности, хотя нуклеотиды конкретных последовательностей могут быть пронумерованы по-разному. Например, разные изоформы транскрипта гена могут иметь сходные или консервативные части нуклеотидных последовательностей, нумерация которых может различаться в соответствующих изоформах на основе альтернативного сплайсинга и/или других модификаций. Кроме того, признано, что при характеристике нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности можно использовать различные системы нумерации (например, транскрипт гена и следует ли начинать нумерацию последовательности с иницирующего трансляцию кодона или включать 5'UTR). Кроме того, признано, что нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности различных вариантов гена или транскрипта гена могут различаться. Однако в данном контексте области вариантов, которые имеют гомологию и/или функциональность нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности, считаются «соответствующими» друг другу. Например, нуклеотидная последовательность транскрипта *CEBP/β*, соответствующая нуклеотидам X-Y в SEQ ID NO: 1 («эталонная последовательность»), относится к последовательности транскрипта *CEBP/β* (например, пре-мРНК или мРНК *CEBP/β*) который имеет последовательность, идентичную или аналогичную последовательности нуклеотидов X-Y в SEQ ID NO: 1, где X представляет собой начальный сайт, а Y представляет собой конечный сайт (как показано на Фиг. 1). Специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки X и Y в последовательности транскрипта *CEBP/β* путем сопоставления последовательности транскрипта *CEBP/β* с SEQ ID NO: 1.

[0111] Термины «соответствующий аналог нуклеотида» и «соответствующий нуклеотид» предназначены для обозначения того, что азотистое основание в аналоге нуклеотида и природный нуклеотид обладают одинаковой способностью к спариванию или гибридизации. Например, когда 2-дезоксирибозное звено нуклеотида связано с аденином, «соответствующий аналог нуклеотида» содержит пентозное звено (отличное от 2-дезоксирибозы), связанное с аденином.

[0112] Краткое описание химии ASO выглядит следующим образом: нуклеотиды бета-D-окси LNA обозначаются OхyB, где B обозначает нуклеотидное основание, такое как тимин (T), уридин (U), цитозин (C), 5-метилцитозин (MC), аденин (A) или гуанин (G), и, таким образом, включают OхyA, OхyT, OхyMC, OхyC и OхyG. Нуклеотиды ДНК обозначаются как DNAb, где строчная буква b обозначает нуклеотидное основание, такое

как тимин (Т), уридин (U), цитозин (С), 5-метилцитозин (Мс), аденин (А) или гуанин (G), и таким образом включают DNAa, DNAt, DNA и DNAg. Буква М перед С или с указывает на 5-метилцитозин. Буква «s» указывает на фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.

[0113] Термин «номер ASO» или «№ ASO» используемый в данном документе относится к уникальному номеру, присвоенному нуклеотидной последовательности, имеющей подробную химическую структуру компонентов, например, нуклеозидов (например, ДНК), аналогов нуклеозидов (например, бета-D-окси-LNA), нуклеотидных оснований (например, А, Т, G, С, U или МС) и структуру основной цепи (например, фосфоротиоат или фосфородиэфир). Например, ASO-CEBP/β-540 может относиться к CEBP/β-540 (SEQ ID NO: 194).

[0114] «Активность» обычно выражается как значение IC₅₀ или EC₅₀ в мкМ, нМ или пМ, если не указано иное. Активность также может быть выражена в процентах ингибирования. IC₅₀ представляет собой медианную ингибирующую концентрацию терапевтической молекулы. EC₅₀ представляет собой среднюю эффективную концентрацию терапевтической молекулы по отношению к носителю или контролю (например, солевому раствору). В функциональных анализах IC₅₀ представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая снижает биологический ответ, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка, на 50% от биологического ответа, достигаемого терапевтической молекулой. В функциональных анализах EC₅₀ представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая вызывает 50% биологического ответа, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка. IC₅₀ или EC₅₀ можно рассчитать любым количеством способов, известных в данной области техники.

[0115] Используемый в данном документе термин «ингибирование», например, экспрессии транскрипта гена *CEBP/β* и/или белка CEBP/β, относится к ASO, снижающему экспрессию транскрипта гена *CEBP/β* и/или белка CEBP/β в клетке или ткани. В некоторых аспектах термин «ингибирование» относится к полному ингибированию (100% ингибирование или неопределяемый уровень) транскрипта гена *CEBP/β* или белка CEBP/β. В других аспектах термин «ингибирование» относится к по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% ингибирования транскрипта гена *CEBP/β* и/или экспрессии белка CEBP/β в клетке или ткани.

[0116] Используемый в данном документе термин «внеклеточная везикула» или «ВВ» относится к везикуле клеточного происхождения, содержащей мембрану, которая

охватывает внутреннее пространство. Внеклеточные везикулы представляют собой все связанные с мембраной везикулы (*например*, экзосомы, нановезикулы), которые имеют меньший диаметр, чем клетки, из которых они получены. В некоторых аспектах внеклеточные везикулы имеют диаметр от 20 до 1000 нм и могут содержать различную макромолекулярную полезную нагрузку, которая может находиться во внутреннем пространстве (*т.е.* просвете), располагаться на внешней поверхности внеклеточной везикулы и/или охватывать мембрану. В некоторых аспектах полезная нагрузка может содержать нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, малые молекулы и/или их комбинации. В некоторых аспектах внеклеточный носитель содержит каркасный фрагмент. В качестве примера и не ограничиваясь этим внеклеточные везикулы включают апоптотические тельца, фрагменты клеток, везикулы, полученные из клеток прямым или косвенным воздействием (*например* путем серийной экструзии или обработки щелочными растворами), везикулярные органеллы и везикулы, продуцируемые живыми клетками (*например*, прямым отпочкованием плазматической мембраны или слиянием поздней эндосомы с плазматической мембраной). Внеклеточные везикулы могут быть получены из живого или мертвого организма, эксплантированных тканей или органов, прокариотических или эукариотических клеток и/или культивируемых клеток. В некоторых аспектах внеклеточные везикулы продуцируются клетками, которые экспрессируют один или несколько продуктов трансгена.

[0117] В контексте данного документа термин «экзосома» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от 20 до 300 нм (*например*, от 40 до 200 нм). Экзосомы содержат мембрану, которая окружает внутреннее пространство (*т.е.* просвет), и, в некоторых аспектах, могут быть получены из клетки (*например*, клетки-продуцента) путем прямого отпочкования цитоплазматической мембраны или путем слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных аспектах экзосома содержит каркасный фрагмент. Как описано ниже, экзосома может быть получена из клетки-продуцента и выделена из клетки-продуцента на основании ее размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению продуцируются клетками, которые экспрессируют один или более трансгенных продуктов.

[0118] В контексте данного документа термин «нановезикула» относится к внеклеточной везикуле с диаметром от 20 нм до 250 нм (*например*, от 30 до 150 нм) и образуется из клетки (*например*, клетки-продуцента) с помощью прямой или косвенной манипуляции, так что нановезикулы не будут продуцироваться клеткой без манипуляции. Соответствующие манипуляции с клеткой для получения нановезикул включают, но не

ограничиваясь ими, серийную экструзию, обработку щелочными растворами, обработку ультразвуком или их комбинации. В некоторых аспектах продуцирование нановезикул может приводить к разрушению клетки-продуцента. В некоторых аспектах популяция нановезикул, описанная в данном документе, по сути не содержит везикул, которые происходят из клеток путем прямого отпочкования от цитоплазматической мембраны или слияния поздней эндосомы с цитоплазматической мембраной. В определенных аспектах нановезикула содержит каркасный фрагмент. Нановезикулы, сразу после получения из клетки-продуцента, могут быть выделены из клетки-продуцента на основании их размера, плотности, биохимических параметров или их комбинации.

[0119] В контексте данного документа термин «сконструированные на поверхности ВВ, например, экзосомы» (например, сконструированные с помощью каркаса X ВВ, например, экзосомы), относится к ВВ, например, экзосоме, с мембраной или поверхностью ВВ, например, экзосомы, модифицированный по своему составу таким образом, что поверхность сконструированной ВВ, например, экзосомы, отличается от поверхности ВВ, например, экзосомы, до модификации или природной ВВ, например, экзосомы. Конструирование может происходить на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, или на мембране ВВ, *например*, экзосомы, так что поверхность ВВ, *например*, экзосомы, изменяется. Например, мембрана изменяется по составу белка, липида, малой молекулы, углевода и *т. д.* Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее или одновременно модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной с помощью генной инженерии. В некоторых аспектах сконструированная на поверхности ВВ, например, экзосома, содержит экзогенный белок (т.е., белок, который ВВ, например, экзосома, не экспрессирует естественным образом) или его фрагмент или вариант, который может экспонироваться на поверхности ВВ, например, экзосомы, или может точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, например, экзосомы. В других аспектах сконструированная на поверхности ВВ, например, экзосома обладает более высокой экспрессией (например, имеет большее количество) природного белка экзосомы (например, каркаса X) или его фрагмента, или варианта, которые могут быть экспонированы на поверхности ВВ, например, экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на поверхности ВВ, например, экзосомы.

[0120] В контексте данного документа термин «сконструированная в просвете экзосома» (например, экзосома, сконструированная с помощью каркаса Y) относится к ВВ,

например, экзосоме, с мембраной или просветом ВВ, например, экзосомы, модифицированной по своему составу таким образом, что просвет сконструированной ВВ, например, экзосомы, отличается от просвета ВВ, например, экзосомы, до модификации или природной ВВ, например, экзосомы. Конструирование может происходить непосредственно в просвете или в мембране ВВ, например, экзосомы, так что просвет ВВ, например, экзосомы изменяется. Например, мембрана модифицируется по своему белку, липида, малой молекулы, углевода и *т. д.*, так что просвет ВВ, например, экзосомы модифицируется. Состав может быть изменен химическим, физическим или биологическим способом или получен из клетки, ранее модифицированной химическим, физическим или биологическим способом. В частности, состав может быть изменен с помощью генной инженерии или получен из клетки, ранее модифицированной с помощью генной инженерии. В некоторых аспектах сконструированная в просвете экзосома содержит экзогенный белок (т.е. белок, который ВВ, например, экзосома не экспрессирует естественным образом) или его фрагмент или вариант, которые могут экспонироваться в просвете экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного на внутреннем слое ВВ, например, экзосомы. В других аспектах сконструированная в просвете ВВ, *например*, экзосома обладает более высокой экспрессией природного белка экзосомы (*например*, каркаса X или каркаса Y) или его фрагмента или варианта, которые могут быть экспонированы на поверхность экзосомы или могут быть точкой прикрепления (присоединения) для фрагмента, экспонированного в просвет экзосомы.

[0121] Термин «модифицированный» при использовании в контексте ВВ, например, экзосом, описанных в данном документе, относится к изменению или конструированию ВВ, например, экзосомы и/или ее клетки-производителя, так что модифицированная ВВ, например, экзосома, отличается от природной ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах модифицированная ВВ, *например*, описанная в данном документе экзосома, содержит мембрану, которая отличается по составу белка, липида, малой молекулы, углевода и *т. д.* по сравнению с мембраной встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы (*например*, мембрана обладает более высокой плотностью или имеет большее количество природных белков экзосом и/или мембрана содержит белки, которые в природе не встречаются в экзосомах (*например*, ASO). В некоторых аспектах такие модификации мембраны изменяют внешнюю поверхность ВВ, *например*, экзосомы (*например*, сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, описанные в данном документе). В определенных аспектах такие модификации мембраны изменяют просвет ВВ, *например*, экзосомы (*например*, сконструированные в просвете ВВ, *например*, экзосомы, описанные в данном

документе).

[0122] В контексте данного документа термин «каркасный фрагмент» относится к молекуле, которую можно использовать для прикрепления полезной нагрузки или любого другого представляющего интерес соединения (например, ASO) к ВВ, например, экзосоме либо на поверхности просвета, либо на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы. В определенных аспектах фрагмент каркаса содержит синтетическую молекулу. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит неполипептидный фрагмент. В других аспектах фрагмент каркаса содержит липид, углевод или белок, который в естественно присутствует в ВВ, *например*, экзосоме. В некоторых аспектах фрагмент каркаса содержит липид, углевод или белок, который в естественно не присутствует в ВВ, *например*, экзосоме. В определенных аспектах каркасный фрагмент представляет собой каркас X. В некоторых аспектах каркасный фрагмент представляет собой каркас Y. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент содержит как каркас X, так и каркас Y. Неограничивающие примеры других каркасных фрагментов, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают аминопептидазу N (CD13); неприлизин, также называемый мембранная металлоэндопептидаза (MME); член 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1); нейропилин-1 (NRP1); CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин (MFGE8), LAMP2, и LAMP2B.

[0123] Используемый в данном документе термин «каркас X» относится к белкам экзосомы, которые были недавно обнаружены на поверхности экзосом. *См., например*, патент США № 10195290, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Неограничивающие примеры каркасов X включают: отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 («белок PTGFRN»); базигин («белок BSG»); член 2 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF2»); член 3 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF3»); член 8 суперсемейства иммуноглобулинов («белок IGSF8»); интегрин бета-1 («белок ITGB1»); интегрин альфа-4 («белок ITGA4»); тяжелую цепь антигена клеточной поверхности 4F2 («белок SLC3A2»); класс белков-переносчиков АТФ («белок АТР1А1», «белок АТР1А2», «белок АТР1А3», «белок АТР1А4», «белок АТР1В3», «белок АТР2В1», «белок АТР2В2», «белок АТР2В3», «белок АТР2В») и их функциональный фрагмент. В некоторых аспектах каркас X может представлять собой цельный белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, например, наименьший фрагмент, способный прикреплять другой фрагмент на внешней поверхности или на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы). В некоторых аспектах каркас X может прикреплять фрагмент (например, ASO) на внешней поверхности или поверхности просвета экзосомы.

[0124] Используемый в данном документе термин «каркас Y» относится к белкам экзосом, которые недавно были идентифицированы в просвете экзосом. См., например, международную публикацию № WO/2019/099942, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры каркасных белков Y включают: миристоилированный, богатый аланином субстрат киназы С («белок MARCKS»); белок 1, подобный миристоилированному, богатому аланином субстрату киназы С («белок MARCKSL1»); и кислоторастворимый белок 1 головного мозга («белок BASP1»). В некоторых аспектах каркасный белок Y может представлять собой целый белок или его фрагмент (*например*, функциональный фрагмент, *например*, наименьший фрагмент, который способен прикреплять фрагмент к поверхности просвета экзосомы). В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент (*например*, ASO) к поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент (*например*, ASO) к поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы.

[0125] Используемый в данном документе термин «фрагмент» белка (*например*, терапевтического белка, каркаса X или каркаса Y) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче природной последовательности, с удалением на N- и/или C-конце или с удалением любой части белка по сравнению со природным белком. Используемый в данном документе термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка X сохраняет способность прикреплять фрагмент к поверхности просвета или на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Аналогичным образом, в определенных аспектах функциональный фрагмент каркасного белка Y сохраняет способность прикреплять фрагмент на поверхности просвета или внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Оценку того, является ли фрагмент функциональным фрагментом, можно выполнить любыми известными в данной области техники способами определения содержания белка ВВ, *например* экзосом, включая вестерн-блоты, анализ FACS и слияния фрагментов с аутофлуоресцентными белками, *например*, такими как GFP. В определенных аспектах функциональный фрагмент каркасного белка X сохраняет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100% способности, *например*, способности прикреплять фрагмент природного каркасного белка X. В некоторых аспектах функциональный фрагмент каркасного белка Y сохраняет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100% способности, *например*, способности прикреплять другую

молекулу природного каркасного белка Y.

[0126] В контексте данного документа термин «вариант» молекулы (*например*, функциональной молекулы, антигена, каркаса X и/или каркаса Y) относится к молекуле, которая имеет определенные структурные и функциональные идентичности с другой молекулой при сравнении с помощью способа, известного в данной области техники. Например, вариант белка может содержать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или реаранжировку в другом белке.

[0127] В некоторых аспектах вариант каркас X представляет собой вариант, имеющий по меньшей мере около 70% идентичности с полноразмерными зрелыми белками PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белками-переносчиками АТФ, или с фрагментом (*например*, функциональным фрагментом) белков PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 или белков-переносчиков АТФ. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов PTGFRN имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с PTGFRN в соответствии с SEQ ID NO: 301 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов BSG на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или на по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с BSG в соответствии с SEQ ID NO: 303 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов IGSF2 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с IGSF2 в соответствии с SEQ ID NO: 308 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов IGSF3 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с IGSF3 в соответствии с SEQ ID NO: 309 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов IGSF8 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 90%

меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР1А4 в соответствии с SEQ ID NO: 313 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов АТР1В3 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР1В3 в соответствии с SEQ ID NO: 314 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов АТР2В1 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР2В1 в соответствии с SEQ ID NO: 315 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов АТР2В2 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР2В2 в соответствии с SEQ ID NO: 316 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов АТР2В3 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР2В3 в соответствии с SEQ ID NO: 317 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов АТР2В4 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с АТР2В4 в соответствии с SEQ ID NO: 318 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента каркаса X, раскрытого в данном документе, сохраняет способность специфически нацеливаться на ВВ, *например*, экзосомы. В аспектах каркас X включает одну или более мутаций, например, консервативные аминокислотные замены.

[0128] В некоторых аспектах вариант каркаса Y содержит вариант, обладающий по

меньшей мере 70% идентичностью с MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагментом MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов MARCKS на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или на по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с MARCKS в соответствии с SEQ ID NO: 401 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов MARCKSL1 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с MARCKSL1 в соответствии с SEQ ID NO: 402 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов BASP1 имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с BASP1 в соответствии с SEQ ID NO: 403 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента каркасного белка Y сохраняет способность специфически нацеливаться на поверхность просвета ВВ, *например*, экзосом. В некоторых вариантах осуществления каркас Y имеет одну или более мутаций, *например*, консервативные аминокислотные замены.

[0129] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, при замене аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая

отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0130] Термин «процентная идентичность последовательности» или «процентная идентичность» между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в окне сравнения, с учетом добавлений или удалений (т. е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающим положением является любое положение, в котором как в целевой, так и в эталонной последовательности представлен идентичный нуклеотид или аминокислота. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогично, гэпы, представленные в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[0131] Процентное значение идентичности последовательностей рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно осуществить при помощи программного обеспечения, легко доступного как для применения в режиме онлайн, так и для загрузки на компьютер. Подходящие программы из системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательностей является *bl2seq*, часть пакета программ BLAST, доступного на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, *например*, *Needle*, *Stretcher*, *Water* или *Matcher*, являющиеся частью пакета биоинформатических программ EMBOSS и также доступные от Европейского института биоинформатики (EBI) на веб-сайте www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0132] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной или

полипептидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[0133] Специалист в данной области примет во внимание, что построение выравнивания последовательностей для расчета процентной идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. Выравнивание последовательностей можно получить из множественного выравнивания последовательностей. Одной подходящей программой для построения множественного выравнивания последовательностей является ClustalW2, доступная на веб-сайте www.clustal.org. Другой подходящей программой является MUSCLE, доступная на веб-сайте www.drive5.com/muscle/. Программы ClustalW2 и MUSCLE альтернативно доступны, *например*, от EBI.

[0134] Также следует принять во внимание, что выравнивание последовательностей можно построить путем интеграции данных о последовательностях с данными из гетерогенных источников, таких как данные о структуре (*например*, о кристаллографической структуре белка), данные о функции (*например*, о локализации мутаций) или данные филогенетики. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, *например*, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, может быть проведено автоматически или вручную.

[0135] Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих типах областей. В одном аспекте варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые вызывают молчащие замены, добавления или делеции, но которые не меняют свойства или активность кодируемого полипептида. В другом аспекте варианты нуклеотидов продуцируются молчащими заменами из-за вырожденности генетического кода. В других аспектах варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, удалены или добавлены в любой комбинации. Полинуклеотидные варианты могут быть созданы по множеству причин, *например* с целью оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (изменение кодонов

человеческой мРНК на другие, *например* на те, которые подходят для бактериального хозяина типа *E.coli*).

[0136] Встречающиеся в природе варианты называются «аллельными вариантами» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего определенный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут отличаться на уровне полинуклеотидов и/или полипептидов и включены в настоящее раскрытие. Альтернативно, не встречающиеся в природе варианты можно получить при помощи методик мутагенеза или прямого синтеза.

[0137] Используя известные методы белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК, могут быть созданы варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или более аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В работе Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме, сообщается о вариантах белков KGF, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Подобным образом, гамма-интерферон проявлял до десяти раз более высокую активность после удаления 8–10 аминокислотных остатков из карбоксиконца этого белка. (Публикация Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.)

[0138] Более того, имеется достаточно доказательств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, в работе Gayle и сотрудников (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме) проведен обширный мутационный анализ цитокина IL-1a человека. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 индивидуальных мутантов IL-1a, в которых в среднем выполняли 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. В каждой возможной аминокислотной позиции исследовали множество мутаций. Исследователи обнаружили, что «[бóльшая] часть молекулы может быть изменена с небольшим влиянием на что-либо из [связывания или биологической активности]». (См. Реферат). Фактически, только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей продуцировали белок, который значительно отличался по активности от белка дикого типа.

[0139] Как указано выше, варианты полипептидов *включают, например,* модифицированные полипептиды. Модификации *включают, например,* ацетилирование,

ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидрокселирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегелирование (публикация Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых аспектах каркас X и/или каркас Y модифицируются в любом удобном месте.

[0140] В данном документе термины «соединен с» или «конъюгирован с» используются взаимозаменяемо и относятся к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первым фрагментом и вторым фрагментом, например, каркасом X и ASO, соответственно, например, каркасным фрагментом, экспрессированным во внеклеточной везикуле или на ней, и ASO, например, каркасом X (например, белком PTGFRN), соответственно, на поверхности просвета или на внешней поверхности внеклеточной везикулы.

[0141] Термин «инкапсулированный» или другие грамматические формы этого термина (например, инкапсуляция или инкапсулирование) относятся к состоянию или процессу пребывания первого фрагмента (например, ASO) внутри второго фрагмента (например, ВВ, например, экзосомы) без химического или физического соединения двух групп. В некоторых аспектах термин «инкапсулированный» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «в просвете». Неограничивающие примеры инкапсулирования первого фрагмента (например, ASO) во второй фрагмент (например, ВВ, например, экзосомы) описаны в другом месте в данном документе.

[0142] В контексте данного документа термин «клетка-производитель» относится к клетке, используемой для создания ВВ, например, экзосомы. Клетка-производитель может представлять собой клетку, культивируемую *in vitro*, или клетку *in vivo*. Клетка-производитель включает, но не ограничивается ими, клетку, которая, как известно, эффективно генерирует ВВ, например, экзосомы, например, клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (CHO), мезенхимальные стволовые клетки (МСК), клетки фибробластов крайней плоти

человека ВJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1. В определенных аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, В-клеткой, тучной клеткой, макрофагом, нейтрофилом, клеткой Купфера-Бровича, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, используемые в настоящем изобретении, не несут антиген на молекуле МНС класса I или класса II, экспонированной на поверхности ВВ, *например*, экзосоме, но вместо этого могут нести антиген в просвете ВВ, *например*, экзосомы, или на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, путем присоединения к каркасу X и/или каркасу Y.

[0143] Используемые в данном документе термины «выделить», «выделенный» и «выделение» или «очищать», «очищенный» и «очищение», а также «извлеченный» и «извлекать» используются взаимозаменяемо и относятся к состоянию получения (например, множества известных или неизвестных количеств и/или концентраций) желательных ВВ, которые прошли один или более процессов очистки, например, селекцию или обогащение желаемого препарата ВВ. В некоторых аспектах выделение или очистка, используемые в настоящем документе, представляют собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) ВВ из образца, содержащего клетки-продуценты. В некоторых аспектах композиция выделенных ВВ не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других аспектах композиция выделенных ВВ имеет количество и/или концентрацию желаемых ВВ в приемлемом количестве и/или концентрации или выше приемлемого количества и/или концентрации. В других аспектах композиция выделенных ВВ обогащена по сравнению с исходным материалом (например, препаратами клеток-продуцентов), из которого получена композиция. Это обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых аспектах выделенные препараты ВВ по существу не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах препараты выделенных ВВ являются на 100% свободными, на 99% свободными, на 98% свободными, на 97% свободными, на 96% свободными, на 95% свободными, на 94% свободными, на 93% свободными, на 92% свободными, на 91% свободными или 90% свободными от каких-либо загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать

абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты. «По существу свободный от остаточных биологических продуктов» может также означать, что композиция ВВ не содержит обнаружимых клеток-продуцентов и что обнаруживаются только ВВ.

[0144] Используемый в данном документе термин «полезная нагрузка» относится к терапевтическому агенту, который действует на мишень (например, клетку-мишень), которая вступает в контакт с ВВ. Неограничивающие примеры полезной нагрузки, которая может быть включена во ВВ, например, экзосому, является ASO. Полезные нагрузки, которые могут быть введены во ВВ, например, экзосому, и/или клетку-продуцент, включают агенты, такие как нуклеотиды (например, нуклеотиды, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают транскрипцию), нуклеиновые кислоты (например, молекулы ДНК или мРНК, которые кодируют полипептид, такой как фермент, или молекулы РНК, которые выполняют регуляторную функцию, такие как микроРНК, дцРНК, днРНК и киРНК), аминокислоты (например, аминокислоты, содержащие определяемый фрагмент или токсин, или которые нарушают трансляцию), полипептиды (например, ферменты), липиды, углеводы и малые молекулы (например, низкомолекулярные лекарственные средства и токсины). В определенных аспектах полезная нагрузка содержит ASO. Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, независимо от того, является ли он природным или частично или полностью синтезированным, и его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагментов, который специфически связывает и распознает антиген. В контексте данного документа термин «антиген» относится к любому агенту, который при введении субъекту вызывает у него иммунный ответ (клеточный или гуморальный). При применении термина «антитело» он включает в себя цельные антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd, антитела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включают биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию.

[0145] Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются в

настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, в частности к людям, которым требуется проведение диагностики, лечения или терапии. Композиции и способы, описанные в данном документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых аспектах субъект представляет собой млекопитающее, а в других аспектах субъект представляет собой человека. Используемый в данном документе термин «субъект-млекопитающее» включает всех млекопитающих, в том числе людей, домашних животных (*например*, собак, кошек и т. п.), сельскохозяйственных животных (*например*, коров, овец, свиней, лошадей и т. п.) и лабораторных животных (*например*, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т. п.).

[0146] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Такая композиция может быть стерильной.

[0147] Используемый в данном документе термин «по существу свободный» означает, что образец, содержащий ВВ, *например*, экзосомы, содержит менее 10% макромолекул в процентных концентрациях масса/объем (мас./об.). Некоторые фракции могут содержать менее 0,001%, менее 0,01%, менее 0,05%, менее 0,1%, менее 0,2%, менее 0,3%, менее 0,4%, менее 0,5%, менее 0,6%, менее 0,7%, менее 0,8%, менее 0,9%, менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9% или менее 10% (мас./об.) макромолекул.

[0148] Используемый в данном документе термин «макромолекула» означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

[0149] В контексте данного документа термин «обычный экзосомный белок», означает белок, ранее известный как обогащенный в экзосомах, включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI-якорные белки, лактадгерин (MFGE8), LAMP2, и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ним.

[0150] Используемый в данном документе термин «введение» означает введение композиции, содержащей ВВ, *например*, экзосомы, описанные в данном документе, субъекту фармацевтически приемлемым путем. Путь введения могут быть внутривенным, *например*, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия. Дополнительные пути введения включают, *например*, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. ВВ, *например*, экзосомы, можно вводить как часть фармацевтической

композиции, содержащей по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

[0151] «Эффективное количество», например, ASO или внеклеточной везикулы, как описано в данном документе, представляет собой количество, достаточное для выполнения конкретно заявленной цели. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и стандартным способом по отношению к указанной цели.

[0152] «Лечить», «лечение» или «лечащий» в контексте данного документа относится, например, к снижению степени тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности течения болезни; улучшению или устранению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; обеспечению благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или патологического состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или патологического состояния или его симптомов. В одном аспекте «лечение» или «лечащий» включает индукцию гемопоза у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние связано с гемопозом или его недостаточностью. В определенных аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах лечение усиливает гемопоз у субъекта, имеющего злокачественное новообразование, при этом усиленный гемопоз включает усиление пролиферации и/или дифференцировки одной или более иммунных клеток у субъекта.

[0153] Термины «предотвращать» или «предотвращение» в контексте данного описания относятся к уменьшению или снижению частоты возникновения или серьезности конкретного исхода. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосому, содержащую ASO, описанную в данном документе, вводят субъекту для профилактики. В некоторых аспектах субъект подвержен риску развития злокачественного новообразования. В некоторых аспектах субъект подвержен риску развития гемопозитического расстройства.

II. Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO)

[0154] В настоящем изобретении используются антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) для применения при модулировании функции молекул нуклеиновых кислот, кодирующих *CEBP/β* млекопитающего, таких как нуклеиновая кислота *CEBP/β*, например, транскрипт *CEBP/β*, включая пре-мРНК *CEBP/β*, и мРНК *CEBP/β* или природные варианты таких молекул нуклеиновых кислот, кодирующие *CEBP/β* млекопитающего. Термин «ASO» в контексте настоящего изобретения относится к молекуле, образованной

ковалентной связью двух или более нуклеотидов (т. е. олигонуклеотида).

[0155] ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от около 10 до около 30, например, 10–20, 14–20, 16–20 или 15–25 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 20 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 18 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 19 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 17 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 16 нуклеотидов. В определенных аспектах длина ASO составляет 15 нуклеотидов. Термины «антисмысловой ASO», «антисмысловой олигонуклеотид» и «олигомер» в данном документе взаимозаменяемы с термином «ASO». ASO, применимые в настоящем изобретении, не встречаются в природе и не могут быть обнаружены в природе. В некоторых аспектах ASO химически модифицированы.

[0156] Ссылка на SEQ ID NO включает конкретную последовательность азотистых оснований, но не включает какой-либо дизайн или полную химическую структуру. Кроме того, ASO, приведенные на фигурах, демонстрируют репрезентативную конструкцию, но не ограничиваются конкретной конструкцией, приведенные на фигурах, если не указано иное. Например, когда пункт формулы (или это описание) относится к SEQ ID NO: 101, он включает только нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 101. Конструкция любого ASO, описанного в данном документе, может быть записана как SEQ ID NO: XX, где каждый из первого нуклеотида, второго нуклеотида, третьего нуклеотида, первого нуклеотида, второго нуклеотида и N-го нуклеотида с 5'-конца представляет собой модифицированный нуклеотид, например, LNA, и каждый из других нуклеотидов представляет собой немодифицированный нуклеотид (например, ДНК).

[0157] В различных аспектах ASO по настоящему изобретению не содержит РНК (единиц). В некоторых аспектах ASO содержит одну или более звеньев ДНК. В одном аспекте ASO по настоящему изобретению представляет собой линейную молекулу или синтезируется в виде линейной молекулы. В некоторых аспектах ASO является одноцепочечной молекулой и не включает короткие области, например, по меньшей мере 3, 4 или 5 смежных нуклеотидов, которые комплементарны эквивалентным областям внутри той же ASO (т.е. дуплексам), в этом отношении ASO не является (по существу) двуцепочечной. В некоторых аспектах ASO по существу не является двухцепочечным. В некоторых аспектах ASO не является кпРНК. В различных аспектах ASO по данному изобретению может полностью состоять из непрерывной нуклеотидной области. Таким образом, в некоторых аспектах ASO по существу не является самокомплементарными.

[0158] В других аспектах настоящее изобретение включает фрагменты ASO. Например, данное изобретение включает по меньшей мере один нуклеотид, по меньшей

мере два смежных нуклеотида, по меньшей мере три смежных нуклеотида, по меньшей мере четыре смежных нуклеотида, по меньшей мере пять смежных нуклеотидов, по меньшей мере шесть смежных нуклеотидов, по меньшей мере семь смежных нуклеотидов, по меньшей мере восемь смежных нуклеотидов или по меньшей мере девять смежных нуклеотидов ASO, описанных в данном документе. Фрагменты любой из описанных в данном документе последовательностей рассматриваются как часть изобретения.

[0159] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению включают фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (PMO) или конъюгированный с пептидом фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (PPMO).

II.A. Мишень

[0160] Соответственно, ASO по настоящему изобретению способен подавлять (например, снижать или устранять) экспрессию мРНК *CEBP/β* или белка *CEBP/β*. В этом отношении ASO по данному изобретению может способствовать дифференцировке макрофагов M2 и/или снижать дифференцировку макрофагов M1. В частности, настоящее изобретение относится к ASO, которые нацелены на одну или более областей *CEBP/β*-пре-мРНК (например, интронные области, экзонные области и/или области экзон-интронного соединения).

[0161] Если не указано иное, термин «*CEBP/β*», в контексте данного документа может относиться к *CEBP/β* одного или более видов (например, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0162] *CEBP/β* (*CEBP/β*) также известен как ССАТ/энхансер-связывающий белок бета. Синонимы *CEBP/β/CEBP/β* известны и включают С/ЕВР бета; •белок-активатор печени; LAP; обогащенный в печени ингибиторный белок; LIP; ядерный фактор NF-IL6; фактор транскрипции 5; TCF-5; *CEBPB*; *CEBPb*; *CEBPβ*; *CEBP/B*; и *TCF5*. Последовательность гена *CEBP/β* человека можно найти под общедоступным номером доступа в GenBank NC_000020.11 (50190583..50192690). Ген *CEBP/β* человека находится в хромосоме 20q13.13 в положении 50190583-50192690.

[0163] Последовательность транскрипта пре-мРНК *CEBP/β* человека (SEQ ID NO: 11) соответствует обратной комплементарной цепи остатков 50190583-50192690 хромосомы 20q13.13. Последовательность мРНК *CEBP/β* (номер доступа GenBank NM_001285878.1) представлена в SEQ ID NO: 13 (таблица 1), за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 13 показан как «u» в мРНК. Последовательность белка *CEBP/β* человека можно найти под общедоступными номерами доступа: P17676 (каноническая

последовательность, SEQ ID NO: 12), P17676-2 (SEQ ID NO: 14) и P17676-3 (SEQ ID NO: 15), каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0164] **Таблица 1.** Последовательности мРНК и белков СЕВР/β

<i>Последовательность мРНК СЕВР/β</i>
TCCCAATCCCGGGGCGGCCGGGCGGGGGTGGGCAGGGGGCGTGAGGCCGCCCT GCGTCCCGGGGGCCCCCGAAAACGCGCTCCGGGTGCCCGGTCCCTCCGCTGCGC CCTGCCGCGTCCTCCCGGGGGTCTCGGGCGGCCGCGGCCGTGTCTTCGCGTCC CGGCGGCGCGGGAGGGGCCGGCGTGACGCAGCGGTTGCTACGGGCCGCCCT TATAAATAACCGGGCTCAGGAGAACTTTAGCGAGTCAGAGCCGCGCACGGGAC TGGGAAGGGGACCCACCCGAGGGTCCAGCCACCAGCCCCCTACTAATAGCGGC CACCCCGGCAGCGGCGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCGACGCGGCGACAGCTCAGAG CAGGGAGGCCGCGCCACCTGCGGGCCGGCCGGAGCGGGCAGCCCCAGGCCCCCT CCCCGGGCACCCGCGTTCATGCAACGCCTGGTGGCCTGGGACCCAGCATGTCTCC CCCTGCCGCCGCGCCGCTGCCTTTAAATCCATGGAAGTGGCCAACTTCTACTA CGAGGCGGACTGCTTGGCTGCTGCGTACGGCGGCAAGGCGGCCCGCGGGCGCC CCCCGCGGCCAGACCCGGGCCGCGCCCCCGCCGGCGAGCTGGGCAGCATCGG CGACCACGAGCGCGCCATCGACTTCAGCCCGTACCTGGAGCCGCTGGGCGCGCC GCAGGCCCGGCGCCCGCCACGGCCACGGACACCTTCGAGGCGGCTCCGCCCGC GCCCGCCCCGCGCCCGCCTCCTCCGGGCAGCACCACGACTTCCTCTCCGACCTC TTCTCCGACGACTACGGGGGCAAGAACTGCAAGAAGCCGGCCGAGTACGGCTAC GTGAGCCTGGGGCGCCTGGGGGCCGCAAGGGCGCGCTGCACCCCGGCTGCTTC GCGCCCCTGCACCCACCGCCCCGCGCCCGCCGCCCGCCGAGCTCAAGGCG GAGCCGGGCTTCGAGCCCGCGGACTGCAAGCGGAAGGAGGAGGCCGGGGCGCC GGGCGGCGGCGCAGGCATGGCGGCGGGCTTCCCGTACGCGCTGCGCGCTTACCT CGGCTACCAGGCGGTGCCGAGCGGCAGCAGCGGGAGCCTCTCCACGTCTCTCTC GTCCAGCCCGCCCGGCACGCCGAGCCCCGCTGACGCCAAGGCGCCCCCGACCGC CTGCTACGCGGGGGCCGCGCCGGCGCCCTCGCAGGTCAAGAGCAAGGCCAAGAA GACCGTGGACAAGCACAGCGACGAGTACAAGATCCGGCGCGAGCGCAACAACAT CGCCGTGCGCAAGAGCCGCGACAAGGCCAAGATGCGCAACCTGGAGACGCAGCA CAAGGTCTGGAGCTCACGGCCGAGAACGAGCGGCTGCAGAAGAAGGTGGAGCA GCTGTGCGCGAGCTCAGCACCTGCGGAACTTGTTCAAGCAGCTGCCCAGCCC CTGCTCGCCTCCTCCGGCCACTGCTAGCGCGGGCCCCCGCGCGCGTCCCCCTGCCG GCCGGGGCTGAGACTCCGGGGAGCGCCCGCGCCCGCGCCCTCGCCCCGCCCCC GGCGGCGCCGGCAAACTTTGGCACTGGGGCACTTGGCAGCGCGGGGAGCCCGT CGGTAATTTTAATATTTTATTATATATATATATCTATATTTTTGTCCAAACCAACC

GCACATGCAGATGGGGCTCCCGCCCGTGGTGTATTAAAGAAGAAACGTCTATG
TGTACAGATGAATGATAAACTCTCTGCTTCTCCCTCTGCCCTCTCCAGGCGCCGG
CGGGCGGGCCGGTTTCGAAGTTGATGCAATCGGTTTAAACATGGCTGAACGCGTG
TGTACACGGGACTGACGCAACCCACGTGTAACGTGTCAGCCGGGCCCTGAGTAATC
GCTTAAAGATGTTCCCTACGGGCTTGTGCTGTTGATGTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
TGGTCTTTTTTTGTATTATAAAAAATAATCTATTTCTATGAGAAAAGAGGCGTCTG
TATATTTTGGGAATCTTTTCCGTTTCAAGCATTAAGAACAACCTTTTAATAAACTTTT
TTTTGAGAATGGTTACAAAGCCTTTTGGGGGCAGTAAAAAAA (SEQ ID NO: 11)

Последовательность белка СЕВР/β

MQRLVAWDPACLPLPPPPAFKSMEVANFYFEADCLAAAYGGKAAPAAPPAARPGP
RPPAGELGSIGDHERAIDFSPYLEPLGAPQAPAPATATDTFEAAPPAPAPAPASSGQHN
DFLSDFLSDDYGGKNCKKPAEYGYVSLGRLGAAKGALHPGCFAPLHPPPPPPPPAE
LKAEPGFEPADCKRKEEAGAPGGGAGMAAGFPYALRAYLGYQAVPSGSSGSLSTSSS
SSPPGTPSPADAKAPPTACYAGAAPAPSQVKS KAKKTVDKHSDEYKIRRERNNIAVR
KSRDKAKMRNLETQHKVLELTAENERLQKKVEQLSRELSTLRNLFKQLPEPLASSG
HC (SEQ ID NO: 12)

[0165] Известны природные варианты продукта гена *CEBP/β* человека. Например, природные варианты белка *CEBP/β* человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: A241P, A253G, G195S и любой их комбинации. Дополнительные варианты человеческого белка *CEBP/β*, полученные в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области техники. Изоформа 2 *CEBP/β* (идентификатор: P17676-2 в UniProt) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 13) следующим: делеция остатков 1-23 относительно SEQ ID NO: 13. Последовательность изоформы 3 *CEBP/β* (идентификатор: P17676-3) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 13) следующим образом: делеция остатков 1-198 относительно SEQ ID NO: 13. Таким образом, ASO по настоящему изобретению могут быть разработаны для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка.

[0166] Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты ASO является пре-мРНК *CEBP/β*. SEQ ID NO: 11 представляет собой геномную последовательность *CEBP/β* человека (т.е. обратную комплементарную цепь нуклеотидов 50190583-50192690 хромосомы 20q13.13). SEQ ID NO: 11 идентична последовательности пре-мРНК *CEBP/β*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 11 показан как «u» в пре-мРНК. В некоторых аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон

нуклеиновых кислот, кодирующих белок СЕВР/β, или их природные варианты, и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, например, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзона нуклеиновых кислот, кодирующих белок СЕВР/β, или их природные варианты, и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, например, пре-мРНК. В еще других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит экзон-интронного соединения нуклеиновых кислот, кодирующих белок СЕВР/β, или их природные варианты, и нуклеиновые кислоты РНК, полученные из них, например, пре-мРНК. В некоторых аспектах, например, при использовании в исследованиях или диагностике «целевая нуклеиновая кислота» может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученный из указанных выше целевых нуклеиновых кислот ДНК или РНК. Последовательность белка СЕВР/β человека, кодируемая пре-мРНК *CEBP/β*, показана как SEQ ID NO: 13. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит нетранслируемую область нуклеиновых кислот, кодирующих белок СЕВР/β, или их природные варианты, например, 5'-UTR, 3'-UTR или и то, и другое.

[0167] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению гибридизуется с областью в интронах транскрипта *CEBP/β*, например, SEQ ID NO: 11. В определенных аспектах ASO по данному изобретению гибридизуется с областью в экзонах транскрипта *CEBP/β*, например, SEQ ID NO: 11. В других аспектах ASO по данному изобретению гибридизуется с областью в пределах экзон-интронного соединения транскрипта *CEBP/β*, например, SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах ASO по данному изобретению гибридизуется с областью в транскрипте *CEBP/β* (например, интрон, экзон или экзон-интронное соединение), например, SEQ ID NO: 11, где ASO имеет конструкцию в соответствии с формулой: 5' А-В-С 3', как описано в данном документе в другом месте.

[0168] В некоторых аспектах ASO нацелен на мРНК, кодирующую конкретную изоформу белка СЕВР/β (например, изоформу 1). В некоторых аспектах ASO нацелен на все изоформы белка СЕВР/β. В других аспектах ASO нацелен на две изоформы (например, изоформу 1 и изоформу 2, изоформу 1 и изоформу 3 или изоформу 2 и изоформу 3) белка СЕВР/β.

[0169] В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность (например, длиной от 10 до 30 нуклеотидов, например, длиной 20 нуклеотидов), которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*, например, области, соответствующей SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или участком в последовательности транскрипта *CEBP/β* («целевая область»), где последовательность

нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 1–600 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотидам 100–600 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотидам 200–600 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотидам 300–600 SEQ ID NO: 13; (v) 400–600 SEQ ID NO: 13, (vi) нуклеотидам 500–1000 SEQ ID NO: 13; (vii) нуклеотидам 900–1200 SEQ ID NO: 13; (viii) нуклеотидам 1000–1300 SEQ ID NO: 13; (ix) нуклеотидам 1300–1500 SEQ ID NO: 13, и где, необязательно, ASO имеет одну из конструкций, описанных в данном документе, или химическую структуру, приведенную в другом месте данного документа.

[0170] В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в последовательности транскрипта *CEBP/β* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 439–699 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотиды 544–778 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 715–750 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 886–1126 SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотиды 949–2118 SEQ ID NO: 13; (vi) нуклеотиды 1153–1407 SEQ ID NO: 13, и где, необязательно, ASO имеет одну из конструкций, описанных в данном документе, или химическую структуру, приведенную в другом месте данного документа.

[0171] В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в последовательности транскрипта *CEBP/β* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 489–649 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотиды 594–728 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 765–700 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 936–1076 SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотиды 999–2068 SEQ ID NO: 13; (vi) нуклеотиды 1203–1357 SEQ ID NO: 13, и где, необязательно, ASO имеет одну из конструкций, описанных в данном документе, или химическую структуру, приведенную в другом месте данного документа.

[0172] В некоторых аспектах ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в последовательности транскрипта *CEBP/β* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 1355–1487 SEQ ID NO: 13 (vi) нуклеотиды 529–609 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 634–688 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 805–700 SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотиды 976–1036 SEQ ID NO: 13; (vi) нуклеотиды 1039–2028 SEQ ID NO: 13 ;(vii) 1243–1317 SEQ ID NO: 13; или (viii) нуклеотиды 1395–1447 SEQ ID NO: 13, и где, необязательно, ASO имеет одну из конструкций, описанных в данном документе, или химическую структуру, приведенную в другом месте данного документа.

[0173] В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 540–554 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-540; SEQ ID NO: 194). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 565–579 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-565; SEQ ID NO: 195). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 569–583 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-569; SEQ ID NO: 196). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 648–662 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-648; SEQ ID NO: 197). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 816–830 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-816; SEQ ID NO: 198). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 817–831 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-817; SEQ ID NO: 199). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 818–832 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-818; SEQ ID NO: 200). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 819–833 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-819; SEQ ID NO: 201). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 820–834 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-820; SEQ ID NO: 202). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 851–865 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-851; SEQ ID NO: 203). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 853–867 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-853; SEQ ID NO: 204). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 856–870 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-856; SEQ ID NO: 205). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 858–872 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-858; SEQ ID NO: 206). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 987–1001 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-987; SEQ ID NO: 207). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1056–1070 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1056; SEQ ID NO: 208). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1064–1078 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1064; SEQ ID NO: 209). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1065–1079 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1065; SEQ ID NO: 210). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1066–1080 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1066; SEQ ID NO: 211). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1071–1085 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1071; SEQ ID NO: 212). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1270–1284 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1270; SEQ ID NO: 213). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1273–1287 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1273; SEQ ID NO: 214). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1274–1288 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1274; SEQ ID NO: 215). В

некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1405–1419 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1405; SEQ ID NO: 216). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1407–1421 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1407; SEQ ID NO: 217). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 539–554 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-539; SEQ ID NO: 218). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 540–555 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-540; SEQ ID NO: 219). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 563–578 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-563; SEQ ID NO: 220). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 564–579 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-564; SEQ ID NO: 221). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 565–580 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-565; SEQ ID NO: 222). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 568–583 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-568; SEQ ID NO: 223). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 644–659 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-644; SEQ ID NO: 224). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 645–660 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-645; SEQ ID NO: 225). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 648–663 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-648; SEQ ID NO: 226). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 819–834 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-819; SEQ ID NO: 227). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 855–870 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-855; SEQ ID NO: 228). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 860–875 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-860; SEQ ID NO: 229). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 986–1001 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-986; SEQ ID NO: 230). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 987–1002 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-987; SEQ ID NO: 231). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 996–1011 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-996; SEQ ID NO: 232). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1049–1064 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1049; SEQ ID NO: 233). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1050–1065 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1050; SEQ ID NO: 234). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1064–1079 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1064; SEQ ID NO: 235). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1065–1080 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1065; SEQ ID NO: 236). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1066–1081 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1066; SEQ ID NO: 237). В некоторых аспектах

целевая область соответствует нуклеотидам 1083–1098 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1083; SEQ ID NO: 238). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1088–1103 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1088; SEQ ID NO: 239). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1253–1268 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1253; SEQ ID NO: 240). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1269–1284 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1269; SEQ ID NO: 241). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1272–1287 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1272; SEQ ID NO: 242). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1274–1289 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1274; SEQ ID NO: 243). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 539–555 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-539; SEQ ID NO: 244). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 564–580 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-564; SEQ ID NO: 245). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 565–581 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-565; SEQ ID NO: 246). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 567–583 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-567; SEQ ID NO: 247). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 647–663 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-647; SEQ ID NO: 248). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 648–664 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-648; SEQ ID NO: 249). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 815–831 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-815; SEQ ID NO: 250). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 818–834 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-818; SEQ ID NO: 251). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 820–836 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-820; SEQ ID NO: 252). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 854–870 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-854; SEQ ID NO: 253). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 855–871 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-855; SEQ ID NO: 254). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 859–875 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-859; SEQ ID NO: 255). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1050–1066 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1050; SEQ ID NO: 256). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1053–1069 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1053; SEQ ID NO: 257). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1062–1078 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1062; SEQ ID NO: 258). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1063–1079 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1063; SEQ ID NO: 259). В некоторых аспектах целевая область

целевая область соответствует нуклеотидам 1071–1090 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1071; SEQ ID NO: 282). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1262–1281 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1262; SEQ ID NO: 283). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1274–1293 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1274; SEQ ID NO: 284). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1275–1294 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1275; SEQ ID NO: 285). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 644–663 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-644; SEQ ID NO: 286). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 647–666 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-647; SEQ ID NO: 287). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 851–870 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-851; SEQ ID NO: 288). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1266–1285 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1266; SEQ ID NO: 289). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1268–1287 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1268; SEQ ID NO: 290). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1270–1289 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1270; SEQ ID NO: 291). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 646–665 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-646; SEQ ID NO: 292). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1060–1079 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1060; SEQ ID NO: 293). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1263–1282 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1263; SEQ ID NO: 294). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1269–1288 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1269; SEQ ID NO: 295). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1271–1290 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1271; SEQ ID NO: 296).

[0174] В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 540–554 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-540; SEQ ID NO: 194) ± 10 , ± 20 , ± 30 , ± 40 , ± 50 , ± 60 , ± 70 , ± 80 или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 565–579 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-565; SEQ ID NO: 195) ± 10 , ± 20 , ± 30 , ± 40 , ± 50 , ± 60 , ± 70 , ± 80 или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 569–583 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-569; SEQ ID NO: 196) ± 10 , ± 20 , ± 30 , ± 40 , ± 50 , ± 60 , ± 70 , ± 80 или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 648–662 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-648; SEQ ID NO: 197) ± 10 , ± 20 , ± 30 , ± 40 , ± 50 , ± 60 , ± 70 , ± 80 или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область

ID NO: 291) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 646–665 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-646; SEQ ID NO: 292) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1060–1079 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1060; SEQ ID NO: 293) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1263–1282 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1263; SEQ ID NO: 294) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1269–1288 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1269; SEQ ID NO: 295) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1271–1290 SEQ ID NO: 13 (например, ASO-CEBPb-1271; SEQ ID NO: 296) $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$ или ± 90 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце.

[0175] В некоторых аспектах ASO не представляет собой TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO: 90). В некоторых аспектах целевая область содержит. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–518 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–517 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–516 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–515 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–514 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–513

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 515–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 516–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 517–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 518–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 519–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 520–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 521–

2113 SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 522–

2113 SEQ ID NO: 13.

[0177] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению гибридизуется с несколькими целевыми областями в транскрипте *CEBP/β* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно). В некоторых аспектах ASO гибридизуется с двумя разными целевыми областями в транскрипте *CEBP/β*. В некоторых аспектах ASO гибридизуется с тремя различными целевыми областями в транскрипте *CEBP/β*. Последовательности иллюстративных ASO, которые гибридизуются с несколькими целевыми областями, и сайты начала/конца различных целевых областей представлены на Фиг. 1. В некоторых аспектах ASO, которые гибридизуются с несколькими областями транскрипта *CEBP/β* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно), являются более эффективными (например, имеют

более низкую EC50) в снижении экспрессии *CEBP/β* по сравнению с ASO, которые гибридизуются с одной областью в транскрипте *CEBP/β* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно).

[0178] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению способна гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (например, транскриптом *CEBP/β*) в физиологических условиях, то есть в условиях *in vivo*. В некоторых аспектах ASO по данному изобретению способна гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (например, транскриптом *CEBP/β*) *in vitro*. В некоторых аспектах ASO по данному изобретению способна гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (например, транскриптом *CEBP/β*) *in vitro* в жестких условиях. Жесткие условия для гибридизации *in vitro* зависят, среди прочего, от поглощения продуктивными клетками, доступности РНК, температуры, свободной энергии ассоциации, концентрации соли и времени (см., например, Stanley T Crooke, Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Edition, CRC Press (2007)). Как правило, жесткие условия от высокой до умеренной используются для гибридизации *in vitro*, чтобы обеспечить возможность гибридизации между по существу сходными нуклеиновыми кислотами, но не между разнородными нуклеиновыми кислотами. Пример жестких условий гибридизации включает гибридизацию в 5X цитратно-солевой буферный раствор (SSC) (0,75 М хлорида натрия/0,075 М цитрата натрия) в течение 1 часа при 40°C с последующей промывкой образца 10 раз в 1X SSC при 40°C и 5 раз в буфере 1X SSC при комнатной температуре. Условия гибридизации *in vivo* включают внутриклеточные условия (например, физиологический pH и внутриклеточные ионные состояния), которые регулируют гибридизацию антисмысловых олигонуклеотидов с целевыми последовательностями. Условия *in vivo* можно имитировать *in vitro* с помощью условий относительно низкой жесткости. Например, гибридизацию можно проводить *in vitro* в 2X SSC (0,3 М хлорида натрия/0,03 М цитрата натрия), 0,1% SDS при 37°C. Промывочный раствор, содержащий 4X SSC, 0,1% SDS, можно использовать при 37°C с окончательной промывкой в 1X SSC при 45°C.

[0179] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению способна нацеливаться на транскрипт *CEBP/β* одного или более видов (например, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота, и медведей). В некоторых аспектах ASO, описанный в данном документе, способен нацеливаться на транскрипт *CEBP/β* как человека, так и грызунов (например, мышей или крыс). Соответственно, в некоторых аспектах ASO способна подавлять (например, снижать или устранять) экспрессию мРНК или белка *CEBP/β* как у людей, так и у грызунов (например, мышей или крыс). В некоторых аспектах любая ASO,

описанная в данном документе, является частью конъюгата, содержащего ASO, ковалентно связанного по меньшей мере с одним нуклеотидом или неполинуклеотидом.

[0180] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к конъюгату, содержащему ASO, описанный в данном документе. В определенных аспектах конъюгат содержит ASO, ковалентно присоединенный по меньшей мере к одному нуклеотиду. В определенных аспектах конъюгат содержит ASO, ковалентно присоединенный по меньшей мере к неполинуклеотидному фрагменту. В некоторых аспектах нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент содержит белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

II.B. Последовательности ASO

[0181] ASO по настоящему изобретению содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая соответствует комплементарной цепи области транскрипта *CEBP/β*, например, нуклеотидную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

[0182] В некоторых аспектах в изобретении предложена ASO от 10 до 30, например, 10–15 нуклеотидов, 10–20 нуклеотидов, 10–25 нуклеотидов в длину или около 20 нуклеотидов в длину, где непрерывная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности к области комплементарной цепи транскрипта *CEBP/β*, такой как SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13, или их природный вариант. Так, например, ASO гибридизуется с одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13, или ее часть.

[0183] ASO может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную (совершенно комплементарную) эквивалентной области нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок *CEBP/β* млекопитающих (например, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13). ASO может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную (совершенно комплементарную) последовательности нуклеиновой кислоты, или области в последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13, где X и Y являются начальным и конечным сайтами, соответственно, как показано на Фиг. 1B.

[0184] ASO может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную (совершенно комплементарную) эквивалентной области

мРНК, которая кодирует белок СЕВР/В млекопитающих (например, SEQ ID NO: 13). ASO может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную (совершенно комплементарную) последовательности мРНК, или области в последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y SEQ ID NO: 13, где X и Y представляют собой начальный сайт, а конечный сайт, соответственно.

[0185] В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность ASO по данному изобретению или непрерывная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 194-296 (т.е. последовательностей на Фиг. 1B), например, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96% идентичности последовательности, по меньшей мере около 97% идентичности последовательности, по меньшей мере около 98% идентичности последовательности, по меньшей мере около 99% идентичности последовательности, например, около 100% идентичности последовательности (гомологии). В некоторых аспектах ASO имеет конструкцию, описанную в другом месте данного документа, или химическую структуру, приведенную в другом месте данного документа (например, на Фиг. 1B).

[0186] В некоторых аспектах ASO (или ее непрерывная нуклеотидная часть) выбрана или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194-296, или ее области, состоящей по меньшей мере из 10 последовательных нуклеотидов, где ASO (или его непрерывная нуклеотидная часть) может необязательно содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом *СЕВР/В*.

[0187] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194 (например, ASO-СЕВРb-540), SEQ ID NO: 195 (например, ASO-СЕВРb-565), SEQ ID NO: 196 (например, ASO-СЕВРb-569), SEQ ID NO: 197 (например, ASO-СЕВРb-648), SEQ ID NO: 198 (например, ASO-СЕВРb-816), SEQ ID NO: 199 (например, ASO-СЕВРb-817), SEQ ID NO: 200 (например, ASO-СЕВРb-818), SEQ ID NO: 201 (например, ASO-СЕВРb-819), SEQ ID NO: 202 (например, ASO-СЕВРb-820), SEQ ID NO: 203 (например, ASO-СЕВРb-851), SEQ ID NO: 204 (например, ASO-СЕВРb-853), SEQ ID NO: 205 (например, ASO-СЕВРb-856), SEQ ID NO: 206 (например, ASO-СЕВРb-858), SEQ ID NO: 207 (например, ASO-СЕВРb-987), SEQ ID NO: 208 (например, ASO-СЕВРb-1056), SEQ ID NO: 209 (например, ASO-СЕВРb-1064), SEQ ID NO: 210 (например, ASO-СЕВРb-1065), SEQ ID NO: 211 (например, ASO-СЕВРb-1066), SEQ ID NO:

212 (например, ASO-CEBPb-1071), SEQ ID NO: 213 (например, ASO-CEBPb-1270), SEQ ID NO: 214 (например, ASO-CEBPb-1273), SEQ ID NO: 215 (например, ASO-CEBPb-1274), SEQ ID NO: 216 (например, ASO-CEBPb-1405), SEQ ID NO: 217 (например, ASO-CEBPb-1407), SEQ ID NO: 218 (например, ASO-CEBPb-539), SEQ ID NO: 219 (например, ASO-CEBPb-540), SEQ ID NO: 220 (например, ASO-CEBPb-563), SEQ ID NO: 221 (например, ASO-CEBPb-564), SEQ ID NO: 222 (например, ASO-CEBPb-565), SEQ ID NO: 223 (например, ASO-CEBPb-568), SEQ ID NO: 224 (например, ASO-CEBPb-644), SEQ ID NO: 225 (например, ASO-CEBPb-645), SEQ ID NO: 226 (например, ASO-CEBPb-648), SEQ ID NO: 227 (например, ASO-CEBPb-819), SEQ ID NO: 228 (например, ASO-CEBPb-855), SEQ ID NO: 229 (например, ASO-CEBPb-860), SEQ ID NO: 230 (например, ASO-CEBPb-986), SEQ ID NO: 231 (например, ASO-CEBPb-987), SEQ ID NO: 232 (например, ASO-CEBPb-996), SEQ ID NO: 233 (например, ASO-CEBPb-1049), SEQ ID NO: 234 (например, ASO-CEBPb-1050), SEQ ID NO: 235 (например, ASO-CEBPb-1064), SEQ ID NO: 236 (например, ASO-CEBPb-1065), SEQ ID NO: 237 (например, ASO-CEBPb-1066), SEQ ID NO: 238 (например, ASO-CEBPb-1083), SEQ ID NO: 239 (например, ASO-CEBPb-1088), SEQ ID NO: 240 (например, ASO-CEBPb-1253), SEQ ID NO: 241 (например, ASO-CEBPb-1269), SEQ ID NO: 242 (например, ASO-CEBPb-1272), SEQ ID NO: 243 (например, ASO-CEBPb-1274), SEQ ID NO: 244 (например, ASO-CEBPb-539), SEQ ID NO: 245 (например, ASO-CEBPb-564), SEQ ID NO: 246 (например, ASO-CEBPb-565), SEQ ID NO: 247 (например, ASO-CEBPb-567), SEQ ID NO: 248 (например, ASO-CEBPb-647), SEQ ID NO: 249 (например, ASO-CEBPb-648), SEQ ID NO: 250 (например, ASO-CEBPb-815), SEQ ID NO: 251 (например, ASO-CEBPb-818), SEQ ID NO: 252 (например, ASO-CEBPb-820), SEQ ID NO: 253 (например, ASO-CEBPb-854), SEQ ID NO: 254 (например, ASO-CEBPb-855), SEQ ID NO: 255 (например, ASO-CEBPb-859), SEQ ID NO: 256 (например, ASO-CEBPb-1050), SEQ ID NO: 257 (например, ASO-CEBPb-1053), SEQ ID NO: 258 (например, ASO-CEBPb-1062), SEQ ID NO: 259 (например, ASO-CEBPb-1063), SEQ ID NO: 260 (например, ASO-CEBPb-1064), SEQ ID NO: 261 (например, ASO-CEBPb-1065), SEQ ID NO: 262 (например, ASO-CEBPb-1265), SEQ ID NO: 263 (например, ASO-CEBPb-1270), SEQ ID NO: 264 (например, ASO-CEBPb-1271), SEQ ID NO: 265 (например, ASO-CEBPb-1272), SEQ ID NO: 266 (например, ASO-CEBPb-1274), SEQ ID NO: 267 (например, ASO-CEBPb-1277), SEQ ID NO: 268 (например, ASO-CEBPb-564), SEQ ID NO: 269 (например, ASO-CEBPb-565), SEQ ID NO: 270 (например, ASO-CEBPb-818), SEQ ID NO: 271 (например, ASO-CEBPb-1061), SEQ ID NO: 272 (например, ASO-CEBPb-1062), SEQ ID NO: 273 (например, ASO-CEBPb-1064), SEQ ID NO: 274 (например, ASO-CEBPb-1267), SEQ ID NO: 275 (например, ASO-CEBPb-1272), SEQ ID NO: 276 (например, ASO-CEBPb-645), SEQ ID NO: 277 (например, ASO-

СЕВРb-848), SEQ ID NO: 278 (например, ASO-СЕВРb-849), SEQ ID NO: 279 (например, ASO-СЕВРb-850), SEQ ID NO: 280 (например, ASO-СЕВРb-1063), SEQ ID NO: 281 (например, ASO-СЕВРb-1070), SEQ ID NO: 282 (например, ASO-СЕВРb-1071), SEQ ID NO: 283 (например, ASO-СЕВРb-1262), SEQ ID NO: 284 (например, ASO-СЕВРb-1274), SEQ ID NO: 285 (например, ASO-СЕВРb-1275), SEQ ID NO: 286 (например, ASO-СЕВРb-644), SEQ ID NO: 287 (например, ASO-СЕВРb-647), SEQ ID NO: 288 (например, ASO-СЕВРb-851), SEQ ID NO: 289 (например, ASO-СЕВРb-1266), SEQ ID NO: 290 (например, ASO-СЕВРb-1268), SEQ ID NO: 291 (например, ASO-СЕВРb-1270), SEQ ID NO: 292 (например, ASO-СЕВРb-646), SEQ ID NO: 293 (например, ASO-СЕВРb-1060), SEQ ID NO: 294 (например, ASO-СЕВРb-1263), SEQ ID NO: 295 (например, ASO-СЕВРb-1269), и SEQ ID NO: 296 (например, ASO-СЕВРb-1271).

[0188] В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 194 (например, ASO-СЕВРb-540). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 195 (например, ASO-СЕВРb-565). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 196 (например, ASO-СЕВРb-569). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 197 (например, ASO-СЕВРb-648). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 198 (например, ASO-СЕВРb-816). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 199 (например, ASO-СЕВРb-817). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 200 (например, ASO-СЕВРb-818). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 201 (например, ASO-СЕВРb-819). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 202 (например, ASO-СЕВРb-820). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 203 (например, ASO-СЕВРb-851). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 204 (например, ASO-СЕВРb-853). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 205 (например, ASO-СЕВРb-856). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 206 (например, ASO-СЕВРb-858). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 207 (например, ASO-СЕВРb-987). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 208 (например, ASO-СЕВРb-1056). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 209 (например, ASO-СЕВРb-1064). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 210 (например, ASO-СЕВРb-1065). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 211

указанную в SEQ ID NO: 290 (например, ASO-CEBPb-1268). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 291 (например, ASO-CEBPb-1270). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 292 (например, ASO-CEBPb-646). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 293 (например, ASO-CEBPb-1060). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 294 (например, ASO-CEBPb-1263). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 295 (например, ASO-CEBPb-1269). В некоторых аспектах ASO содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 296 (например, ASO-CEBPb-1271).

[0189] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению связываются с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (например, транскриптом *CEBP/B*) и способны ингибировать или снижать экспрессию транскрипта *CEBP/B* по меньшей мере на 10% или 20% по сравнению с нормальным (т.е. контрольным) уровнем экспрессии в клетке, например, на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии (например, уровнем экспрессии в клетках, которые не подвергались воздействию ASO).

[0190] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению способны снижать экспрессию мРНК *CEBP/B in vitro* на по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, или на около 100% в целевых клетках, когда клетки приводят в контакт с ASO, по сравнению с клетками, которые не приводят в контакт с ASO (например, приводят в контакт с солевым раствором).

[0191] В некоторых аспектах ASO может допускать 1, 2, 3 или 4 (или более) несовпадений при гибридизации с целевой последовательностью и при этом достаточно связываться с мишенью для проявления желаемого эффекта, т. е. снижения уровня целевой мРНК и/или белка. Несовпадения могут быть, например, компенсированы увеличенной длиной нуклеотидной последовательности ASO и/или увеличенным количеством аналогов нуклеотидов, которые описаны в данном документе в другом месте.

[0192] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению содержит не более трех несовпадений при гибридизации с целевой последовательностью. В других аспектах

непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более двух несовпадений при гибридизации с целевой последовательностью. В других аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более одного несовпадения при гибридизации с целевой последовательностью.

II.C. Длина ASO

[0193] ASO могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 смежных нуклеотидов в длину. Следует понимать, что когда указан диапазон для ASO или длины непрерывной нуклеотидной последовательности, этот диапазон включает нижнюю и верхнюю длины, представленные в диапазоне, например, (или между) 10–30, включая как 10, так и 30.

[0194] В некоторых аспектах ASO содержат непрерывную нуклеотидную последовательность общей длиной около 14-20, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов. В определенных аспектах ASO содержат непрерывную нуклеотидную последовательность общей длиной около 20 последовательных нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 14 нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 15 нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 16 нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 17 нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 18 нуклеотидов. В определенных аспектах ASO по настоящему изобретению имеют длину 19 нуклеотидов.

II.D. Нуклеозиды и аналоги нуклеозидов

[0195] В одном аспекте данного изобретения ASO содержат один или более неприродных аналогов нуклеозидов. «Аналоги нуклеозидов», используемые в данном документе, представляют собой варианты природных нуклеозидов, таких как нуклеозиды ДНК или РНК, за счет модификаций сахарных и/или основных фрагментов. Аналоги в принципе могут быть просто «молчащими» или «эквивалентными» природным нуклеозидам в контексте олигонуклеотида, то есть не оказывать функционального влияния на то, как олигонуклеотид ингибирует экспрессию целевого гена. Такие «эквивалентные» аналоги тем не менее могут быть полезны, если, например, они проще или дешевле в производстве, или более стабильны к условиям хранения или производства, или представляют собой маркер или метку. В некоторых аспектах, однако, аналоги будут оказывать функциональное влияние на способ, которым ASO ингибирует экспрессию;

например, путем увеличения аффинности связывания с мишенью и/или увеличения устойчивости к внутриклеточным нуклеазам и/или облегчения транспорта в клетку. Конкретные примеры аналогов нуклеозидов описаны, например, в Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 and Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, и в схеме 1. ASO по настоящему изобретению могут содержать более одного, более двух, более трех, более четырех, более пяти, более шести, более семи, более восьми, более девяти, более 10, более 11, более 12, более 13, более 14, более 15, более 16, более 18, более 19 или более 20 аналогов нуклеозидов. В некоторых аспектах аналоги нуклеозидов в ASO являются одинаковыми. В других аспектах аналоги нуклеозидов в ASO отличаются. Аналоги нуклеотидов в ASO могут представлять собой любой из следующих аналогов нуклеозидов или их комбинацию.

[0196] В некоторых аспектах аналог нуклеозида включает 2'-О-алкил-РНК; 2'-О-метил РНК (2'-ОМе); 2'-алкокси-РНК; 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ); 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-РНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (АНА); 2'-фтор-АНА; аналог бициклического нуклеозида; или любую их комбинацию. В некоторых аспектах аналог нуклеозида включает модифицированный по сахару нуклеозид. В некоторых аспектах аналог нуклеозида включает нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах аналог нуклеозида включает LNA.

[0197] В некоторых аспектах аналог нуклеозида выбран из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ), α -L-LNA, β -D-LNA, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-LNA, окси-LNA, тио-LNA и любой их комбинации. В некоторых аспектах ASO содержит одно или более 5'-метилцитозиновых азотистых оснований.

II.D.1. Азотистое основание

[0198] Термин «азотистое основание» включает пуриновые (например, аденин и гуанин) и пиримидиновые (например, урацил, тимин и цитозин) фрагменты, присутствующие в нуклеозидах и нуклеотидах, которые образуют водородные связи при гибридизации нуклеиновых кислот. В контексте настоящего изобретения термин «азотистое основание» также включает модифицированные азотистое основание, которое может отличаться от природного азотистого основания, но является функциональным во время гибридизации нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах фрагмент азотистого основания модифицируют путем модификации или замены азотистого основания. В этом контексте «азотистое основание» относится как к природным азотистым основаниям, таким как аденин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин и гипоксантин, так и к неприродным

вариантам. Такие варианты, например, описаны в Hiraio *et al.*, (2012) *Accounts of Chemical Research* vol 45 page 2055, и Bergstrom (2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* Suppl. 37 1.4.1.

[0199] В некоторых аспектах фрагмент в виде азотистого основания модифицируют путем замены пурина или пиримидина на модифицированный пурин или пиримидин, такой как замещенный пурин или замещенный пиримидин, такой как азотистое основание, выбранное из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-метилцитозина, 5-тиозоло-цитозина, 5-пропинилцитозина, 5-пропинилурацила, 5-бром урацила, 5-тиазолоурацила, 2-тиоурацила, 2'-тиотимина, инозина, диаминопурина, 6-аминопурина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина.

[0200] Фрагменты в виде азотистых оснований могут быть обозначены буквенным кодом для каждого соответствующего азотистого основания, например, А, Т, G, С или U, где каждая буква может необязательно включать модифицированные азотистые основания с эквивалентной функцией. Например, в приведенных в качестве примеров олигонуклеотидах фрагменты в виде азотистых оснований выбраны из А, Т, G, С и 5-метилцитозина. Необязательно, для LNA-гэпмеров можно использовать 5-метилцитозиновые нуклеозиды LNA.

II.D.2. Модификация сахара

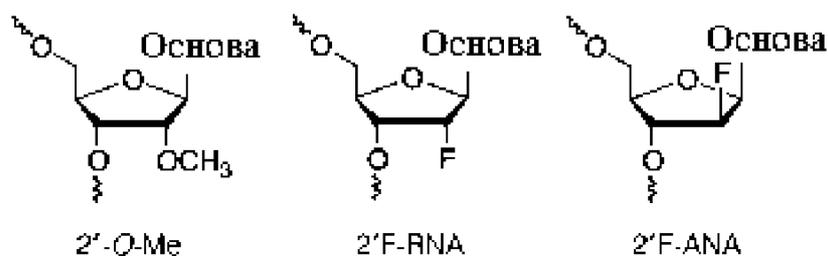
[0201] ASO по данному изобретению может содержать один или более нуклеозидов, которые содержат фрагмент модифицированного сахара, *т.е.* модификация фрагмента сахара по сравнению с фрагментом сахара рибозы в ДНК и РНК. Были получены многочисленные нуклеозиды с модификацией сахарного фрагмента рибозы, прежде всего с целью улучшения определенных свойств олигонуклеотидов, таких как аффинность и/или устойчивость к нуклеазам.

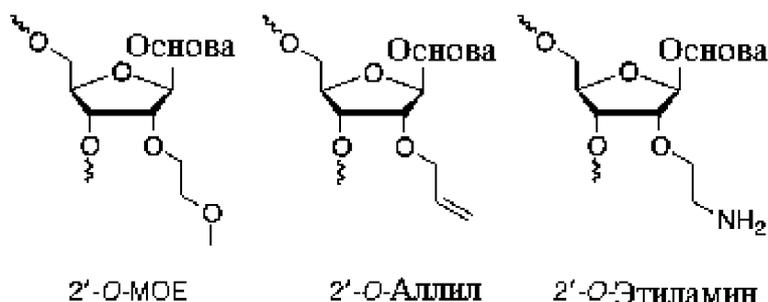
[0202] Такие модификации включают те, в которых модифицируется структура кольца рибозы, *например*, путем замены на гексозное кольцо (HNA) или бициклическое кольцо, которое обычно имеет бирадикальный мостик между атомами углерода C2' и C4' на рибозном кольце (LNA), или несвязанное кольцо рибозы, в котором обычно отсутствует связь между атомы углерода C2' и C3' (*например*, UNA). Другие модифицированные по сахару нуклеозиды, включают, например, нуклеиновые кислоты бициклогексозы (WO2011/017521) или трициклические нуклеиновые кислоты (WO2013/154798). Модифицированные нуклеозиды также включают нуклеозиды, в которых сахарный фрагмент заменен несхарным фрагментом, например, в случае пептидных нуклеиновых кислот (PNA) или морфолинуклеиновых кислот.

[0203] Модификации сахара также включают модификации, сделанные путем изменения групп заместителей в кольце рибозы на группы, отличные от водорода, или группы 2'-ОН, естественным образом обнаруживаемой в нуклеозидах РНК. Заместители могут быть, например, введены в положения 2', 3', 4' или 5'. Нуклеозиды с модифицированными фрагментами сахара также включают 2'-модифицированные нуклеозиды, такие как 2'-замещенные нуклеозиды. Действительно, много внимания было уделено разработке 2'-замещенных нуклеозидов, и было обнаружено, что многочисленные 2'-замещенные нуклеозиды обладают полезными свойствами при включении в олигонуклеотиды, такими как повышенная устойчивость к нуклеозидам и повышенная аффинность.

II.D.2.a. 2'-модифицированные нуклеозиды

[0204] Модифицированный по сахару в положении 2' нуклеозид представляет собой нуклеозид, который имеет заместитель, отличный от Н или –ОН, в положении 2' (2'-замещенный нуклеозид) или содержит 2'-связанный бирадикал, и включает 2'-замещенные нуклеозиды и нуклеозиды LNA (с 2'-4'-бисрадикальным мостиком). Например, 2'-модифицированный сахар может обеспечивать повышенную аффинность связывания (например, повышающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром) и/или повышенную устойчивость олигонуклеотида к нуклеазам. Примерами 2'-замещенных модифицированных нуклеозидов являются 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино-ДНК, 2'-фтор-РНК, 2'-флуоро-ДНК, арабинуклеиновые кислоты (ANA) и 2'-фтор-ANA-нуклеозид. Дополнительные примеры см., например, Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443; Uhlmann, *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213; и Deleavey and Damha, *Chemistry and Biology* 2012, 19, 937. Ниже приведены изображения некоторых 2'-модифицированных замещенных нуклеозидов.



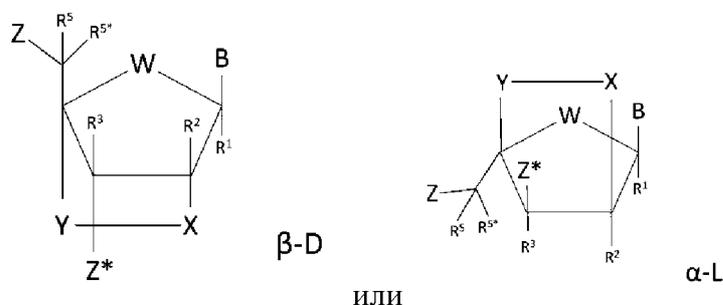


П.Д.2.б .Нуклеозиды закрытых нуклеиновых кислот (LNA).

[0205] Нуклеозиды LNA представляют собой модифицированные нуклеозиды, которые содержат линкерную группу (называемую бирадикалом или мостиком) между С2' и С4' сахарного кольца рибозы нуклеозида (например, 2'-4'-мостик), которая ограничивает или блокирует конформацию рибозного кольца. Эти нуклеозиды в литературе также называют мостиковой нуклеиновой кислотой или бициклической нуклеиновой кислотой (BNA). Блокирование конформации рибозы ассоциировано с повышенной аффинностью гибридизации (стабилизацией дуплекса), когда LNA включается в олигонуклеотид для комплементарной молекулы РНК или ДНК. Это можно определить обычным образом путем измерения температуры плавления дуплекса олигонуклеотид/комплемент.

[0206] Неограничивающие примеры нуклеозидов LNA раскрыты в WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352, WO 2004/046160, WO 00/047599, WO 2007/134181, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2007/090071, WO 2009/006478, WO 2011/156202, WO 2008/154401, WO 2009/067647, WO 2008/150729, Morita *et al.*, *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12, 73-76, Seth *et al.*, *J. Org. Chem.* 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, и Mitsuoka *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2009, 37(4), 1225-1238.

[0207] В некоторых аспектах модифицированный нуклеозид или нуклеозиды LNA согласно ASO по настоящему изобретению имеют общую структуру формулы I или II:



Формула I

Формула II

где

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

В представляет собой нуклеиновое основание или фрагмент в виде модифицированного нуклеинового основания;

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

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

R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} независимо выбраны из водорода, галогена, алкила, алкенила, алкинила, гидроксильной, алкоксильной, алкоксиалкильной, алкенилокси-, карбоксильной, алкоксикарбонильной, алкилкарбонильной, формильной, азидной, гетероциклической и арильной; и

X, Y, R^a и R^b определены в данном документе.

[0208] В некоторых аспектах -X-Y-, R^a представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В некоторых аспектах -X-Y-, R^b представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В других аспектах -X-Y- один или оба из R^a и R^b представляют собой водород. В дополнительных аспектах -X-Y-, только один из R^a и R^b представляет собой водород. В некоторых аспектах -X-Y-, один из R^a и R^b представляет собой метил, а другой представляет собой водород. В некоторых аспектах -X-Y-, как R^a, так и R^b одновременно представляют собой метил.

[0209] В некоторых аспектах -X-, R^a представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В некоторых аспектах -X-, R^b представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В других аспектах -X- один или оба из R^a и R^b представляют собой водород. В определенных аспектах -X-, только один из R^a и R^b представляет собой водород. В некоторых аспектах -X-, один из R^a и R^b представляет собой метил, а другой представляет собой водород. В других аспектах -X-, как R^a, так и R^b одновременно представляют собой метил.

[0210] В некоторых аспектах -Y-, R^a представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В определенных аспектах -Y-, R^b представляет собой водород или алкил, в частности водород или метил. В других аспектах -Y-, один или оба из R^a и R^b представляют собой водород. В некоторых аспектах -Y- только один из R^a и R^b представляет собой водород. В других аспектах -Y-, один из R^a и R^b представляет собой метил, а другой представляет собой водород. В некоторых аспектах -Y-, как R^a, так и R^b одновременно представляют собой метил.

[0211] В некоторых аспектах R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} независимо выбраны из водорода и алкила, в частности водорода и метила.

[0212] В некоторых аспектах все R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно представляют собой водород.

[0213] В некоторых аспектах все R^1 , R^2 , R^3 одновременно представляют собой водород, один из R^5 и R^{5*} представляет собой водород, а другой является таким, как определено выше, в частности, алкилом, более конкретно, метилом.

[0214] В некоторых аспектах все R^1 , R^2 , R^3 одновременно представляют собой водород, один из R^5 и R^{5*} представляет собой водород, а другой представляет собой азид.

[0215] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-O-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1 , R^2 , R^3 , R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA описаны в WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352 и WO 2004/046160, которые включены в данный документ посредством ссылки и включают то, что широко известно в данной области техники как бета-D-окси нуклеозиды LNA и альфа-L-окси нуклеозиды LNA.

[0216] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-S-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1 , R^2 , R^3 , R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие тионуклеозиды LNA раскрыты в WO 99/014226 и WO 2004/046160, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0217] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-NH-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1 , R^2 , R^3 , R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие аминонуклеозиды LNA раскрыты в WO 99/014226 и WO 2004/046160, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0218] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-O-CH_2CH_2-$ или $-OCH_2CH_2CH_2-$, W представляет собой кислород, и все из R^1 , R^2 , R^3 , R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA описаны в WO 00/047599 и Morita *et al.*, *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12, 73-76, которые включены в данный документ посредством ссылки, и включают то, что широко известно в данной области техники как нуклеиновые кислоты с 2'-O-4'C-этиленовым мостиком (ENA).

[0219] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-O-CH_2-$, W представляет собой кислород, все из R^1 , R^2 , R^3 одновременно представляют собой водород, один из R^5 и R^{5*} представляет собой водород, а другой не представляет собой водород, например, алкил, например, метил. Такие 5'-замещенные нуклеозиды LNA раскрыты в WO 2007/134181, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0220] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-O-CR^aR^b-$, где один или оба из R^a и R^b не представляют собой водород, в частности алкил, такой как метил, W представляет собой кислород, все из R^1 , R^2 , R^3 одновременно представляют собой водород, один из R^5 и R^{5*} представляет собой водород, а другой не представляет собой водород, в частности, алкил, например, метил. Такие бис-модифицированные нуклеозиды LNA

раскрыты в WO 2010/077578, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0221] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH₂-O-CH₃)- ("2'-О-метоксиэтилбициклическую нуклеиновую кислоту", Seth *et al.*, *J. Org. Chem.* 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81).

[0222] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CHR^a-, W представляет собой кислород, а все из R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие б'-замещенные нуклеозиды LNA описаны в WO 2010/036698 и WO 2007/090071, которые включены в данный документ посредством ссылки. В таких б'-замещенных нуклеозидах LNA R^a представляет^{собою}, в частности, C1-C6 алкил, такой как метил.

[0223] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH₂-O-CH₃)-, W представляет собой кислород, а все из R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA также известны в данной области техники как циклические MOE (сMOE) и описаны в WO 2007/090071.

[0224] В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -O-CH(CH₃)-.

[0225] В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -O-CH₂-O-CH₂- (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 op. cit.)

[0226] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH₃)-, W представляет собой кислород, а все из R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие б'-метил-нуклеозиды LNA также известны в данной области техники как сЕТ-нуклеозиды и могут представлять собой диастереоизомеры (S)-сЕТ или (R)-сЕТ, как описано в WO 2007/090071 (бета-D) и WO 2010/036698 (альфа-L), оба из которых включены в данный документ посредством ссылки.

[0227] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CR^aR^b-, где ни R^a, ни R^b не представляют собой водород, W представляет собой кислород, и все из R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В некоторых аспектах как R^a, так и R^b одновременно представляют собой алкил, в частности, оба одновременно представляют собой метил. Такие б'-ди-замещенные нуклеозиды LNA раскрыты в WO 2009/006478, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0228] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -S-CHR^a-, W представляет собой кислород, а все из R¹, R², R³, R⁵ and R^{5*} одновременно представляют собой водород. Такие б'-замещенные тионуклеозиды LNA описаны в WO 2011/156202, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых аспектах такой б'-замещенной тио-LNA R^a представляет собой алкил, в частности метил.

[0229] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -C(=CH₂)C(R^aR^b)-, например, W представляет собой кислород, и все из R¹, R², R³, R⁵ и R^{5*} одновременно

представляют собой водород. Такие винилкарбон-нуклеозиды LNA раскрыты в WO 2008/154401 и WO 2009/067647, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0230] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-N(OR^a)-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1, R^2, R^3, R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В некоторых аспектах R^a представляет собой алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA также известны как N-замещенные LNA и описаны в WO 2008/150729, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0231] В некоторых аспектах, $-X-Y-$ представляет собой $-O-NCH_3-$ (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 *op. cit.*).

[0232] В некоторых аспектах, $-X-Y-$ представляет собой $ON(R^a)-N(R^a)-O-, -NR^a-CR^aR^b-CR^aR^b-$, or $-NR^a-CR^aR^b-$, W представляет собой кислород, и все из R^1, R^2, R^3, R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В определенных аспектах R^a представляет собой алкил, такой как метил. (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 *op. cit.*).

[0233] В некоторых аспектах как R^5 , так и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В других аспектах один из R^5 и R^{5*} представляет собой водород, а другой представляет собой алкил, например, метил. В таких аспектах R^1, R^2 и R^3 могут быть, в частности, водородом, а $-X-Y-$ может, в частности, представлять собой $-O-CH_2-$ или $-O-CH(R^a)_3-$, например, $-O-CH(CH_3)-$.

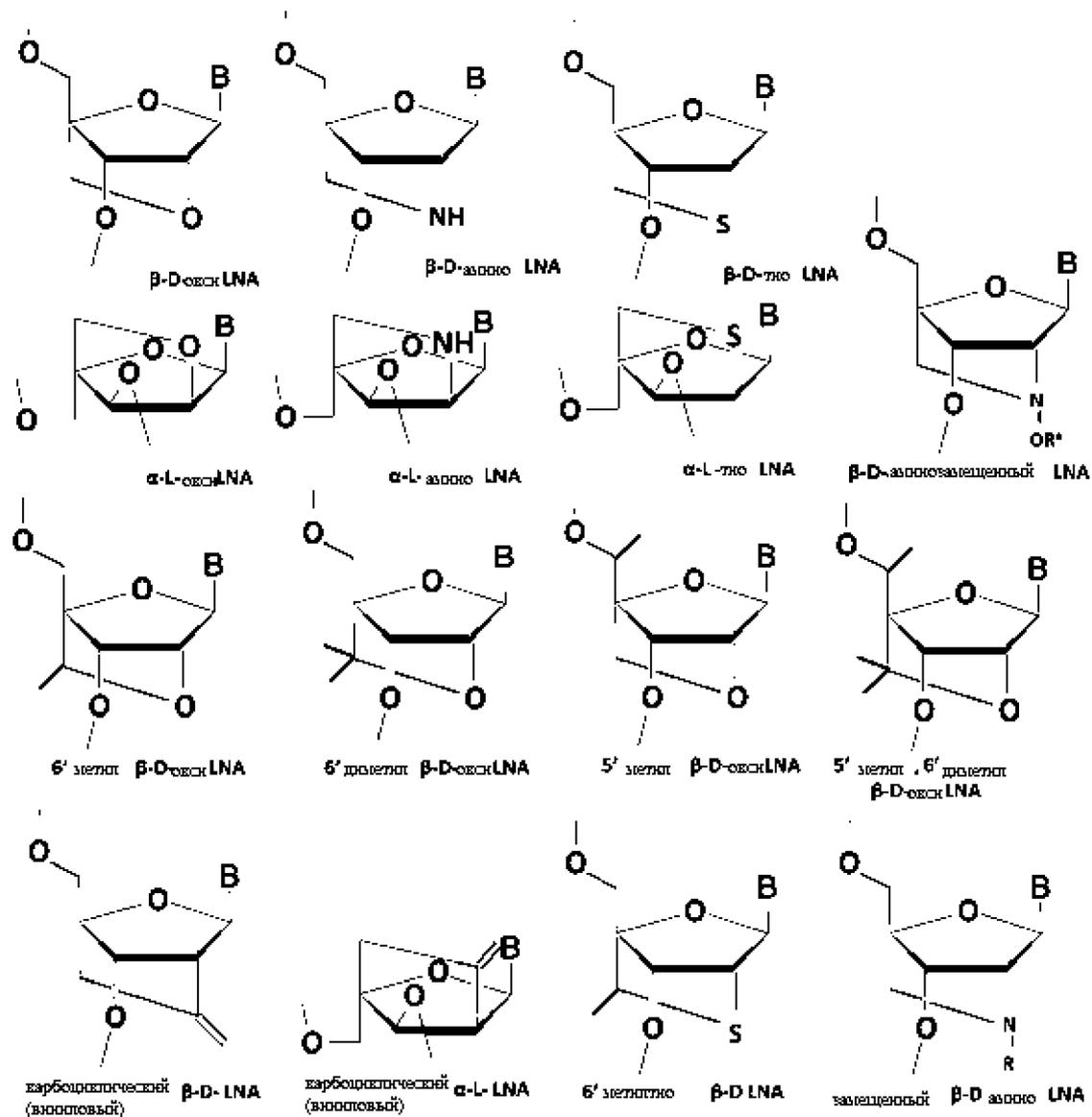
[0234] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$, например $-CH_2-O-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1, R^2, R^3, R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В таких аспектах R^a может, в частности, представлять собой алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA также известны как конформационно ограниченные нуклеотиды (CRN) и описаны в WO 2013/036868, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0235] В некоторых аспектах $-X-Y-$ представляет собой $-O-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$, например, $-O-CH_2-O-CH_2-$, W представляет собой кислород, а все из R^1, R^2, R^3, R^5 и R^{5*} одновременно представляют собой водород. В определенных аспектах R^a может, в частности, представлять собой алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA также известны как нуклеотиды СОС и описаны в Mitsuoka *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2009, 37(4), 1225-1238, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0236] Будет признано, что, если не указано иное, нуклеозиды LNA могут быть в бета-D или альфа-L стереоизоформе.

[0237] Некоторые примеры нуклеозидов LNA представлены на схеме 1.

Схема 1



[0238] Как показано в другом месте, в некоторых аспектах изобретения нуклеозиды LNA в олигонуклеотидах представляют собой нуклеозиды бета-D-окси-LNA.

Ш.Е. Опосредованная нуклеазами деградация

[0239] Опосредованная нуклеазой деградация относится к олигонуклеотиду, способному опосредовать деградацию комплементарной нуклеотидной последовательности при образовании дуплекса с такой последовательностью.

[0240] В некоторых аспектах олигонуклеотид может функционировать посредством опосредованной нуклеазой деградации целевой нуклеиновой кислоты, где олигонуклеотиды по данному изобретению способны рекрутировать нуклеазу, в частности, и эндонуклеазу, предпочтительно эндорибонуклеазу (РНКазу), такую как РНКаза H. Примеры конструкций олигонуклеотидов которые действуют посредством механизмов,

опосредованных нуклеазами, представляют собой олигонуклеотиды, которые, как правило, содержат область по меньшей мере из 5 или 6 нуклеозидов ДНК и окружены с одной или обеих сторон усиливающими аффинность нуклеозидами, например, гэлмерами.

П.Ф. Активность и рекрутинг РНКазы Н

[0241] Активность РНКазы Н антисмыслового олигонуклеотида относится к его способности рекрутировать РНКазу Н в дуплексе с комплементарной молекулой РНК и вызывать деградацию комплементарной молекулы РНК. WO 01/23613 предложены способы определения активности РНКазы Н *in vitro*, которые можно использовать для определения способности рекрутировать РНКазу Н. Как правило, считается, что олигонуклеотид способен рекрутировать РНКазу Н, если при наличии комплементарной целевой последовательности нуклеиновой кислоты он имеет начальную скорость, измеренную в пмоль/л/мин, по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10% или более 20% от начальной скорости, определенной при использовании олигонуклеотида, имеющего ту же последовательность оснований, что и тестируемый модифицированный олигонуклеотид, но содержащего только мономеры ДНК, с фосфоротиоатными связями между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с использованием методологии, представленной в Примерах 91-95 из WO 01/23613.

[0242] В некоторых аспектах считается, что олигонуклеотид по существу не способен рекрутировать РНКазу Н, если при наличии комплементарной целевой нуклеиновой кислоты начальная скорость РНКазы Н, измеренная в пмоль/л/мин, составляет менее 20%, например, менее 10%, например, менее 5% от начальной скорости, определенной при использовании олигонуклеотида, имеющего ту же последовательность оснований, что и тестируемый олигонуклеотид, но содержащего только мономеры ДНК, без 2'-замен, с фосфоротиоатными связями между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с использованием методологии, представленной в Примерах 91-95 WO 01/23613.

П.Г. Конструкция ASO

[0243] ASO по данному изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, которая включает как нуклеозиды, так и аналоги нуклеозидов, и может быть в форме гэлмера. Примеры конфигураций гэлмера, которые можно использовать с ASO по данному изобретению, описаны в публикации заявки на патент США № 2012/0322851.

[0244] Термин «гэлмер», используемый в данном документе, относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который содержит область рекрутирующих РНКазу Н

олигонуклеотидов (гэп), которая фланкирована с 5' и 3' одного или более модифицированных повышающих аффинность нуклеозидов (фланги). Термин «LNA-гэпмер» представляет собой олигонуклеотид гэпмера, в котором по меньшей мере один из модифицированных нуклеозидов, повышающих аффинность, представляет собой нуклеозид LNA. Термин «гэпмер со смешанными флангами» относится к LNA-гэпмеру, в котором фланговые области содержат по меньшей мере один нуклеозид LNA и по меньшей мере один нуклеозид ДНК или немодифицированный LNA нуклеозид, такой как по меньшей мере один 2'-замещенный модифицированный нуклеозид, такой как, например, нуклеозид(-ы) 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино-ДНК, 2'-фтор-РНК, 2'-фтор-ДНК, арабинонуклеиновой кислоты (ANA) и 2'-фтор-ANA.

[0245] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению может быть в форме миксмера. В некоторых аспектах ASO по данному изобретению может быть в форме тоталмера. В некоторых аспектах, в дополнение к усилению аффинности ASO к целевой области, некоторые аналоги нуклеозидов также опосредуют связывание и расщепление РНКазы (например, РНКазы H). Поскольку мономеры α -L-LNA в определенной степени рекрутируют активность РНКазы H, в некоторых аспектах области гэпа (например, область В, как упоминается в данном документе) ASO, содержащих мономеры α -L-LNA, состоят из меньшего количества мономеров, распознаваемых и расщепляемых РНКазой H, и появляется большая гибкость в конструкции миксмера.

II.G.1. Конструкция гэпмера

[0246] В некоторых аспектах ASO по данному изобретению представляет собой гэпмер и содержит непрерывный участок нуклеотидов (например, один или более ДНК), который способен рекрутировать РНКазу, такую как РНКазу H, называемую в данном документе областью В (В), где область В фланкирована как с 5', так и с 3' областями аналогов нуклеозидов 5' и 3' относительно непрерывного участка нуклеотидов области В – эти области называются областями А (А) и С (С), соответственно. В некоторых аспектах аналоги нуклеозидов представляют собой модифицированные по сахару нуклеозиды (например, высокоаффинные модифицированные по сахару нуклеозиды). В определенных аспектах модифицированные по сахару нуклеозиды областей А и С повышают аффинность ASO к нуклеиновой кислоте-мишени (т.е. повышающие аффинность модифицированные по сахару в положении 2' нуклеозиды). В некоторых аспектах модифицированный по сахару нуклеозиды представляют собой модифицированные по сахару в положении 2' нуклеозиды, такие как высокоаффинные модификации сахара в положении 2', такие как

LNA и/или 2'-МОЕ.

[0247] В гэтмере большинство 5'- и 3'-нуклеозидов области В представляют собой нуклеозиды ДНК и расположены рядом с аналогами нуклеозидов (например, нуклеозидами, модифицированными сахаром с высокой аффинностью) областей А и С, соответственно. В некоторых аспектах области А и С могут быть дополнительно определены наличием нуклеозидных аналогов на конце, наиболее удаленном от области В (т.е. на 5'-конце области А и на 3'-конце области С).

[0248] В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению содержат нуклеотидную последовательность формулы (от 5' до 3') А-В-С, где: (А) (5'-область или последовательность первого фланга) содержит по меньшей мере один нуклеозидный аналог (например, 3-5 звеньев LNA); (В) содержит по меньшей мере четыре последовательных нуклеозида (например, 4-24 звена ДНК), которые способны рекрутировать РНКазу (при образовании дуплекса с комплементарной молекулой РНК, такой как пре-мРНК или мРНК-мишень); и (С) (3'-область или последовательность второго фланга) содержит по меньшей мере один аналог нуклеозида (например, 3-5 звеньев LNA).

[0249] В некоторых аспектах область А содержит 3-5 аналогов нуклеозидов, таких как LNA, область В состоит из 6-24 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) звеньев ДНК, и область С состоит из 3 или 4 аналогов нуклеозидов, таких как LNA. Такие конструкции включают (А-В-С) 3-14-3, 3-11-3, 3-12-3, 3-13-3, 4-9-4, 4-10-4, 4-11-4, 4-12-4, и 5-10-5. В некоторых аспектах ASO имеет конструкцию LLLD_nLLL, LLLLD_nLLLL, или LLLLLD_nLLLLL, где L представляет собой аналог нуклеозида, D представляет собой ДНК, а n может быть любым целым числом от 4 до 24. В некоторых аспектах n может быть любым целым числом от 6 до 14. В некоторых аспектах n может быть любым целым числом от 8 до 12. В некоторых аспектах ASO имеет конструкцию LLLMMD_nMMLLL, LLLMD_nMLLL, LLLLMD_nMMLLLL, LLLLMD_nMLLLL, LLLLLLMD_nMMLLLLL, или LLLLLLMD_nMLLLLL, где D представляет собой ДНК, n может быть любым целым числом от 3 до 15, L представляет собой LNA, а M представляет собой 2'-МОЕ.

[0250] Дополнительные конструкции гэтмера описаны в WO 2004/046160, WO 2007/146511 и WO 2008/113832, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

П.Н. Межнуклеотидные связи

[0251] Мономеры ASO, описанные в данном документе, связаны друг с другом через линкерные группы. Соответственно, каждый мономер связан со смежным 3'-мономером через линкерную группу.

[0252] Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в контексте настоящего изобретения 5'-мономер на конце ASO не содержит 5'-концевой группы, хотя он может содержать или не содержать 5'-концевую группу.

[0253] В некоторых аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. Термины «линкерная группа» или «межнуклеозидная связь» предназначены для обозначения группы, способной ковалентно связывать вместе два нуклеозида. Неограничивающие примеры включают фосфатные группы и фосфоротиоатные группы.

[0254] Нуклеозиды ASO по данному изобретению или его непрерывные нуклеозидные последовательности связаны друг с другом через линкерные группы. Соответственно, каждый нуклеозид связан со смежным 3'-нуклеозидом через линкерную группу.

[0255] В некоторых аспектах межнуклеозидная связь изменена с обычной фосфодиэфирной на связь, более устойчивую к нуклеазной атаке, такую как фосфоротиоат, который расщепляется РНКазой H, что также позволяет использовать этот путь антисмыслового ингибирования для снижения экспрессии целевого гена. В некоторых аспектах по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы.

III. Внеклеточные везикулы, например, экзосомы

[0256] В данном документе описаны ВВ, например, экзосомы, содержащие ASO. ASO может быть любым ASO, описанным в данном документе, или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах ASO снижает уровень мРНК *CEBP/β* или белка *CEBP/β* в целевой клетке.

[0257] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере одну ASO. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере две ASO, например, первую ASO, содержащую первую нуклеотидную последовательность, и вторую ASO, содержащую вторую нуклеотидную последовательность. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере три ASO, по меньшей мере четыре ASO, по меньшей мере пять ASO, по меньшей мере шесть ASO или более шести ASO. В некоторых аспектах каждый из первого ASO, второго ASO, третьего ASO, четвертого ASO, пятого ASO, шестого ASO и/или девятого ASO отличается.

[0258] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома содержит первый ASO и второй ASO, причем первый ASO содержит первую нуклеотидную последовательность, комплементарную первой целевой последовательности в первом транскрипте, и при этом второй ASO содержит вторую нуклеотидную последовательность, комплементарную второй целевой последовательности в первом транскрипте. В некоторых аспектах первая целевая последовательность не перекрывается со второй целевой последовательностью. В некоторых аспектах первая целевая последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в пределах 5'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность не содержит нуклеотида, который находится в пределах 5'UTR. В некоторых аспектах первая целевая последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в пределах 3'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность не содержит нуклеотида, который находится в пределах 3'UTR. В некоторых аспектах первая целевая последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в пределах 5'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в пределах 3'UTR.

[0259] В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в экзон-интронном соединении, а вторая ASO нацелена на последовательность в экзон-интронном соединении. В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в экзон-интронном соединении, а вторая ASO нацелена на последовательность в экзоне. В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в экзон-интронном соединении, а второй ASO нацелена на последовательность в интроне. В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в экзоне, а второй ASO нацелен на последовательность в экзоне. В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в интроне, а второй ASO нацелен на последовательность в экзоне. В некоторых аспектах первый ASO нацелен на последовательность в интроне, а второй ASO нацелен на последовательность в интроне.

[0260] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома содержит первый ASO и второй ASO, при этом первый ASO содержит первую нуклеотидную последовательность, комплементарную первой целевой последовательности в первом транскрипте, и при этом вторая ASO содержит вторую нуклеотидную последовательность, комплементарную второй целевой последовательности во втором транскрипте, при этом первый транскрипт не является продуктом того же гена, что и второй транскрипт.

[0261] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на опухолевую клетку, дендритную клетку, Т-клетку, В-клетку, макрофаг, моноцит, нейрон, гепатоцит,

клетку Купфера, клетку миелоидной линии (например, нейтрофил, клетка-супрессор миелоидного происхождения (MDSC, например, моноцитарный MDSC или гранулоцитарный MDSC), моноцит, макрофаг, гемопоэтические стволовые клетки, базофил, нейтрофил или эозинофил) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на клетку миелоидной линии. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на макрофаг. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, нацелена на печень, сердце, легкие, мозг, почки, центральную нервную систему, периферическую нервную систему, мышцы, кости, сустав, кожу, кишечник, мочевого пузыря, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию.

[0262] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, снижает экспрессию одного или более генов, экспрессия которых повышается СЕВР/β. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, способствует дифференцировке макрофагов М2. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, снижает дифференцировку макрофагов М1.

[0263] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из следующего: фибросаркома, микросаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, лимфома, лейкемия, рак печени, глиобластома, меланома, миелома, базальноклеточный рак, аденокарцинома, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатома, рак желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональный рак, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиома, глиобластома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома и любая их комбинация. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, увеличивает инфильтрацию иммунных клеток, например, макрофагов, в опухоли.

[0264] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение опухоли центральной нервной системы у субъекта. В некоторых аспектах ВВ, например,

экзосома, обеспечивает лечение опухоли головного мозга у субъекта. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение глиобластомы у субъекта. В некоторых аспектах глиобластома представляет собой мультиформную глиобластому (GBM). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение злокачественного новообразования мозговых оболочек у субъекта. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, активирует макрофаги в центральной нервной системе. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, индуцирует M1-поляризацию макрофагов в центральной нервной системе. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, активирует менингеальные макрофаги. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, индуцирует M1-поляризацию менингеальных макрофагов. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, индуцирует опухолевую инфильтрацию менингеальными макрофагами.

[0265] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение фиброза у нуждающегося в этом субъекта. Чрезмерная активация макрофагов M2 приводит к непрерывной продукции TGF β и факторов роста, которые способствуют пролиферации миофибробластов, активации EMT/EndoMT и отложению внеклеточного матрикса. Макрофаги M2 являются переломной точкой между заживлением раны и обострением профибротического процесса. В некоторых аспектах фиброз выбран из следующего: фиброз печени (НАСГ), цирроз, легочный фиброз, кистозный фиброз, хронический язвенный колит/ВЗК, фиброз мочевого пузыря, фиброз почек, CAPS (синдром Макла-Уэлса), предсердный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, перенесенный инфаркт миокарда, глиальный рубец, артериальная ригидность, артрофиброз, болезнь Крона, контрактура Дюпюитрена, келоидный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, болезнь Пейрони, нефрогенный системный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, ретроперитонеальный фиброз, склеродермия/системный склероз, адгезивный капсулит и любая их комбинация. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение фиброза печени (НАСГ). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение CAPS (синдрома Макла-Уэлса).

[0266] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение нейродегенеративного заболевания. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, прионной болезни, болезни двигательных нейронов, болезни Хантингтона, спиноцеребеллярной атаксии, спинальной мышечной атрофии и любой их комбинации.

[0267] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, обеспечивает лечение нарушение обмена веществ/ССЗ. В некоторых аспектах нарушение обмена веществ/ССЗ

выбрано из нарушения кислотно-щелочного равновесия, метаболического заболевания головного мозга, нарушения метаболизма кальция, нарушения, связанного с дефицитом репарации ДНК, нарушения метаболизма глюкозы, гиперлактатемии, нарушения метаболизма железа, нарушения метаболизма липидов, синдрома мальабсорбции, метаболического синдрома X, врожденного нарушения метаболизма, митохондриального заболевания, нарушения фосфорного обмена, порфирии, дефицит протеостаза, метаболического заболевания кожи, синдрома истощения, водно-электролитного дисбаланса и любой их комбинации.

[0268] Как описано выше, ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе, представляют собой внеклеточные везикулы с диаметром около 20-300 нм. Размер ВВ, *например*, экзосомы, описанный в данном документе, может быть измерен в соответствии со способами, описанными *ниже*.

[0269] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, по настоящему изобретению содержит билипидную мембрану («ВВ, например, экзосома, мембрана»), включающую внутреннюю (просветную) поверхность и внешнюю поверхность. В определенных аспектах внутренняя (просветная) поверхность обращена к внутреннему ядру (т.е. просвету) ВВ, например, экзосоме. В определенных аспектах внешняя поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или клетки-мишени.

[0270] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы содержит липиды и жирные кислоты. В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы содержит фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты, сфинголипиды, фосфоглицериды, стерины, холестерины и фосфатидилсерины.

[0271] В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы содержит внутреннюю и внешнюю мембраны. Состав внутренней и внешней мембран может быть определен с помощью анализов трансбислойного распределения, известных в данной области техники., *см.*, *например*, Kuypers *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1985 819:170. В некоторых аспектах состав внешней мембраны составляет около 70-90% холинфосфолипидов, около 0-15% кислых фосфолипидов и около 5-30% фосфатидилэтаноламина. В некоторых аспектах состав внутренней мембраны составляет около 15-40% холинфосфолипидов, около 10-50% кислых фосфолипидов и около 30-60% фосфатидилэтаноламина.

[0272] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, мембрана содержит один или более полисахаридов, таких как гликан.

[0273] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, по настоящему изобретению

содержит ASO, где ASO связана с ВВ через каркасный фрагмент либо на внешней поверхности ВВ, либо на поверхности просвета ВВ.

[0274] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая ASO, содержит заякоривающий фрагмент, который необязательно содержит линкер, между ASO и мембраной экзосомы. Неограничивающие примеры линкеров описаны в данном документе в другом месте.

III.A. Заякоривающие фрагменты (AM)

[0275] Для заякоривания ASO на ВВ по настоящему изобретению можно использовать один или более заякоривающих фрагментов (AM). В некоторых аспектах ASO связан непосредственно с заякоривающим фрагментом или через линкер. В некоторых аспектах ASO может быть присоединен к заякоривающему фрагменту или комбинации линкеров посредством реакции между «реакционноспособной группой» (RG; например, амином, тиолом, гидроксидом, карбоновой кислотой или азидом) с «реакционноспособным фрагментом» (RM; например, малеимидом, сукцинатом, NHS). Предусмотрено несколько потенциальных синтетических путей, например:

[AM]-/реакционноспособный фрагмент/ + /реакционноспособная группа/-[ASO]

[AM]-[линкер]n-/реакционноспособный фрагмент/ + /реакционноспособная группа/-[ASO]

[AM]-/реакционноспособный фрагмент/ + /реакционноспособная группа/-[линкер]n-[ASO]

[AM]- [линкер]n-/реакционноспособный фрагмент/ + /реакционноспособная группа/-[линкер]n-[ASO]

[0276] Заякоривающий фрагмент может встраиваться в липидный бислой ВВ, например, в экзосому, обеспечивая загрузку экзосомы ASO. В настоящее время основным препятствием для коммерциализации экзосом в качестве средства доставки полярных ASO является крайне неэффективная загрузка. Это препятствие можно преодолеть путем модификации полярных ASO перед их загрузкой в экзосомы. Таким образом, как описано в данном документе, модификация ASO облегчает их загрузку в экзосомы.

[0277] Способы загрузки экзосом модифицированными полярными ASO, изложенные в данном документе, значительно улучшают эффективность загрузки по сравнению с эффективностью загрузки, о которой сообщалось ранее для введения немодифицированных ASO в экзосомы, например, с помощью электропорации или катионной липидной трансфекции.

[0278] В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ASO в по

меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9 или в по меньшей мере около 10 раз по сравнению с нативной (немодифицированной) ASO. В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ASO на по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9 или на по меньшей мере около 10 порядков относительно нативного (немодифицированного) ASO.

[0279] В некоторых аспектах модификации повышают гидрофобность ASO на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 125%, по меньшей мере около 150%, по меньшей мере около 175%, по меньшей мере около 200%, по меньшей мере около 250%, по меньшей мере около 300%, по меньшей мере около 350%, по меньшей мере около 400%, по меньшей мере около 450%, по меньшей мере около 500%, по меньшей мере около 600%, по меньшей мере около 700%, по меньшей мере около 800%, по меньшей мере около 900% или на по меньшей мере около 1000% относительно нативной (немодифицированной) ASO, например, соответствующей немодифицированной ASO. Повышение гидрофобности можно оценить с помощью любого подходящего способа. Например, гидрофобность можно определить путем измерения процентной растворимости в органическом растворителе, таком как октанол, по сравнению с растворимостью в водном растворителе, таком как вода.

[0280] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент может быть химически конъюгирован с ASO для усиления его гидрофобных свойств. В иллюстративных аспектах заякоривающий фрагмент представляет собой стерол (например, холестерин), GM1, липид, витамин, малую молекулу, пептид или их комбинацию. В некоторых аспектах фрагмент представляет собой липид. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент представляет собой стерол, например, холестерин. Дополнительные гидрофобные фрагменты включают, например, фосфолипиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или витамины (например, витамин D или витамин E).

[0281] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент конъюгирован на концах ASO либо непосредственно, либо через один или более линкеров (т.е. «концевая модификация»). В других аспектах заякоривающий фрагмент конъюгирован с другими частями ASO.

[0282] В некоторых аспектах ASO может включать обнаруживаемую метку. Примеры меток включают флуоресцентные метки и/или радиоактивные метки. В некоторых аспектах, когда ASO метят флуоресцентно, обнаруживаемой меткой может быть, например, Су3. Добавление обнаруживаемой метки к ASO можно использовать как способ мечения экзосом и отслеживания их биораспределения. В других аспектах обнаруживаемая метка может быть непосредственно присоединена к экзосомам, например, путем мечения экзосомального липида и/или экзосомального пептида.

[0283] Различные компоненты ASO (т. е. заякоривающие фрагменты, линкеры и комбинации линкеров, а также ASO) могут быть связаны амидными, сложноэфирными, эфирными, тиоэфирными, дисульфидными, фосфорамидатными, фосфотриэфирными, фосфородитионатными, метилфосфонатными, фосфодиэфирными или фосфоротионатными связями или, альтернативно, любыми другими связями.

[0284] В некоторых аспектах различные компоненты ASO могут быть соединены с помощью бифункциональных линкеров (т.е. линкеров, содержащих две функциональные группы), таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, N-4-малеимид масляной кислоты, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, йодацетоксисукцинимид, N-(4-малеимидбутилокси)сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбокспентил]иминодиуксусная кислота, N-(5-аминопентил)иминодиуксусная кислота, и тому подобное.

III.A.1. Заякоривающие фрагменты

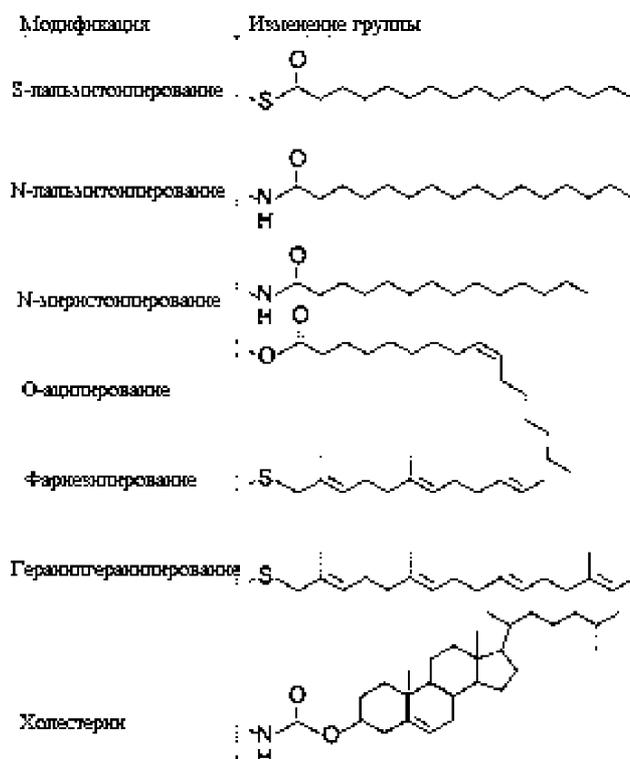
[0285] Подходящие заякоривающие фрагменты, способные заякоривать ASO на поверхности ВВ, например, экзосомы, включают, например, стеролы (например, холестерин), липиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или жирорастворимые витамины, как подробно описано ниже.

[0286] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент может представлять собой липид. Липидный заякоривающий фрагмент может представлять собой любой липид, известный из уровня техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В некоторых аспектах липид представляет собой жирную кислоту, фосфатид, фосфолипид (например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин) или их аналог (например, фосфатидилхолин, лецитин, фосфатидилэтаноламин, цефалин или их части, например, его частично гидролизованную часть).

[0287] Как правило, заякоривающие фрагменты присоединяются химическим путем. Однако заякоривающий фрагмент может быть присоединен к ASO ферментативным путем. В некоторых аспектах возможно присоединение заякоривающего фрагмента к ASO посредством модификации условий культивирования клеток. Например, при использовании культуральной среды, в которой количество миристиновой кислоты ограничено, к N-концевому глицину могут быть присоединены некоторые другие жирные кислоты, включая короткоцепочечные и ненасыщенные. Например, в каналах ВК мирилат, как сообщалось, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи.

[0288] Заякоривающий фрагмент может быть конъюгирован с ASO прямо или косвенно через комбинацию линкеров в любом химически приемлемом месте, например, на 5'- и/или 3'-конце ASO. В одном аспекте заякоривающий фрагмент конъюгирован только с 3'-концом ASO. В одном аспекте заякоривающий фрагмент конъюгирован только с 5'-концом ASO. В одном аспекте заякоривающий фрагмент конъюгирован в месте, которое не является 3'-концом или 5'-концом ASO.

[0289] Некоторые типы мембранных якорей, которые можно использовать для осуществления способов по настоящему изобретению, представлены в следующей таблице:



[0290] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать два или более типов заякоривающих фрагментов, описанных в данном документе. Например, в некоторых аспектах заякоривающий фрагмент может содержать

два липида, например, фосфолипид и жирную кислоту, или два фосфолипиды, или две жирные кислоты, или липид и витамин, или холестерин и витамин и т.д., которые совместно имеют 6-80 атомов углерода (т.е. эквивалентное число атомов углерода (ECN), равное 6-80).

[0291] В некоторых аспектах комбинация заякоривающих фрагментов, например, комбинация липидов (например, жирных кислот), имеет ECN 6-80, 8-80, 10-80, 12-80, 14-80, 16-80, 18-80, 20-80, 22-80, 24-80, 26-80, 28-80, 30-80, 4-76, 6-76, 8-76, 10-76, 12-76, 14-76, 16-76, 18-76, 20-76, 22-76, 24-76, 26-76, 28-76, 30-76, 6-72, 8-72, 10-72, 12-72, 14-72, 16-72, 18-72, 20-72, 22-72, 24-72, 26-72, 28-72, 30-72, 6-68, 8-68, 10-68, 12-68, 14-68, 16-68, 18-68, 20-68, 22-68, 24-68, 26-68, 28-68, 30-68, 6-64, 8-64, 10-64, 12-64, 14-64, 16-64, 18-64, 20-64, 22-64, 24-64, 26-64, 28-64, 30-64, 6-60, 8-60, 10-60, 12-56, 14-56, 16-56, 18-56, 20-56, 22-56, 24-56, 26-56, 28-56, 30-56, 6-52, 8-52, 10-52, 12-52, 14-52, 16-52, 18-52, 20-52, 22-52, 24-52, 26-52, 28-52, 30-52, 6-48, 8-48, 10-48, 12-48, 14-48, 16-48, 18-48, 20-48, 22-48, 24-48, 26-48, 28-48, 30-48, 6-44, 8-44, 10-44, 12-44, 14-44, 16-44, 18-44, 20-44, 22-44, 24-44, 26-44, 28-44, 30-44, 6-40, 8-40, 10-40, 12-40, 14-40, 16-40, 18-40, 20-40, 22-40, 24-40, 26-40, 28-40, 30-40, 6-36, 8-36, 10-36, 12-36, 14-36, 16-36, 18-36, 20-36, 22-36, 24-36, 26-36, 28-36, 30-36, 6-32, 8-32, 10-32, 12-32, 14-32, 16-32, 18-32, 20-32, 22-32, 24-32, 26-32, 28-32, или 30-32.

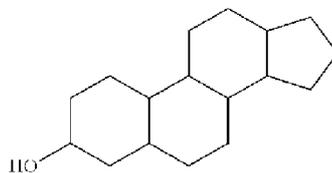
III.A.1.a. Холестерин и другие стеролы

[0292] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит стерол, стероид, гопаноид, гидроксистероид, секостероид или их аналог с липофильными свойствами. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит стерол, такой как фитостерин, микостерин или зоостерин. Иллюстративные зоостерины включают холестерин и 24S-гидроксихолестерин; иллюстративные фитостерины включают эргостерин (микостерин), кампестерин, ситостерин и стигмастерин. В некоторых аспектах стерол выбран из эргостерина, 7-дегидрохолестерина, холестерина, 24S-гидроксихолестерина, ланостерина, циклоартенола, фукостерола, сарингостерина, кампестерина, β -ситостерина, ситостанола, копростанола, авенастерола или стигмастерола. Стерины могут встречаться в виде свободных стеринов, ацилированных (сложные эфиры стеролов), алкилированных (стерилалкиловые эфиры), сульфатированных (сульфат стерола) или связанных с гликозидным фрагментом (стерилгликозиды), который сам по себе может быть ацилирован (ацилированные стерингликозиды).

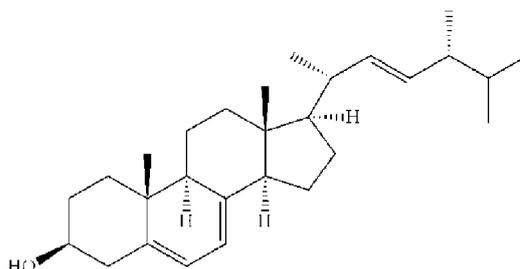
[0293] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит стероид. В

некоторых аспектах стероид выбран из дигидротестостерона, уваола, гецигенина, диосгенина, прогестерона или кортизола.

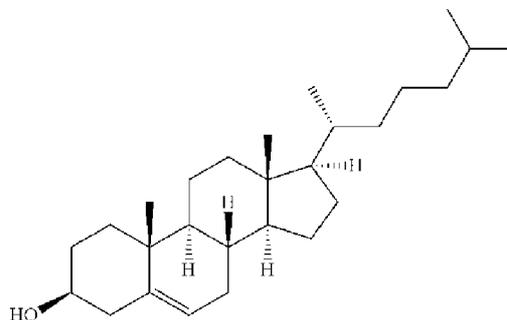
[0294] Например, стерины можно конъюгировать с ASO непосредственно или посредством комбинации линкеров в доступной группе —ОН стерола. Иллюстративные стерины имеют общий скелет, показанный ниже:



[0295] В качестве дополнительно примера: эргостерин имеет следующую структуру:



[0296] Холестерин имеет следующую структуру:



[0297] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления свободная группа —ОН стерола или стероида используется для конъюгирования ASO непосредственно или посредством комбинации линкеров, со стеролом (например, холестерином) или стероидом.

III.A.1.b. Жирные кислоты

[0298] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту с короткой, средней или длинной цепью. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой ненасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой мононенасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой полиненасыщенную жирную кислоту, такую как ω -3 (омега-3) или ω -6 (омега-6) жирная кислота.

[0299] В некоторых аспектах липид, например, жирная кислота, имеет цепь C₂-C₆₀. В некоторых вариантах осуществления липид, например, жирная кислота, имеет цепь C₂-C₂₈. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₂-C₄₀. В некоторых аспектах жирная кислота, имеет цепь C₂-C₁₂ или C₄-C₁₂. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₄-C₄₀. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₄-C₄₀, C₂-C₃₈, C₂-C₃₆, C₂-C₃₄, C₂-C₃₂, C₂-C₃₀, C₄-C₃₀, C₂-C₂₈, C₄-C₂₈, C₂-C₂₆, C₄-C₂₆, C₂-C₂₄, C₄-C₂₄, C₆-C₂₄, C₈-C₂₄, C₁₀-C₂₄, C₂-C₂₂, C₄-C₂₂, C₆-C₂₂, C₈-C₂₂, C₁₀-C₂₂, C₂-C₂₀, C₄-C₂₀, C₆-C₂₀, C₈-C₂₀, C₁₀-C₂₀, C₂-C₁₈, C₄-C₁₈, C₆-C₁₈, C₈-C₁₈, C₁₀-C₁₈, C₁₂-C₁₈, C₁₄-C₁₈, C₁₆-C₁₈, C₂-C₁₆, C₄-C₁₆, C₆-C₁₆, C₈-C₁₆, C₁₀-C₁₆, C₁₂-C₁₆, C₁₄-C₁₆, C₂-C₁₅, C₄-C₁₅, C₆-C₁₅, C₈-C₁₅, C₉-C₁₅, C₁₀-C₁₅, C₁₁-C₁₅, C₁₂-C₁₅, C₁₃-C₁₅, C₂-C₁₄, C₄-C₁₄, C₆-C₁₄, C₈-C₁₄, C₉-C₁₄, C₁₀-C₁₄, C₁₁-C₁₄, C₁₂-C₁₄, C₂-C₁₃, C₄-C₁₃, C₆-C₁₃, C₇-C₁₃, C₈-C₁₃, C₉-C₁₃, C₁₀-C₁₃, C₁₀-C₁₃, C₁₁-C₁₃, C₂-C₁₂, C₄-C₁₂, C₆-C₁₂, C₇-C₁₂, C₈-C₁₂, C₉-C₁₂, C₁₀-C₁₂, C₂-C₁₁, C₄-C₁₁, C₆-C₁₁, C₇-C₁₁, C₈-C₁₁, C₉-C₁₁, C₂-C₁₀, C₄-C₁₀, C₂-C₉, C₄-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₄-C₇, C₂-C₆ или C₄-C₆. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆, C₃₇, C₃₈, C₃₉, C₄₀, C₄₁, C₄₂, C₄₃, C₄₄, C₄₅, C₄₆, C₄₇, C₄₈, C₄₉, C₅₀, C₅₁, C₅₂, C₅₃, C₅₄, C₅₅, C₅₆, C₅₇, C₅₈, C₅₉ или C₆₀.

[0300] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит две жирные кислоты, каждая из которых независимо выбрана из жирной кислоты, имеющей цепь с любым из вышеуказанных диапазонов или числами атомов углерода. В некоторых аспектах одна из жирных кислот независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C₆-C₂₁, а другая независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C₁₂-C₃₆. В некоторых вариантах осуществления каждая жирная кислота независимо имеет цепь из 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 атомов углерода.

[0301] Подходящие жирные кислоты включают насыщенные жирные кислоты с прямой цепью, насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью, ненасыщенные жирные кислоты, гидроксигирные кислоты и поликарбонные кислоты. В некоторых аспектах такие жирные кислоты содержат до 32 атомов углерода.

[0302] Примеры применимых насыщенных жирных кислот с прямой цепью включают кислоты, которые имеют четное число атомов углерода, такие как масляная кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, каприновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, арахидоновая кислота, бегеновая кислота, лигноцериновая кислота, гексакозановая кислота, октакозановая кислота, триаконтановая кислота и н-дотриаконтановая кислота, и кислоты, которые имеют нечетное число атомов углерода, такие как пропионовая кислота, н-валериановая кислота, энантовая кислота, пеларгоновая кислота, хендекановая кислота,

тридекановая кислота, пентадекановая кислота, гептадекановая кислота, нонадекановая кислота, генейкозановая кислота, трикозановая кислота, пентакозановая кислота и гептакозановая кислота.

[0303] Примеры подходящих насыщенных разветвленных жирных кислот включают изомасляную кислоту, изокапроновую кислоту, изокаприловую кислоту, изокаприновую кислоту, изолауриновую кислоту, 11-метилдодекановую кислоту, изомиристиновую кислоту, 13-метил-тетрадекановую кислоту, изопальмитиновую кислоту, 15-метил-гексадекановую кислоту, изостеариновую кислоту, 17-метилоктадекановую кислоту, изоараховую кислоту, 19-метил-эйкозановую кислоту, α -этилгексановую кислоту, α -гексилдекановую кислоту, α -гептилундекановую кислоту, 2-децилтетрадекановую кислоту, 2-ундецилтетрадекановую кислоту, 2-децилпеновую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту и кислоту Fine Oхocol 1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.). Подходящие насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью с нечетным числом атомов углерода включают антеизо-жирные кислоты, заканчивающиеся изобутильной группой, такие как 6-метилоктановая кислота, 8-метилдекановая кислота, 10-метилдодекановая кислота, 12-метил-тетрадекановая кислота, 14-метил-гексадекановая кислота, 16-метил-октадекановая кислота, 18-метил-эйкозановая кислота, 20-метил-докозановая кислота, 22-метил-тетракозановая кислота, 24-метил-гексакозановая кислота и 26-метилоктакозановая кислота.

[0304] Примеры подходящих ненасыщенных жирных кислот включают 4-деценовую кислоту, капролеиновую кислоту, 4-додеценовую кислоту, 5-додеценовую кислоту, лауролеевую кислоту, 4-тетрадеценовую кислоту, 5-тетрадеценовую кислоту, 9-тетрадеценовую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, 6-октадеценовую кислоту, олеиновую кислоту, 9-октадеценовую кислоту, 11-октадеценовую кислоту, 9-эйкозеновую кислоту, цис-11-эйкозеновую кислоту, цетолеиновую кислоту, 13-докозеновую кислоту, 15-тетракозеновую кислоту, 17-гексакозеновую кислоту, 6,9,12,15-гексадекатетраеноую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, α -элеостеариновую кислоту, β -элеостеариновую кислоту, пуническую кислоту, 6,9,12,15-октадекатетраеновую кислоту, паринаровую кислоту, 5,8,11,14-эйкозатетраеновую кислоту, 5,8,11,14,17-эйкозопентаеновую кислоту, 7,10,13,16,19-докозопентаеновую кислоту, 4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту и т.п.

[0305] Примеры подходящих гидроксилауриновых кислот включают α -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксимиристиновую кислоту, α -гидроксипальмитиновую кислоту, α -гидроксистеариновую кислоту, ω -гидроксилауриновую кислоту, α -гидроксиарахиновую кислоту, 9-гидрокси-12-

октадеценовую кислоту, рицинолевою кислоту, α -гидроксигегеновую кислоту, 9-гидрокситранс-10,12-октадекадиеновую кислоту, камоленовую кислоту, ипуроловую кислоту, 9,10-дигидроксистеариновую кислоту, 12-гидроксистеариновую кислоту и т.п.

[0306] Примеры подходящих поликарбонновых кислот включают щавелевую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, адипиновую кислоту, пимелиновую кислоту, субериновую кислоту, азелаиновую кислоту, себациновую кислоту, D,L-яблочную кислоту и т.п.

[0307] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из пропионовой кислоты, масляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, энантовой кислоты, каприловой кислоты, пеларгоновой кислоты, каприновой кислоты, ундециловой кислоты, лауриновой кислоты, тридекановой кислоты, миристиновой кислоты, пентадекановой кислоты, пальмитиновой кислоты, маргариновой кислоты, стеариновой кислоты, нонадекановой кислоты, арахидиновой кислоты, генэйкозановой кислоты, бегеновой кислоты, трикозановой кислоты, лигноцериновой кислоты, пентакозановой кислоты, церотиновой кислоты, гептакозановой кислоты, монтановой кислоты, нонакозановой кислоты, мелиссиновой кислоты, гентриаконтановой кислоты, лацериновой кислоты, псилластеариновой кислоты, геддовой кислоты, церопластовой кислоты, гексатриаконтановой кислоты, гептатриаконтановой кислоты или октатриаконтановой кислоты.

[0308] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из α -линоленовой кислоты, стеаридиновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, линолевой кислоты, гамма-линолевой кислоты, дигомогамма-линолевой кислоты, арахидиновой кислоты, докозатетрамитилолиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, пауллиновой кислоты, олеиновой кислоты, элаидиновой кислоты, гондоиновой кислоты, эурковой кислоты, нервоновой кислоты, мидовой кислоты, адреновой кислоты, босепентаеновой кислоты, озубондовой кислоты, сардиновой кислоты, сельдевой кислоты, докозагексаеновой кислоты или тетракозанолпентаеновой или другой мононенасыщенной или полинасыщенной жирной кислоты.

[0309] В некоторых аспектах одна или обе жирные кислоты представляют собой незаменимую жирную кислоту. Принимая во внимание благоприятное воздействие на здоровье некоторых незаменимых жирных кислот, терапевтические преимущества описанных загруженных терапевтическим средством экзосом могут быть увеличены путем включения таких жирных кислот в терапевтический агент. В некоторых аспектах незаменимая жирная кислота представляет собой незаменимую жирную кислоту n-6 или n-3, выбранную из группы, состоящей из линоленовой кислоты, гамма-линоленовой кислоты,

дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, аденовой кислоты, докозапентаеновой n-6-кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеарионовой кислоты, 20:4n-3 кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозапентаеновой n-3 кислоты или докозагексаеновой кислоты.

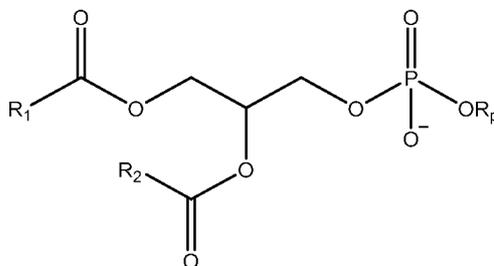
[0310] В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновой кислоты, α -линоленовой кислоты, стеарионовой кислоты, эйкозатриеновой кислоты, эйкозатетраеновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты (DHA), тетракозапентаеновой кислоты, тетракозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. В других аспектах жирная кислота выбрана из эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. Другие примеры жирных кислот включают полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновую кислоту, α -линоленовую кислоту (ALA или полностью цис-9,12,15-октадекатриеновую кислоту), стеарионовую кислоту (STD или полностью цис-6,9,12,15-октадекатетраеновую кислоту), эйкозатриеновую кислоту (ETE или полностью-цис-11,14,17-эйкозатриеновую кислоту), эйкозатетраеновую кислоту (ETA или полностью-цис-8,11,14,17-эйкозатетраеновую кислоту) , эйкозапентаеновую кислоту (EPA), докозапентаеновую кислоту (DPA, клупанодоновую кислоту или полностью цис-7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту), докозагексаеновую кислоту (DHA или полностью цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту), тетракозапентаеновую кислоту (полностью-цис-9,12,15,18,21-докозагексаеновую кислоту) или тетракозагексаеновую кислоту (низиновую кислоту или полностью-цис-6,9,12,15,18,21-тетракозеновую кислоту). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту со средней длиной цепи, такую как липоевая кислота.

[0311] Цепи жирных кислот сильно различаются по длине цепей и могут быть разделены на категории в зависимости от длины цепи, например, от короткой до очень длинной. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) представляют собой жирные кислоты с цепями из пяти или менее атомов углерода (например, масляная кислота). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой SCFA. Жирные кислоты со средней длиной цепи (MCFA) включают жирные кислоты с цепями из 6-12 атомов углерода, которые могут образовывать триглицериды со средней длиной цепи. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой MCFA. Длинноцепочечные жирные кислоты (LCFA) включают жирные кислоты с цепями из 13-21 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой LCFA. Жирные кислоты с очень длинной цепью (VLCFA) включают жирные кислоты с цепями из 22 или более атомов углерода, например, 22-60, 22-50 или 22-

40 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой VLCFA.

III.A.1.c. Фосфолипиды

[0312] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит фосфолипид. Фосфолипиды представляют собой класс липидов, которые являются основным компонентом всех клеточных мембран. Они могут образовывать липидные бислои в результате их амфифильных характеристик. Структура молекулы фосфолипида обычно состоит из двух гидрофобных «хвостов» жирных кислот и гидрофильной «головки», состоящей из фосфатной группы. Например, фосфолипид может представлять собой липид следующей формулы:



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

[0313] Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0314] Конкретные фосфолипиды могут способствовать слиянию с липидным бислоем, например, с липидным бислоем экзосомальной мембраны. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или более отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны. Слияние фосфолипида с мембраной может позволить одному или более элементам липидсодержащей композиции связываться с мембраной или проходить через мембрану.

[0315] Фрагмент жирной кислоты может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристолевой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты,

эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[0316] Фосфолипиды, используемые в качестве заякоривающих фрагментов в настоящем изобретении, могут быть природными или неприродными фосфолипидами. Также рассматриваются неприродные виды фосфолипидов, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован или сшит с одним или более алкинами (например, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемому медью циклоприсоединению при воздействии азида.

[0317] Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты.

[0318] Примеры фосфолипидов, которые можно использовать в заякоривающих фрагментах, раскрываемые в данном документе, включают

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

димиристоилфосфатидилинозитол, дипальмитоилфосфатидилинозитол,
дистеароилфосфатидилинозитол, диолеоилфосфатидилинозитол, 1-пальмитоил-2-
олеилфосфатидилинозитол, 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилинозитол и
диерукоилфосфатидилинозитол.

[0319] Фосфолипиды могут быть симметричного или асимметричного типа. В контексте данного документа термин «симметричный фосфолипид» включает глицерофосфолипиды, имеющие совпадающие фрагменты жирных кислот, и сфинголипиды, в которых фрагмент переменной жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержит сопоставимое количество атомов углерода. В контексте данного документа термин «асимметричный фосфолипид» включает лизолипиды, глицерофосфолипиды, имеющие различные фрагменты жирных кислот (например, фрагменты жирных кислот с различным числом атомов углерода и/или ненасыщенностью (например, двойными связями)), и сфинголипиды, в которых фрагмент переменной жирной кислоты и углеводородная цепь основной цепи сфингозина содержит разное количество атомов углерода (например, фрагмент переменной жирной кислоты включает по меньшей мере на два атома углерода больше, чем углеводородная цепь, или по меньшей мере на два атома углерода меньше, чем углеводородная цепь).

[0320] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид. Симметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

- 1,2-дипропионил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (03:0 PC),
- 1,2-дибутирил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (04:0 PC),
- 1,2-дипентаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (05:0 PC),
- 1,2-дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 PC),
- 1,2-дигептаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 PC),
- 1,2-диоктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 PC),
- 1,2-динонаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 PC),
- 1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (10:0 PC),
- 1,2-дибутирил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (11:0 PC, DUPC),
- 1,2-дилауроил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (12:0 PC),
- 1,2-дитридеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (13:0 PC),
- 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0 PC, DMPC),
- 1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (15:0 PC),
- 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0 PC, DPPC),
- 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (4ME 16:0 PC),

1,2-дигептадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (17:0 PC),
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 PC, DSPC),
1,2-динонадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (19:0 PC),
1,2-диарахидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:0 PC),
1,2-дигенарахидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (21:0 PC),
1,2-дибегеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:0 PC),
1,2-дитрикозаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (23:0 PC),
1,2-дилигноцериол-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:0 PC),
1,2-димиристолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ^9 -цис) PC),
1,2-димиристеаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 (Δ^9 -транс) PC),
1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ^9 -цис) PC),
1,2-дипальмителаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 (Δ^9 -транс) PC),
1,2-дипетроселеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^6 -цис) PC),
1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^9 -цис) PC, DOPC),
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 (Δ^9 -транс) PC),
1,2-дилинолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:2 (цис) PC, DLPC),
1,2-дилиноленоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:3 (цис) PC, DLnPC),
1,2-диикозеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:1 (цис) PC),
1,2-диарахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:4 (цис) PC, DAPC),
1,2-диерукоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:1 (цис) PC),
1,2-дидокозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:6 (цис) PC, DHAFC),
1,2-динервоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:1 (цис) PC),
1,2-Дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (06:0 PE),
1,2-диооктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (08:0 PE),
1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (10:0 PE),
1,2-дилауроил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (12:0 PE),
1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (14:0 PE),
1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (15:0 PE),
1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0 PE),
1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (4ME 16:0 PE),
1,2-дигептадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (17:0 PE),
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0 PE, DSPE),
1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:1 PE),
1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ^9 -цис) PE, DOPe),
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 (Δ^9 -транс) PE),

1,2-дилинолеил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламина (18:2 PE, DLPE),
1,2-дилиноленоил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламина (18:3 PE, DLnPE),
1,2-диарахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламина (20:4 PE, DAPE),
1,2-дидокозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламина (22:6 PE, DHAPE),
1,2-ди-О-октадеценил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 диэфир PC),
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевой соли (DOPG) и любой их комбинации.

[0321] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из DLPC, DMPC, DOPC, DPPC, DSPC, DUPC, 18:0 диэфира PC, DLnPC, DAPC, DHAFC, DOPE, 4ME 16:0 PE, DSPE, DLPE, DLnPE, DAPE, DHAPE, DOPG и любой их комбинации.

[0322] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит по меньшей мере один асимметричный фосфолипид. Асимметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

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

1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0-22:6 PE),
1-стеароил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-18:1 PE),
1-стеароил-2-линолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-18:2 PE),
1-стеароил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-20:4 PE),
1-стеароил-2-докозагексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0-22:6 PE),
1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (OChemsPC) и
любой их комбинации.

[0323] Для обеспечения более заметной устойчивости к нуклеазам, эффективность клеточного поглощения и более заметный эффект РНК-интерференции, в качестве заякоривающих фрагментов могут быть использованы фосфатидилэтаноламины, например, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин и диолеоилфосфатидилэтаноламин.

[0324] Сайт связывания липида (например, фосфолипида) и комбинацию линкера или ВAM, например, ASO, можно подходящим образом выбрать в соответствии с типами липида и линкера или ASO. Любое положение, отличное от гидрофобных групп липида, может быть связано с линкером или ASO посредством химической связи. Например, при использовании фосфатидилэтаноламина линкер может быть образован путем образования амидной связи и т.д. между аминогруппой фосфатидилэтаноламина и линкером или ASO. При использовании фосфатидилглицерина линкер может быть образован путем образования сложноэфирной связи, эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка глицерина и линкером или ASO. При использовании фосфатидилсерина линкер может быть образован путем образования амидной связи или сложноэфирной связи и т.д. между аминогруппой или карбоксильной группой остатка серина и линкером или ASO. При использовании фосфатидной кислоты линкер может быть образован путем образования фосфоэфирной связи и т.д. между фосфатным остатком и линкером или ASO. При использовании фосфатидилинозитола линкер может быть образован путем образования сложноэфирной связи, эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка инозитола и линкером или ASO.

III.A.1.d. Лизолипиды (например, лизофосфолипиды)

[0325] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит лизолипид, например, лизофосфолипид. Лизолипиды представляют собой производные липида, в котором одна или обе жирные ацильные цепи удалены, как правило, путем гидролиза.

Лизофосфолипиды представляют собой производные фосфолипидов, в которых одна или обе ацильные цепи жирной кислоты удалены путем гидролиза.

[0326] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит любой из фосфолипидов, описанных выше, в которых одна или обе ацильные цепи были удалены путем гидролиза, и, следовательно, полученный лизофосфолипид содержит одну ацильную цепь жирной кислоты или не содержит ее.

[0327] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол или лизофосфатидилсерин.

[0328] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит лизолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из

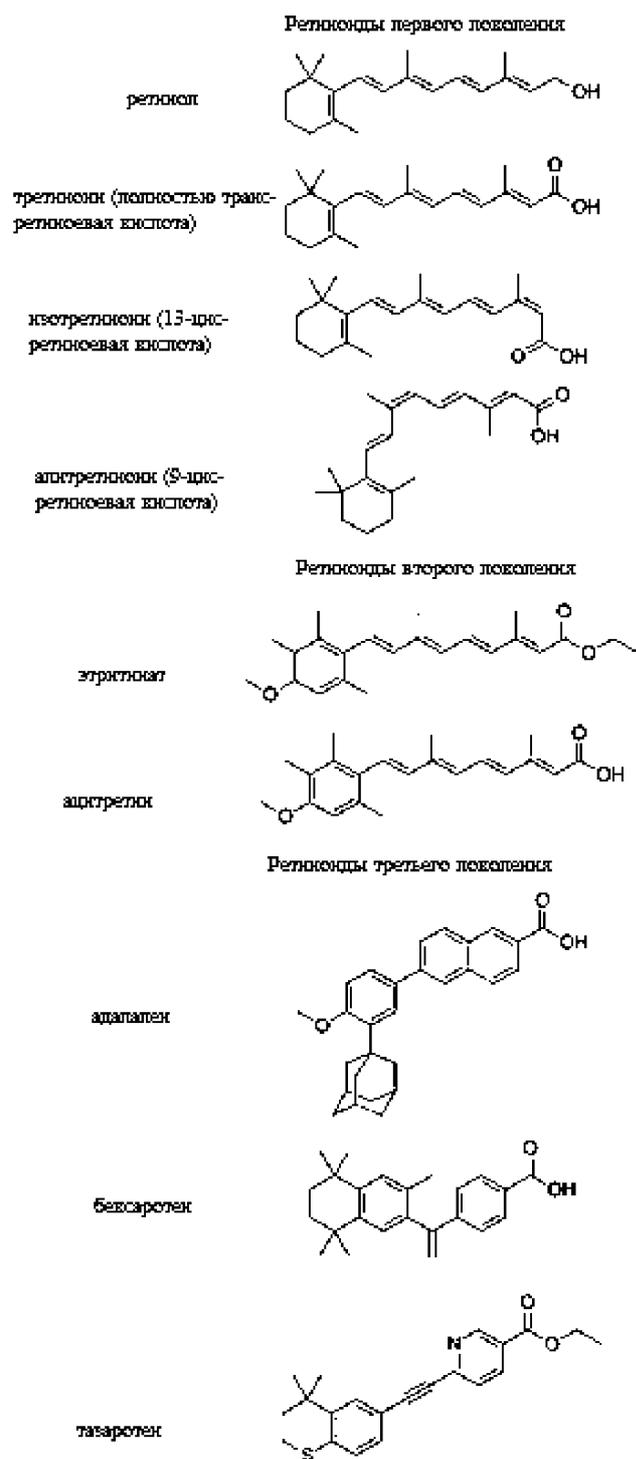
1-гексаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 лизо PC),
1-гептаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 лизо PC),
1-октаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 лизо PC),
1-нонаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 лизо PC),
1-деканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (10:0 лизо PC),
1-ундеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (11:0 лизо PC),
1-лауроил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (12:0 лизо PC),
1-тридеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (13:0 лизо PC),
1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:0 лизо PC),
1-пентадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (15:0 лизо PC),
1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:0 лизо PC),
1-гептадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (17:0 лизо PC),
1-стеароил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:0 лизо PC),
1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 лизо PC),
1-нонадеканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (19:0 лизо PC),
1-арахидоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (20:0 лизо PC),
1-бегеноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (22:0 лизо PC),
1-лигноцериол-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:0 лизо PC),
1-гексакозаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (26:0 лизо PC),
1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (14:0 лизо PE),
1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (16:0 лизо PE),
1-стеароил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (18:0 лизо PE),
1-олеоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (18:1 лизо PE),
1-гексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (C16 лизо PC), и

любой их комбинации.

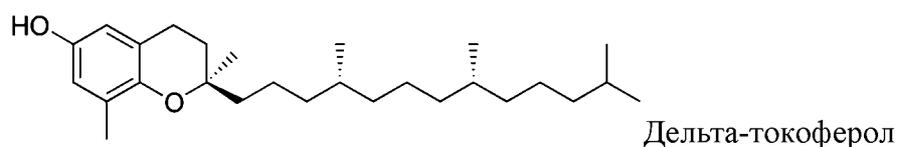
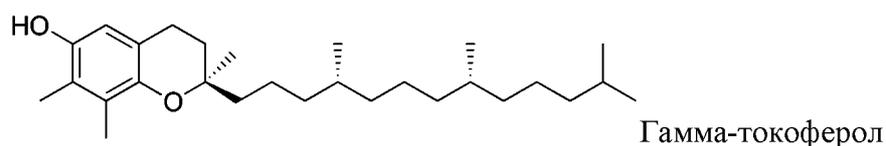
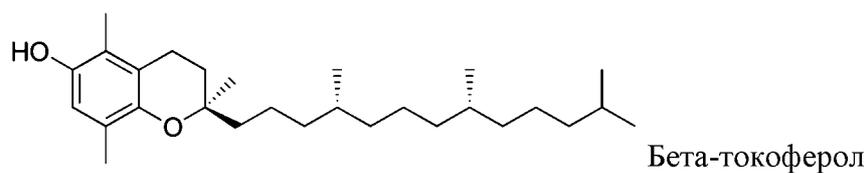
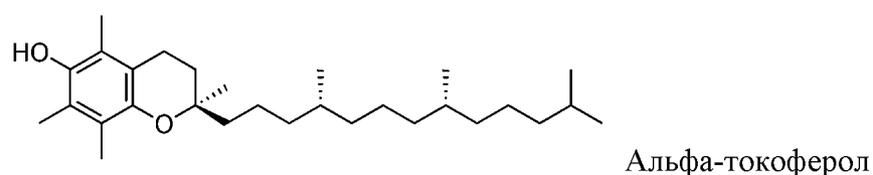
III.A.1.e. Витамины

[0329] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит липофильный витамин, например, фолиевую кислоту, витамин А, витамин Е или витамин К

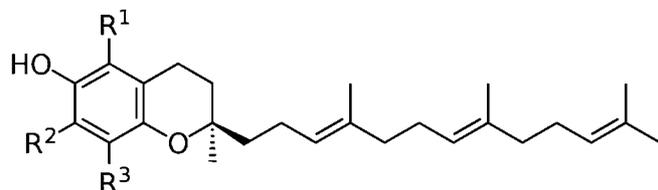
[0330] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит витамин А. Витамин А представляет собой группу ненасыщенных пищевых органических соединений, которая включает ретинол, ретиналь, ретиноевую кислоту и несколько каротиноидов провитамина А (в первую очередь, бета-каротин). В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит ретинол. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит ретиноид. Ретиноиды представляют собой класс химических соединений, которые являются витамерами витамина А или химически связаны с ним. В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит ретиноид первого поколения (например, ретинол, третиноин, изотреатиноин или алитретиноин), ретиноид второго поколения (например, этретинат или ацитретин), ретиноид третьего поколения (например, адапален, бексаротен, или тазаротен) или любую их комбинацию.



[0331] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит витамин Е. Токоферолы представляют собой класс метилированных фенолов, многие из которых обладают активностью витамина Е. Таким образом, в некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол или их комбинацию.



[0332] Токотриенолы также обладают активностью витамина Е. Критическое химическое структурное различие между токотриенолами и токоферолами состоит в том, что токотриенолы имеют ненасыщенную изопреноидную боковую цепь с тремя углерод-углеродными двойными связями по сравнению с насыщенными боковыми цепями токоферолов. В некоторых аспектах закоривающий фрагмент содержит альфа-токотриенол, бета-токотриенол, гамма-токотриенол, дельта-токотриенол или их комбинацию. Токотриенолы могут быть представлены следующей формулой



альфа(α)-Токотриенол: R1 = Me, R2 = Me, R3 = Me;

бета(β)-Токотриенол: R1 = Me, R2 = H, R3 = Me;

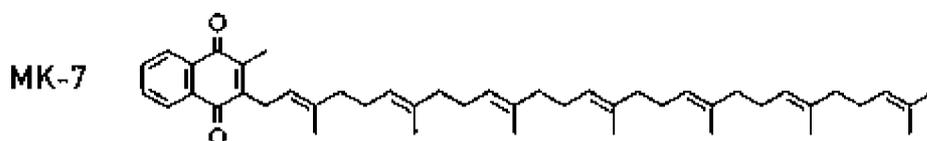
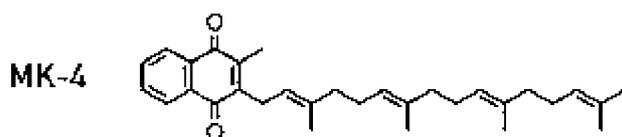
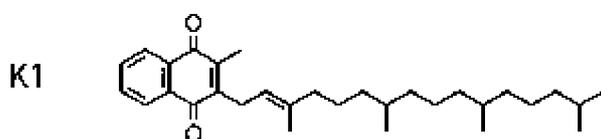
гамма(γ)-Токотриенол: R1 = H, R2 = Me, R3 = Me;

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

[0333] В некоторых аспектах закоривающий фрагмент содержит витамин К. По химическому составу семейство витаминов К включает производные 2-метил-1,4-нафтохинона (3-). Витамин К включает два натуральных витамина: витамин К₁ и витамин К₂. В структуре витамина К₁ (также известного как фитонадион, филлохинон или (Е)-фитонадион) присутствует фитильная группа. Структуры витамина К₂ (менахиноны) отмечены полиизопренильной боковой цепью, присутствующей в молекуле, которая может содержать от шести до 13 изопренильных единиц. Таким образом, витамин К₂ состоит из

ряда связанных химических подтипов с различной длиной боковых углеродных цепей, состоящих из изопреноидных групп атомов. МК-4 представляет собой наиболее распространенную форму витамина К₂. Формы с длинной цепью, такие как МК-7, МК-8 и МК-9, преобладают в ферментированных продуктах. Формы витамина К₂ с более длинной цепью, такие как МК-10-МК-13, синтезируются бактериями, но они плохо всасываются и не обладают достаточной биологической функцией. Помимо естественных форм витамина К, существует ряд синтетических форм витамина К, таких как витамин К₃ (менадион; 2-метилнафталин-1,4-дион), витамин К₄ и витамин К₅.

[0334] Соответственно, в некоторых аспектах заякоривающий фрагмент содержит витамин К₁, К₂ (например, МК-4, МК-5, МК-6, МК-7, МК-8, МК-9, МК-10, МК-11, МК-12 или МК-13), К₃, К₄, К₅ или любую их комбинацию.



III.A.2. Комбинации линкеров

[0335] В некоторых аспектах ASO связан с гидрофобным заякоривающим в мембрану фрагментом, описанным в данном документе, посредством комбинации линкеров, которая может содержать любую комбинацию расщепляемых и/или нерасщепляемых линкеров. Основная функция комбинации линкеров заключается в обеспечении оптимального расстояния между заякоривающим фрагментом или фрагментами и ВАРМ-мишенью. Например, в случае ASO комбинация линкеров должна уменьшать стерические затруднения и позиционировать ASO так, чтобы она могла взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой, например, мРНК или микроРНК.

[0336] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы.

Таким образом, в некоторых аспектах описанная в данном документе комбинация линкеров может содержать расщепляемый линкер. Такие расщепляемые линкеры могут быть чувствительны, например, к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых биологически активная молекула остается активной. В качестве альтернативы линкеры могут быть по сути устойчивыми к расщеплению («нерасщепляемый линкер»). В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит спейсер. В некоторых аспектах спейсер представляет собой PEG.

[0337] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 или более различных линкеров, раскрытых в данном документе. В некоторых аспектах линкеры в комбинации линкеров могут быть связаны сложноэфирной связью (например, фосфодиэфиром или сложным эфиром фосфоротиоата).

[0338] В некоторых аспектах линкер представляет собой прямую связь между заякоривающим фрагментом и ВАР, например, АSO.

III.A.2.a. Нерасщепляемые линкеры

[0339] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит «нерасщепляемый линкер». Нерасщепляемые линкеры представляют собой любой химический фрагмент, способный связывать два или более компонентов модифицированной биологически активной молекулы по настоящему изобретению (например, биологически активную молекулу и заякоривающий фрагмент; биологически активную молекулу и расщепляемый линкер; заякоривающий фрагмент и расщепляемый линкер) стабильным ковалентным образом и не попадает в категории, перечисленные выше для расщепляемых линкеров. Таким образом, нерасщепляемые линкеры по сути устойчивы к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи.

[0340] Кроме того, термин нерасщепляемый относится к способности химической связи в линкере или примыкающего к линкеру участка противостоять расщеплению, индуцированному кислотой, агентом, расщепляющим фотолabile соединения, пептидазой, эстеразой или химическим или физиологическим соединением, которое расщепляет дисульфидную связь в условиях, при которых циклический динуклеотид и/или

антитело не теряют своей активности. В некоторых аспектах биологически активная молекула присоединяется к линкеру посредством другого линкера, например, саморасщепляющегося линкера.

[0341] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит нерасщепляемый линкер, содержащий, например, тетраэтиленгликоль (TEG), гексаэтиленгликоль (HEG), полиэтиленгликоль (PEG), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером.

[0342] В некоторых аспектах один или несколько нерасщепляемых линкеров содержат более мелкие единицы (например, HEG, TEG, глицерин, C2-C12-алкил и т.п.), связанные вместе. В одном аспекте связь представляет собой сложноэфирную связь (например, сложный эфир фосфодиэфира или фосфоротиоата) или другую связь.

III.A.2.b. Этиленгликоли (HEG, TEG, PEG)

[0343] В некоторых аспектах комбинация линкеров представляет собой нерасщепляемый линкер, при этом нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (PEG), характеризуемый формулой $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$, при этом R^3 представляет собой водород, метил или этил, а n имеет значение от 2 до 200. В некоторых аспектах линкер содержит спейсер, при этом спейсер представляет собой PEG.

[0344] В некоторых аспектах линкер PEG представляет собой линкер на основе олигоэтиленгликоля, например, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, тетраэтиленгликоля (TEG), пентаэтиленгликоля или гексаэтиленгликоля (HEG).

[0345] В некоторых аспектах n имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0346] В некоторых аспектах n составляет от 2 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30

до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 100 до 110, от 110 до 120, от 120 до 130, от 130 до 140, от 140 до 150, от 150 до 160, от 160 до 170, от 170 до 180, от 180 до 190 или от 190 до 200.

[0347] В некоторых конкретных аспектах n имеет значение от 3 до 200, от 3 до 20, от 10 до 30 или от 9 до 45.

[0348] В некоторых аспектах PEG представляет собой разветвленный PEG. Разветвленные PEG содержат от трех до десяти цепей PEG, исходящих из центральной группы ядра.

[0349] В определенных вариантах осуществления фрагмент PEG представляет собой монодисперсный полиэтиленгликоль. В контексте настоящего изобретения монодисперсный полиэтиленгликоль (mdPEG) представляет собой PEG, который имеет одну заданную длину цепи и молекулярную массу. mdPEG обычно получают путем выделения из смеси для полимеризации с помощью хроматографии. В определенных формулах монодисперсный фрагмент PEG обозначается аббревиатурой mdPEG.

[0350] В некоторых аспектах PEG представляет собой звездчатый PEG. Звездчатые PEG содержат от 10 до 100 цепей PEG, исходящих из центральной группы ядра.

[0351] В некоторых аспектах PEG представляет собой гребенчатый PEG. Гребенчатые PEG имеют несколько цепей PEG, обычно привитых к остову полимера.

[0352] В определенных аспектах PEG имеет молярную массу от 100 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 100 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 100 г/моль до 2000 г/моль. В определенных аспектах PEG имеет молярную массу от 200 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 300 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 400 г/моль до 2000 г/моль.

[0353] В некоторых аспектах PEG представляет собой PEG₁₀₀, PEG₂₀₀, PEG₃₀₀, PEG₄₀₀, PEG₅₀₀, PEG₆₀₀, PEG₇₀₀, PEG₈₀₀, PEG₉₀₀, PEG₁₀₀₀, PEG₁₁₀₀, PEG₁₂₀₀, PEG₁₃₀₀, PEG₁₄₀₀, PEG₁₅₀₀, PEG₁₆₀₀, PEG₁₇₀₀, PEG₁₈₀₀, PEG₁₉₀₀, PEG₂₀₀₀, PEG₂₁₀₀, PEG₂₂₀₀, PEG₂₃₀₀, PEG₂₄₀₀, PEG₂₅₀₀, PEG₁₆₀₀, PEG₁₇₀₀, PEG₁₈₀₀, PEG₁₉₀₀, PEG₂₀₀₀, PEG₂₁₀₀, PEG₂₂₀₀, PEG₂₃₀₀, PEG₂₄₀₀, PEG₂₅₀₀, PEG₂₆₀₀, PEG₂₇₀₀, PEG₂₈₀₀, PEG₂₉₀₀ или PEG₃₀₀₀. В одном конкретном аспекте PEG представляет собой PEG₄₀₀. В другом конкретном аспекте PEG представляет собой PEG₂₀₀₀.

[0354] В некоторых аспектах комбинация линкеров по настоящему изобретению может содержать несколько линкеров на основе PEG, например, расщепляемый линкер, фланкированный линкерами на основе PEG, HEG или TEG.

[0355] В некоторых аспектах линкер содержит (HEG) n и/или (TEG) n , при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством сложноэфирного фосфатного линкера, сложноэфирной фосфоротиоатной

связи или их сочетания.

III.A.2.c. Глицерин и полиглицерины (PG)

[0356] В некоторых аспектах комбинация линкеров представляет собой нерасщепляемый линкер, содержащий глицериновое звено или полиглицерин (PG), которые описываются формулой $((R^3-O-(CH_2-CHOH-CH_2O)_n-)$, где R^3 представляет собой водород, метил или этил, а n имеет значение от 3 до 200. В некоторых аспектах n имеет значение от 3 до 20. В некоторых аспектах n имеет значение от 10 до 30.

[0357] В некоторых аспектах линкер на основе PG представляет собой линкер на основе диглицерина, триглицерина, тетраглицерина (TG), пентаглицерина или гексаглицерина (HG).

[0358] В некоторых аспектах n имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0359] В некоторых аспектах n составляет от 2 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 100 до 110, от 110 до 120, от 120 до 130, от 130 до 140, от 140 до 150, от 150 до 160, от 160 до 170, от 170 до 180, от 180 до 190 или от 190 до 200.

[0360] В некоторых альтернативах этих вариантов осуществления n имеет значение от 9 до 45. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой разветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, при этом R^5 представляет собой водород или линейную цепь глицерина, описываемую формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOH-CH_2-O)_n-)$ и R^3 представляет собой водород, метил или этил. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой гиперразветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, при этом R^5 представляет собой водород или глицериновую цепь,

описываемую формулой ($R^3-O-(CH_2-CHOR^6-CH_2-O)_n-$), при этом R^6 представляет собой водород или цепь глицерина, описываемую формулой ($R^3-O-(CH_2-CHOR^7-CH_2-O)_n-$), при этом R^7 представляет собой водород или линейную цепь глицерина, описываемую формулой ($R^3-O-(CH_2-CHOH-CH_2-O)_n-$) и R^3 представляет собой водород, метил или этил. Гиперразветвленный глицерин и способы его синтеза описаны в Oudshorn et al. (2006) *Biomaterials* 27:5471-5479; Wilms et al. (2010) *Acc. Chem. Res.* 43, 129-41 и литературных источниках, цитируемые в данном документе.

[0361] В определенных аспектах PG имеет молярную массу от 100 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 100 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 100 г/моль до 2000 г/моль. В определенных аспектах PG имеет молярную массу от 200 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 300 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 400 г/моль до 2000 г/моль.

[0362] В некоторых аспектах PG представляет собой PG₁₀₀, PG₂₀₀, PG₃₀₀, PG₄₀₀, PG₅₀₀, PG₆₀₀, PG₇₀₀, PG₈₀₀, PG₉₀₀, PG₁₀₀₀, PG₁₁₀₀, PG₁₂₀₀, PG₁₃₀₀, PG₁₄₀₀, PG₁₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₂₆₀₀, PG₂₇₀₀, PG₂₈₀₀, PG₂₉₀₀ или PG₃₀₀₀. В одном конкретном аспекте PG представляет собой PG₄₀₀. В другом конкретном аспекте PG представляет собой PG₂₀₀₀.

[0363] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит (глицерин)_n и/или (HG)_n и/или (TG)_n, при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством сложноэфирного фосфатного линкера, сложноэфирной фосфоротиоатной связи или их сочетания.

III.A.2.d. Алифатические (алкильные) линкеры

[0364] В некоторых аспектах комбинация линкеров представляет собой по меньшей мере один алифатический (алкильный) линкер, например, пропил, бутил, гексил или C2-C12 алкил, такой как C2-C10 алкил или C2-C6 алкил.

[0365] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит алкильную цепь, например, незамещенный алкил. В некоторых аспектах линкерная комбинация содержит замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил,

алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкенилилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил или алкенилгетероциклилалкенил.

[0366] Необязательно эти компоненты могут быть заменены. Заместители включают спирт, алкокси (такой как метокси, этокси и пропокси), алкил с прямой или разветвленной цепью (такой как C1-C12 алкил), амин, аминоксил (такой как аминок C1-C12 алкил), фосфорамидит, фосфат, фосфорамидат, фосфородитиоат, тиофосфат, гидразид, гидразин, галоген (такой как F, Cl, Br или I), амид, алкиламид (такой как амид C1-C12 алкил), карбоновая кислота, сложный эфир карбоновой кислоты, ангидрид карбоновой кислоты, галогенид карбоновой кислоты, простой эфир, сульфониалгалогенид, имидатный эфир, изоцианат, изотиоцианат, галоформиат, карбодиимидный аддукт, альдегиды, кетон, сульфгидрил, галогенацетил, алкилгалогенид, алкилсульфонат, C(=O)CH=CHC(=O) (малеимид), тиоэфир, циано, сахар (такой как, манноза, галактоза и глюкоза), α,β -ненасыщенный карбонил, алкилртутиевый или α,β -ненасыщенный сульфен.

[0367] Термин «алкил», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, углеводородный радикал с прямой или разветвленной цепью, имеющий обозначенное число атомов углерода (*например*, C₁-C₁₀ означает от одного до восьми атомов углерода). Обычно алкильная группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода, от 1 до 8 атомов углерода или от 1 до 6 атомов углерода. Группа «низший алкил» представляет собой алкильную группу, имеющую от 1 до 4 атомов углерода. Термин «алкил» включает двух- и мновалентные радикалы. Например, термин «алкил» включает «алкилен», где это *уместно, например*, когда формула указывает, что алкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца. Примеры алкильных радикалов включают, но не ограничиваясь ими, метил, этил, *n*-пропил, *изо*-пропил, *n*-бутил, *трет*-бутил, *изо*-бутил, *втор*-бутил, а также гомологи и изомеры, например, *n*-пентила, *n*-гексила, *n*-гептила и *n*-октила.

[0368] Термин «алкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную (бисрадикальную) алкильную группу, в которой алкил определен в данном документе. Примером «алкилена» является, но не ограничиваясь им, -CH₂CH₂CH₂CH₂-. Обычно «алкиленовая» группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, например, 10 или

меньше атомов углерода (*например*, от 1 до 8 или от 1 до 6 атомов углерода). Группа «низший алкилен» представляет собой группу алкилена, содержащую от 1 до 4 атомов углерода.

[0369] Термин «алкенил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 2 до 24 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. Типичная алкенильная группа имеет от 2 до 10 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. В одном варианте осуществления алкенильные группы содержат от 2 до 8 атомов углерода или от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 двойных связей. Примеры алкенильных групп включают винил, 2-пропенил, 1-бут-3-енил, кротил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), 2-изопентенил, 1-пент-3-енил, 1-гекс-5-енил и т.п.

[0370] Термин «алкинил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к ненасыщенному или полиненасыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 2 до 24 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Типичная «алкинильная» группа имеет от 2 до 10 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. В одном аспекте данного изобретения алкинильные группы содержат от 2 до 6 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Примеры алкинильных групп включают проп-1-инил, проп-2-инил (*т.е.* пропаргил), этинил и 3-бутинил.

[0371] Термины «алкокси», «алкиламино» и «алкилтио» (или тиоалкокси) используются в их общепринятом смысле и относятся к алкильным группам, которые присоединены к остальной части молекулы посредством атома кислорода, аминогруппы или атома серы соответственно.

[0372] Термин «гетероалкил» по себе или в сочетании с другим термином означает стабильный углеводородный радикал с прямой или разветвленной цепью, состоящий из указанного числа атомов углерода (*например*, C₂-C₁₀ или C₂-C₈) и по меньшей мере одного гетероатома, выбранные, *например*, из N, O, S, Si, B и P (в одном варианте осуществления, N, O и S), где атомы азота, серы и фосфора необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован (кватернизованы). Гетероатом(-ы) помещен/помещены в любое внутреннее положение гетероалкильной группы. Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваясь ими, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -CH₂-Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ и -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. До двух гетероатомов могут быть последовательными, например, -CH₂-NH-OCH₃ и -CH₂-O-Si(CH₃)₃.

[0373] Аналогично термин «гетероалкилен» сам по себе или как часть другого

заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как проиллюстрировано, но без ограничения ими, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Обычно гетероалкильная группа будет иметь от 3 до 24 атомов (углерод и гетероатомы, за исключением водорода) (3-24-членный гетероалкил). В другом примере гетероалкильная группа содержит всего от 3 до 10 атомов (3-10-членный гетероалкил) или от 3 до 8 атомов (3-8-членный гетероалкил). Термин «гетероалкил» включает «гетероалкилен», где это уместно, *например*, когда формула указывает, что гетероалкильная группа является двухвалентной, или когда заместители соединяются с образованием кольца.

[0374] Термин «циклоалкил» сам по себе или в сочетании с другими терминами представляет собой насыщенный или ненасыщенный, неароматический карбоциклический радикал, имеющий от 3 до 24 атомов углерода, например, содержащий от 3 до 12 атомов углерода (*например*, C_3-C_8 циклоалкил или C_3-C_6 циклоалкил). Примеры циклоалкила включают, но без ограничения ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Термин «циклоалкил» также включает мостиковые, полициклические (*например*, бициклические) структуры, такие как норборнил, адамантил и бицикло[2.2.1]гептил. «Циклоалкильная» группа может быть конденсирована по меньшей мере с одним (*например*, от 1 до 3) другим кольцом, выбранным из арильного (*например*, фенильного), гетероарильного (*например*, пиридинильного) и неароматического (*например*, карбоциклического или гетероциклического) колец. Когда «циклоалкильная» группа включает конденсированное арильное, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, тогда «циклоалкильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством карбоциклического кольца.

[0375] Термин «гетероциклоалкил», «гетероциклический», «гетероцикл» или «гетероциклил» сам по себе или в сочетании с другими терминами представляет собой карбоциклическое неароматическое кольцо (*например*, 3-8-членное кольцо и, например, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо), содержащее по меньшей мере от одного до 5 гетероатомов, выбранных, *например*, из N, O, S, Si, B и P (например, N, O и S), при этом атомы азота, серы и фосфора необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован (кватернизованы) (*например*, от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы), или конденсированную кольцевую систему из 4-8 членных кольца, содержащих по меньшей мере от одного до 10 гетероатомов (*например*, от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из N, O и S) в стабильных комбинациях, известных специалистам в данной области. Примеры гетероциклоалкильных групп включают конденсированное фенильное кольцо. Когда «гетероциклическая» группа включает конденсированное арильное, гетероарильное

или циклоалкильное кольцо, тогда «гетероциклическая» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством гетероцикла. Гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остальной части молекулы.

[0376] Иллюстративные гетероциклоалкильные или гетероциклические группы по настоящему изобретению включают морфолинил, тиоморфолинил, тиоморфолинил S-оксид, тиоморфолинил S,S-диоксид, пиперазинил, гомопиперазинил, пирролидинил, пирролинил, имидазолидинил, тетрагидропиранил, пиперидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пиперидинил, гомопиперидинил, гомоморфолинил, гомотиоморфолинил, гомотиоморфолинил S,S-диоксид, оксазолидинонил, дигидропиразолил, дигидропирролил, дигидропиразолил, дигидропиридил, дигидропиримидинил, дигидрофурил, дигидропиранил, тетрагидротиенил S-оксид, тетрагидротиенил S,S-оксид, гомотиоморфолинил S-оксид, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и т.п.

[0377] Под «арилом» подразумевается 5-, 6- или 7-членная ароматическая карбоциклическая группа, имеющая одно кольцо (*например*, фенил), или конденсированная с другими ароматическими или неароматическими кольцами (*например*, от 1 до 3 других колец). Когда «арильная» группа содержит неароматическое кольцо (*например*, в 1,2,3,4-тетрагидронафтиле) или гетероарильную группу, тогда «арильная» группа связана с остальной частью молекулы посредством арильного кольца (*например*, фенильного кольца). Арильная группа необязательно замещена (*например*, от 1 до 5 заместителей, описанных в данном документе). В одном примере арильная группа содержит от 6 до 10 атомов углерода. Неограничивающие примеры арильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, хинолин, инданил, инденил, дигидронафтил, флуоренил, тетралинил, бензо[d][1,3]диоксолил или 6,7,8,9-тетрагидро-5H-бензо[a]циклогептенил. В одном варианте осуществления арильная группа выбрана из фенила, бензо[d][1,3]диоксолила и нафтила. Арильная группа в еще одном варианте осуществления представляет собой фенил.

[0378] Термин «арилалкил» или «аралкил» предназначен для включения тех радикалов, в которых арильная группа или гетероарильная группа присоединена к алкильной группе с образованием радикалов -алкиларил и -алкилгетероарил, где алкил, арил и гетероарил определены в данном документе. Иллюстративные «арилалкильные» или «аралкильные» группы включают бензил, фенетил, пиридилметил и т.п.

[0379] Под «арилокси» подразумевается группа -O-арил, где арил имеет значения, указанные в данном документе. В одном примере арильная часть арилоксигруппы

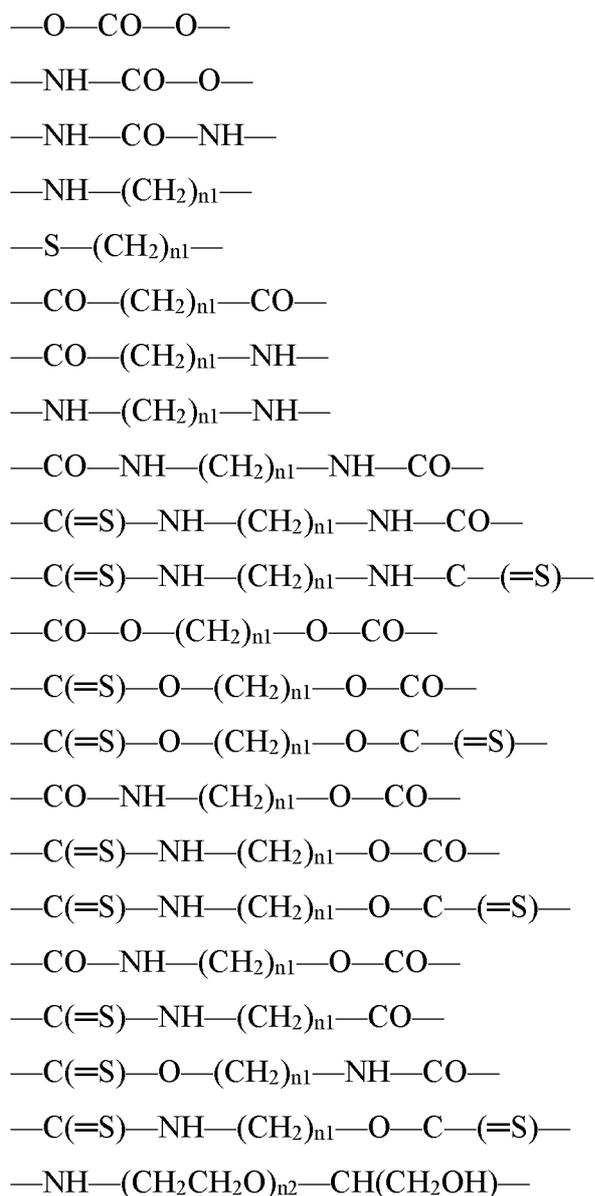
представляет собой фенил или нафтил. Арильная часть арилокси группы в одном аспекте представляет собой фенил.

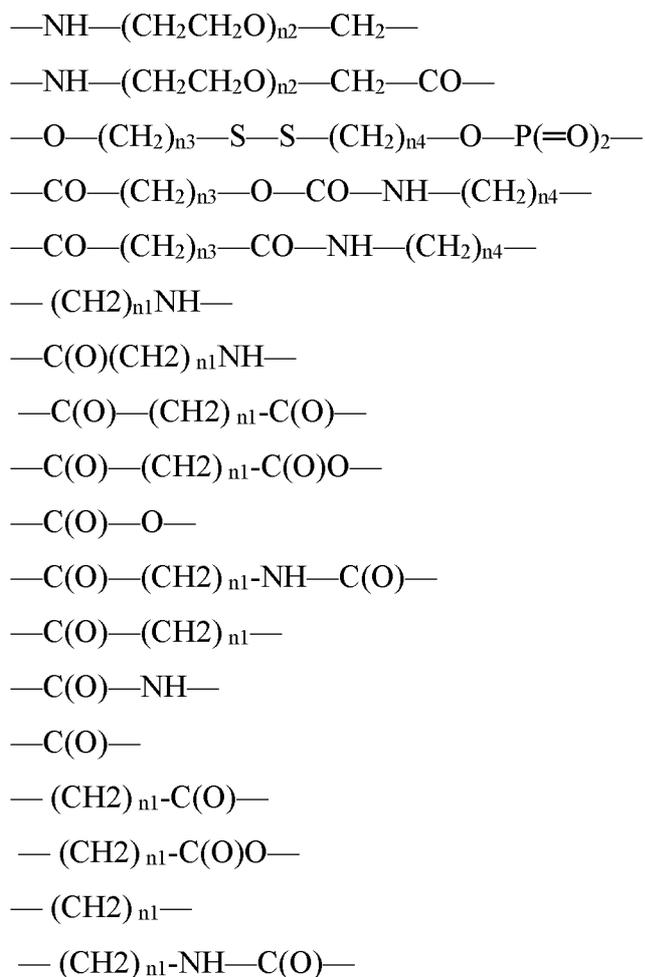
[0380] Термин «гетероарильный» или «гетероароматический» относится к полиненасыщенному, 5-, 6- или 7-членному ароматическому фрагменту, содержащему по меньшей мере один гетероатом (*например*, от 1 до 5 гетероатомов, таких как 1-3 гетероатома), выбранных из N, O, S, Si и B (*например*, N, O и S), где атомы азота и серы необязательно окислены, а атом (атомы) азота необязательно кватернизован (кватернизованы). «Гетероарильная» группа может представлять собой одно кольцо или быть конденсированной с другими арильными, гетероарильными, циклоалкильными или гетероциклоалкильными кольцами (*например*, от 1 до 3 других колец). Когда «гетероарильная» группа содержит конденсированное арильное, циклоалкильное или гетероциклоалкильное кольцо, тогда «гетероарильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством гетероарильного кольца. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы посредством атома углерода или гетероатома.

[0381] В одном примере гетероарильная группа имеет от 4 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из O, S и N. Неограничивающие примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиримидинил, хинолинил, бензотиенил, индолил, индолинил, пиридазинил, пиазинил, изоиндолил, изохинолил, хиназолинил, хиноксалинил, фталазинил, имидазолил, изоксазолил, пиазолил, оксазолил, тиазолил, индолизинил, индазолил, бензотиазолил, бензимидазолил, бензофуранил, фуранил, тиенил, пирролил, оксадиазолил, тиадиазолил, триазолил, тетразолил, изотиазолил, нафтиридинил, изохроманил, хроманил, тетрагидроизохинолинил, изоиндолинил, изобензотетрагидрофуранил, изобензотетрагидротииенил, изобензотиенил, бензоксазолил, пиридопиридил, бензотетрагидрофуранил, бензотетрагидротииенил, пуринил, бензодиоксолил, триазинил, птеридинил, бензотиазолил, имидазопиридил, имидазотиазолил, дигидробензизоксазинил, бензизоксазинил, бензоксазинил, дигидробензизотиазинил, бензопиранил, бензотиопиранил, хромонил, хроманонил, пиридил-N-оксид, тетрагидрохинолинил, дигидрохинолинил, дигидрохинолинонил, дигидроизохинолинонил, дигидрокумаринил, дигидроизокумаринил, изоиндолинонил, бензодиоксанил, бензоксазолинонил, пирролил N-оксид, пиримидинил N-оксид, пиридазинил N-оксид, пиазинил N-оксид, хинолинил N-оксид, индолил N-оксид, индолинил N-оксид, изохинолил N-оксид, хиназолинил N-оксид, хиноксалинил N-оксид, фталазинил N-оксид, имидазолил N-оксид, изоксазолил N-оксид, оксазолил N-оксид, тиазолил N-оксид, индолизинил N-оксид, индазолил N-оксид, бензотиазолил N-оксид, бензимидазолил N-оксид, пирролил N-оксид, оксадиазолил N-оксид, тиадиазолил N-оксид,

триазолил N-оксид, тетразолил N-оксид, бензотиопиранил S-оксид, бензотиопиранил S,S-диоксид. Иллюстративные гетероарильные группы включают имидазолил, пиразолил, тиadiaзолил, триазолил, изоксазолил, изотиазолил, имидазолил, тиазолил, оксадиазолил и пиридил. Другие иллюстративные гетероарильные группы включают 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, пиридин-4-ил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из вышеупомянутых арильных и гетероарильных кольцевых систем выбраны из группы приемлемых заместителей арильной группы, описанной ниже.

[0382] Примеры алифатических линкеров включают следующие структуры:





n_1 представляет собой целое число от 1 до 40 (например, от 2 до 20 или от 2 до 12); n_2 представляет собой целое число от 1 до 20 (например, от 1 до 10 или от 1 до 6); n_3 и n_4 могут быть одинаковыми или разными и представлять собой целое число от 1 до 20 (например, от 1 до 10 или от 1 до 6).

[0383] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит $(C_3)_n$, $(C_4)_n$, $(C_5)_n$, $(C_6)_n$, $(C_7)_n$ или $(C_8)_n$, или их комбинацию, где n представляет собой целое число от 1 и 50, и каждая единица связана, например, посредством сложноэфирного фосфатного линкера, сложноэфирной фосфоротиоатной связи или их комбинации.

III.A.3. Расщепляемые линкеры

[0384] В некоторых аспектах различные компоненты ASO, описанные в данном документе, могут быть линкером с помощью расщепляемого линкера. Термин «расщепляемый линкер» относится к линкеру, содержащему по меньшей мере одну связь или химическую связь, которая может быть разорвана или расщеплена. В контексте данного документа термин «расщепление» относится к разрыву одной или нескольких химических

связей в относительно большой молекуле таким образом, что образуются две или несколько молекул относительно меньшего размера. Расщепление может быть опосредовано, например, нуклеазой, пептидазой, протеазой, фосфатазой, оксидазой или редуктазой, например, или конкретными физико-химическими условиями, например окислительно-восстановительной средой, рН, присутствием активных форм кислорода или определенными длинами волн света.

[0385] В некоторых аспектах термин «расщепляемый» в контексте данного документа относится, например, к быстро разлагаемым линкерам, таким как, например, фосфодизфир и дисульфиды, тогда как термин «нерасщепляемый» относится, например, к более стабильным связям, таким как, например, устойчивые к нуклеазам фосфоротиаты.

[0386] В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой динуклеотидный или тринуклеотидный линкер, дисульфид, имин, тиокеталь, дипептид val-cit или любую их комбинацию.

[0387] В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

III.A.3.a. Редокс-расщепляемые линкеры

[0388] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает редокс-расщепляемый линкер. В качестве неограничивающего примера одним типом расщепляемого линкера является редокс-расщепляемая линкерная группа, которая расщепляется при восстановлении или при окислении.

[0389] В некоторых аспектах редокс-расщепляемый линкер содержит дисульфидную связь, т.е. он представляет собой расщепляемый дисульфидом линкер.

[0390] Редокс-расщепляемые линкеры могут быть восстановлены, например, внутриклеточными меркаптанами, оксидазами или редуктазами.

III.A.3.b. Линкеры, расщепляемые реактивными формами кислорода (ROS)

[0391] В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать расщепляемый линкер, который может расщепляться реактивными формами кислорода (ROS), такими как супероксид (Of) или пероксид водорода (H₂O₂), генерируемыми, например, в результате процессов воспаления, например, активированными нейтрофилами. В некоторых аспектах

расщепляемый линкер ROS представляет собой расщепляемый тиокеталом линкер. См., например, патент США № 8354455B2, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

III.A.3.c. pH-зависимые расщепляемые линкеры

[0392] В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер», содержащий расщепляемую кислотой связывающую группу, которая представляет собой связывающую группу, которая селективно расщепляется в кислых условиях ($\text{pH} < 7$).

[0393] В качестве неограничивающего примера расщепляемая кислотой связывающая группа отщепляется в кислой среде, например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или меньше. В некоторых аспектах pH составляет приблизительно 6,5 или меньше. В некоторых аспектах линкер расщепляется агентом, таким как фермент, который может действовать как обычная кислота, например, пептидаза (которая может быть субстратспецифичной) или фосфатаза. Внутри клеток определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемой кислотой связывающей группы. Хотя pH сыворотки крови человека составляет 7,4, среднее значение pH в клетках немного ниже, от приблизительно 7,1 до 7,3. Эндосомы также имеют кислое значение pH в диапазоне от 5,5 до 6,0, а лизосомы – приблизительно 5,0 при еще более кислом значении pH. Соответственно, pH-зависимые расщепляемые линкеры иногда в данной области техники называют эндосомно лабильными линкерами.

[0394] Расщепляемая кислотой группа может иметь общую формулу $-\text{C}=\text{NN}-$, C (O) O или $-\text{OC}(\text{O})$. В другом неограничивающем примере углерод, присоединенный к сложноэфирному кислороду (алкоксигруппе), присоединен к арильной группе, замещенной алкильной группой или третичной алкильной группой, такой как, например, диметилпентил или трет-бутил. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваясь ими, амин, имин, сложный аминокэфир, бензойный имин, диортоэфир, полифосфоэфир, полифосфазен, ацеталь, виниловый эфир, гидразон, цис-аконитат, гидразид, тиокарбамоил, имизин, азидометилметилмалеиновый ангидрид, тиопропионат, замаскированный эндосомолитический агент, цитраконильную группу или любую их комбинацию. Дисульфидные связи также чувствительны к pH.

[0395] В некоторых аспектах линкер содержит гидразоновую связь, неустойчивую к

pH. Такие неустойчивые к кислотам связи широко используются в области конъюгатов, например, конъюгатов антитело-лекарственное средство. См., например, Zhou et al, *Biomacromolecules* 2011, 12, 1460-7; Yuan et al, *Acta Biomater.* 2008, 4, 1024-37; Zhang et al, *Acta Biomater.* 2007, 6, 838-50; Yang et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, 321, 462-8; Reddy et al, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006, 58, 229-36; Doronina et al, *Nature Biotechnol.* 2003, 21, 778-84.

[0396] В определенных вариантах осуществления линкер содержит лабильную связь при низком значении pH, выбранную из следующего: кетали, которые лабильны в кислой среде (например, pH менее 7, более чем приблизительно 4) с образованием диола и кетона; ацетали, которые в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) лабильны с образованием диола и альдегида; имины или иминий, которые лабильны в кислой среде (например, при pH менее 7, более приблизительно 4) с образованием амина и альдегида или кетона; связи кремний-кислород-углерод, неустойчивые в кислых условиях; кремний-азотные (силазановые) связи; кремний-углеродные связи (например, арилсиланы, винилсиланы и аллилсиланы); малеаматы (амидные связи, синтезированные из производных малеинового ангидрида и аминов); ортоэфирные; гидразоны; активированные производные карбоновой кислоты (например, сложные эфиры, амиды), предназначенные для кислотно-катализируемого гидролиза); или виниловые эфиры.

[0397] Дополнительные примеры можно найти в патентах США №№ 9790494B2 и 8137695B2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

III.A.3.d. Расщепляемые ферментами линкеры

[0398] В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать линкер, расщепляемый внутриклеточными или внеклеточными ферментами, например протеазами, эстеразами, нуклеазами, амидазами. Диапазон ферментов, которые могут расщеплять конкретный линкер в комбинации линкеров, зависит от конкретных связей и химической структуры линкера. Соответственно, пептидные линкеры можно расщеплять, например, пептидазами, линкеры, содержащие сложноэфирные связи, можно расщеплять, например, эстеразами; линкеры, содержащие амидные связи, могут расщепляться, например, амидазами; и т.п.

III.A.3.e. Расщепляемые протеазой линкеры

[0399] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает расщепляемый протеазой линкер, т.е. линкер, который может расщепляться эндогенной протеазой. Только определенные пептиды легко расщепляются внутри или за пределами клеток. См., например, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) and Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Расщепляемые линкеры могут содержать расщепляемые сайты, состоящие из α -аминокислотных единиц и пептидных связей, которые химически представляют собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и α -аминокислотной группой лизина, считаются непептидными связями и считаются нерасщепляемыми.

[0400] В некоторых аспектах расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления для протеазы, *например*, неприлизина (CALLA или CD10), тиметологопептидазы (TOP), лейкотриеновой гидролазы A4, эндотелин-конвертирующих ферментов, протеазы ste24, нейролизина, митохондриальной промежуточной пептидазы, интерстициальных коллагеназ, коллагеназ, стромелизинов, эластазы макрофагов, матрилизина, желатиназы, мепринов, проколлагеновых C-эндопептидаз, проколлагеновых N-эндопептидаз, металлопротеиназ ADAM и ADAMT, миелинассоциированных металлопротеиназ, энамелизина, фактор некроза опухоли α -конвертирующего фермента, инсулизина, нардилизина, митохондриальной процессинговой пептидазы, магнолизина, дактилизин-подобных металлопротеиназ, нейтрофильной коллагеназы, матриксных металлопептидаз, матриксных металлопротеиназ мембранного типа, эндопептидазы SP2, простатоспецифического антигена (PSA), плазмина, урокиназы, белка активации фибробластов человека (FAP α), трипсина, химотрипсинов, кальдекрина, панкреатических эластаз, панкреатической эндопептидазы, энтеро пептидазы, лейкоцитарной эластазы, миелобластов, химазы, триптазы, гранзима, химотриптического фермента рогового слоя, акрозина, калликреинов, компонентов и факторов комплемента, конвертазы c3/c5 альтернативного пути комплемента, сериновой протеазы, ассоциированной с маннозо-связывающим белком, факторов коагуляции, тромбина, протеина c, активатора плазминогена u и t, катепсина G, гепсина, простаина, эндопептидазы, активирующей фактор роста гепатоцитов, пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа, фурина, пропротеинконвертаз, пролилпептидаз, ациламиноацилпептидазы, пептидилгликаминазы, сигнальной пептидазы, n-концевых нуклеофильных аминогидролаз, 20s протеасомы, γ -

глутамилтранспептидазы, митохондриальной эндопептидазы, митохондриальной эндопептидазы Ia, htra2-пептидазы, матриптазы, протеазы сайта 1, легумаина, катепсинов, цистеиновых катепсинов, кальпаинов, убиквитинизопептидазы Т, каспаз, гликозилфосфатидилинозитолпротеинтрансамидазы, прокоагулянта рака, прогормона тиолпротеазы, γ -глутамилгидролазы, блеомицингидролазы, сепразы, катепсина В, катепсина D, катепсина L, катепсина M, протеиназы К, пепсинов, химозина, гастриксина, ренина, япсина и/или карпинов, простатоспецифического антигена (PSA) или любой протеазы Asp-N, Glu- C, Lys-C или Arg-C в целом. См., *например*, Cancer Res. 77(24):7027-7037 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0401] В некоторых аспектах расщепляемый линкерный компонент содержит пептид, содержащий от одного до десяти аминокислотных остатков. В этих аспектах пептид позволяет расщеплять линкер протеазой, тем самым облегчая высвобождение биологически активной молекулы при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Примеры пептидов включают, но не ограничиваются ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, пентапептиды и гексапептиды.

[0402] Пептид может содержать встречающиеся в природе и/или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Термин «встречающаяся в природе аминокислота» относится к Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp и Tyr. «Неприродные аминокислоты» (т.е. аминокислоты, которые не встречаются в природе) включают, в качестве неограничивающего примера, гомосерин, гомоаргинин, цитруллин, фенилглицин, таурин, йодтирозин, селеноцистеин, норлейцин («Nle»), норвалин («Nva»), бета-аланин, L- или D-нафталанин, орнитин («Orn») и т.п. Пептиды могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухолессоциированной протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмينا.

[0403] Аминокислоты также включают D-формы природных и неприродных аминокислот. «D-» обозначает аминокислоту, имеющую «D»- (правовращающую) конфигурацию, в отличие от конфигурации во встречающихся в природе («L-») аминокислотах. Природные и неприродные аминокислоты можно приобрести коммерчески (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) или синтезировать с использованием способов, известных из уровня техники.

[0404] Примеры дипептидов включают, но не ограничиваясь ими, валин-аланин, валин-цитруллин, фенилаланин-лизин, N-метил-валин-цитруллин, циклогексилаланин-лизин и бета-аланин-лизин. Примеры трипептидов включают, но не ограничиваясь ими,

глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).

III.A.3.f. Расщепляемые эстеразой линкеры

[0405] Некоторые линкеры расщепляются эстеразами («линкеры, расщепляемые эстеразой»). Только определенные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами и амидазами, присутствующими внутри или вне клеток. Сложные эфиры образуются при конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с простыми спиртами, такими как алифатические спирты, а также с малыми циклическими и малыми ароматическими спиртами. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложных эфиров включают, но без ограничения ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемая сложным эфиром связывающая группа имеет общую формулу -C (O) O- или -OC (O)-.

III.A.3.g. Расщепляемые фосфатазой линкеры

[0406] В некоторых аспектах комбинация линкеров может включать расщепляемую связывающую группу на основе фосфата, отщепляемую агентом, который разрушает или гидролизует фосфатные группы. Примером агента, расщепляющего внутриклеточные фосфатные группы, является фермент, такой как внутриклеточная фосфатаза. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются —O—P (O) (OR_k) —O—, —O—P (S) (OR_k) —O—, —O—P (S) (SR_k) —O—, -S-P (O) (OR_k) -O-, -O-P (O) (OR_k) -S-, -S-P (O) (OR_k) -S-, -O-P (S) (OR_k) -S-, -SP (S) (OR_k) -O-, -OP (O) (R_k) -O-, -OP (S) (R_k) -O-, -SP (O) (R_k) -O-, -SP (S) (R_k) -O-, -SP (O) (R_k) -S- или -OP (S) (R_k) -S-.

[0407] В различных аспектах R_k является любым из следующих: NH₂, BH₃, CH₃, C₁₋₆ алкил, C₆₋₁₀ арил, C₁₋₆ алкокси и C₆₋₁₀ арил-окси. В некоторых аспектах C₁₋₆ алкил и C₆₋₁₀ арил являются незамещенными. Дополнительными неограничивающими примерами являются -O-P (O) (OH) -O-, -O-P (S) (OH) -O-, -O-P (S) (SH) -O-, -S-P (O) (OH) -O-, -O-P (O) (OH) -S-, -S-P (O) (OH) -S-, -O-P (S) (OH) -S-, -S-P (S) (OH) -O-, -O-P (O) (H) -O-, -O-P (S) (H) -O-, -S-P (O) (H) -O-, -SP (S) (H) -O-, -SP (O) (H) -S-, -OP (S) (H)-S- или -O-P (O) (OH) -O-.

III.A.3.h. Фотоактивируемые расщепляемые линкеры

[0408] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает фотоактивированный расщепляемый линкер, например, нитробензильный линкер или линкер, содержащий нитробензильную реактивную группу.

III.A.3.i. Саморасщепляющийся линкер

[0409] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит саморасщепляющийся линкер. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер в ВВ (например, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,4-элиминированию после ферментативного расщепления расщепляемого протеазой линкера. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер в ВВ (например, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,6-элиминированию после ферментативного расщепления расщепляемого протеазой линкера. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер представляет собой, например, производное п-аминобензила (pAB), такое как п-аминобензилкарбамат (pABC), п-аминобензиловый эфир (PABE), п-аминобензилкарбонат, или их комбинацию.

[0410] В определенных аспектах саморасщепляющийся линкер содержит ароматическую группу. В некоторых аспектах ароматическая группа выбрана из группы, состоящей из бензила, циннамила, нафтила и бифенила. В некоторых аспектах ароматическая группа является гетероциклической. В других аспектах ароматическая группа содержит по меньшей мере один заместитель. В некоторых аспектах по меньшей мере один заместитель выбран из группы, состоящей из F, Cl, I, Br, OH, метила, метокси, NO₂, NH₂, NO³⁺, NHCOCH₃, N(CH₃)₂, NHCOCF₃, алкила, галоалкила, C₁-C₈ алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната. В других аспектах по меньшей мере один C в ароматической группе замещен N, O или C-R*, где R* независимо выбран из H, F, Cl, I, Br, OH, метила, метокси, NO₂, NH₂, NO³⁺, NHCOCH₃, N(CH₃)₂, NHCOCF₃, алкила, галоалкила, C₁-C₈ алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната.

[0411] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер содержит аминокбензилкарбаматную группу (например, пара-аминобензилкарбамат), аминокбензиловую эфирную группу или аминокбензилкарбонатную группу. В одном аспекте саморасщепляющийся линкер представляет собой п-аминобензилкарбамат (pABC).

[0412] pABC представляет собой наиболее эффективную и широко распространенным соединительным звеном для специфической для саморасщепляющегося

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

[0413] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер соединяет биологически активную молекулу (*например*, ASO) с расщепляемым протеазой субстратом (*например*, Val-Cit). В конкретных аспектах карбаматная группа саморасщепляющегося линкера рABC соединена с аминогруппой биологически активной молекулы (*например*, ASO), а аминогруппа саморасщепляющегося линкера рABC соединена с расщепляемым протеазой субстратом.

[0414] Ароматическое кольцо аминобензильной группы необязательно может быть замещено одним или несколькими (*например*, R₁ и/или R₂) заместителями в ароматическом кольце, которые заменяют водород, который в противном случае присоединен к одному из четырех незамещенных атомов углерода, которые образуют кольцо. В контексте данного документа символ «R_x» (*например*, R₁, R₂, R₃, R₄) представляет собой общее сокращение, обозначающее группу заместителей, как описано в данном документе.

[0415] Группы заместителей могут улучшать способность к саморасщеплению п-аминобензильной группы (Hay *et al.*, J. Chem Soc., Perkin Trans. 1:2759-2770 (1999); см. также, Sykes *et al.* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:1601-1608 (2000)).

[0416] Саморасщепление может происходить, *например*, посредством 1,4-элиминирования, 1,6-элиминирования (*например*, рABC), 1,8-элиминирования (*например*, пара-аминоциннамиловый спирт), □-элиминирования, циклизации-элиминирования (*например*, сложный эфир 4-аминобутанола и этилендиамина), циклизации/лактонизации, циклизации/лактолизации и *т.д.* См., например, Singh *et al.* Curr. Med. Chem. 15:1802-1826 (2008); Greenwald *et al.* J. Med. Chem. 43:475-487 (2000).

[0417] В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер может содержать, *например*, циннамильную, нафтильную или бифенильную группы (см., *например*, Blencowe *et al.* Polym. Chem. 2:773-790 (2011)). В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер содержит гетероциклическое кольцо (см., *например*, патенты США №№ 7375078; 7754681). Многочисленные гомоароматические группы (см., например, Carl *et al.* J. Med. Chem. 24:479 (1981); Senter *et al.* J. Org. Chem. 55:2975 (1990); Taylor *et al.* J. Org. Chem. 43:1197 (1978); Andrianoemenjanahary *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1903 (1992)), и гетероароматические группы на основе кумарина (см., например, Weinstein *et al.* Chem. Commun. 46:553 (2010)), фурана, тиофена, тиазола, оксазола, изоксазола, пиррола, пиразола (см., например, Hay *et al.* J. Med. Chem. 46:5533 (2003)), пиридина (см., например, Perry-Feigenbaum *et al.* Org. Biomol. Chem. 7:4825 (2009)), имидазона (см., например, Nailor *et al.* Bioorg. Med. Chem.

Let. Z:1267 (1999); Hay and Denny, Tetrahedron Lett. 38:8425 (1997)), и триазола (см., *например*, Bertrand and Gesson, J. Org. Chem. 72:3596 (2007)), которые являются саморасщепляющимися как в водных, так и в физиологических условиях, известны в данной области техники. См. также патенты США №№ 7691962; 7091186; публикации патента США №№ US2006/0269480; US2010/0092496; US2010/0145036; US2003/0130189; US2005/0256030)

[0418] В некоторых аспектах комбинация линкеров, описанная в данном документе, содержит более одного саморасщепляющегося линкера в тандеме, *например*, два или более звеньев рАВС. См., *например*, de Groot *et al.* J. Org. Chem. 66:8815-8830 (2001). В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать саморасщепляющийся линкер (*например*, пара-аминобензиловый спирт или гемитиоаминальное производное пара-карбоксобензальдегида или глиоксиловой кислоты), связанный с фторуглеродным зондом (см., *например*, Meyer *et al.* Org. Biomol. Chem. 8:1777-1780 (2010)).

[0419] Если группы заместителей в саморасщепляющемся линкере определены их общепринятыми химическими формулами, записанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые возникли бы в результате написания структуры справа налево. *Например*, «-CH₂O-» также означает «-OCH₂-».

[0420] Группы заместителей в саморасщепляющемся линкере, *например*, заместители R₁ и/или R₂ в пара-аминобензильном саморасщепляющемся линкере, как обсуждалось выше, могут включать, *например*, алкил, алкилен, алкенил, алкинил, алкокси, алкиламино, алкилтио, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, арилалкил, арилокси, гетероарил и *т.д.* Когда соединение по настоящему изобретению содержит более одного заместителя, тогда каждый из заместителей выбран независимо.

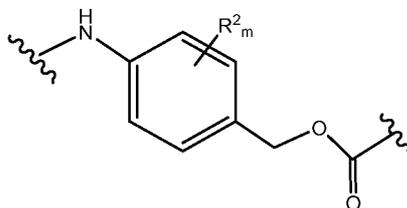
[0421] В некоторых конкретных аспектах саморасщепляющийся линкер, присоединенный к расщепляемому пептидному линкеру, имеет следующую формулу, комбинация имеет следующую формулу:



где каждый -A- независимо представляет собой аминокислотное звено, а независимо представляет собой целое число от 1 до 12; -Y- представляет собой саморасщепляющийся спейсер, а у равно 1 или 2. В некоторых аспектах -A_n- представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид или гексапептид. В некоторых аспектах -A_n- выбран из группы, состоящей из валин-аланина, валин-цитруллина, фенилаланин-лизина, N-

метилвалин-цитруллина, циклогексилаланин-лизина и бета-аланин-лизина. В некоторых аспектах –A_a-представляет собой валин-аланин или валин-цитруллин.

[0422] В некоторых аспектах самораспрепляющийся линкер –Y_y- имеет следующую формулу:



где каждый R² независимо представляет собой C₁₋₈ алкил, -O-(C₁₋₈ алкил), галоген, нитро или циано; а m является целым числом от 0 до 4. В некоторых аспектах m равно 0, 1 или 2. В некоторых аспектах m равно 0.

[0423] В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

III.A.4. Реакционноспособные фрагменты (RM)

[0424] ASO по настоящему изобретению получают либо посредством химического синтеза, либо посредством химической реакции между их компонентами. Например, в некоторых аспектах заякоривающий фрагмент, содержащий реакционноспособную группу (например, малеимид), может реагировать с ASO, содержащим реакционноспособную к малеимиду группу, с получением гидрофобно модифицированного ASO по настоящему изобретению, где заякоривающий фрагмент может встраиваться в липидный бислой мембраны экзосомы, тем самым прикрепляя ASO к поверхности экзосомы.

[0425] Любой компонент или группа компонентов гидрофобно модифицированной ASO по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере RG и/или RM, что позволит присоединить компоненты посредством одной реакции или серии реакций с получением гидрофобно модифицированной ASO по настоящему изобретению. Примеры схем синтеза гидрофобно модифицированных ASO включают:





где [AM] представляет собой заякоривающий фрагмент, [ASO] представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, [L] представляет собой линкер или комбинацию линкеров, /RM/ представляет собой реакционноспособный фрагмент и /RG/ представляет собой реакционноспособную группу. В любом из предложенных схематических представлений ASO может быть присоединен, например, через его 5'-конец или 3'-конец.

[0426] Примеры схем синтеза для получения промежуточных соединений при синтезе ASO включают:



где [AM] представляет собой заякоривающий фрагмент, [ASO] представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, [L] представляет собой линкер или комбинацию линкеров, /RM/ представляет собой реакционноспособный фрагмент и /RG/ представляет собой реакционноспособную группу. В любом из предложенных схематических представлений ASO может быть присоединен, например, через его 5'-конец или 3'-конец.

[0427] В некоторых аспектах реакционноспособная группа «/RG/» может представлять собой, например, аминогруппу, тиольную группу, гидроксильную группу, группу карбоновой кислоты или азидную группу. Конкретные реакционноспособные фрагменты «/RM/», которые могут реагировать с этими реакционноспособными группами, более подробно описаны ниже.



[0429] Любой из заякоривающих фрагментов, линкера или комбинаций линкеров, или ASO, описанных в данном документе, может быть конъюгирована с реакционноспособным фрагментом, например, амино-реакционноспособным фрагментом (например, NHS-эфиром, п-нитрофенолом, изотиоцианатом, изоцианатом или альдегидом), тиол-реакционноспособным фрагментом (например, акрилатом, малеимидом или пиридилдисульфидом), гидрокси-реакционноспособным фрагментом (например, изотиоцианатом или изоцианатом), реакционноспособным с карбоновой кислотой фрагментом (например, эпоксидом) или азид-реакционноспособным фрагментом (например, алкином).

[0430] Иллюстративные реакционноспособные фрагменты, которые можно

использовать для ковалентного связывания двух компонентов, описанных в данном документе (например, заякоривающий фрагмент и ASO, или заякоривающий фрагмент и линкер, или заякоривающий фрагмент и линкер, или два линкера, или линкер и ASO, или два заякоривающих фрагмента) включают, например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, N-4-малеимид-масляную кислоту, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, йодацетоксисукцинимид, N-(4-малеимидбутирилокси)сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбокспентил]иминодиуксусную кислоту, N-(5-аминопентил)иминодиуксусную кислоту и 1'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит). Также можно использовать бифункциональные линкеры (линкеры, содержащие две функциональные группы).

[0431] В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент, линкер или ASO может содержать концевую оксиаминогруппу, например, $-ONH_2$, гидразиногруппу, $-NHNH_2$, меркаптогруппу (т.е. SH или тиол) или олефин (например, $CH=CH_2$). В некоторых аспектах заякоривающий фрагмент, линкер или ASO может содержать электрофильный фрагмент, например, в концевом положении, например, альдегид, алкилгалогенид, мезилат, тозилат, нозилат или брозилат, или активированный эфир карбоновой кислоты, например, NHS-эфир, фосфорамидит или пентафторфениловый эфир. В некоторых аспектах ковалентная связь может быть образована путем сочетания нуклеофильной группы лиганда, например, гидроксильной, тиольной или аминогруппы, с электрофильной группой.

[0432] Настоящее изобретение применимо ко всем видам реакционноспособных групп и реакционноспособных фрагментов, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые известны в данной области техники.

[0433] Термин «защитная группа», используемый в данном документе, относится к лабильному химическому фрагменту, который, как известно в данной области техники, защищает реакционноспособные группы, включая без ограничения гидроксильные, амино- и тиоловые группы, от нежелательных реакций во время синтеза. Защитные группы обычно используются селективно и/или ортогонально для защиты сайтов во время реакций на других реакционноспособных сайтах, и затем их можно удалить, чтобы оставить незащищенную группу как есть или доступной для дальнейших реакций. Защитные группы, известные в данной области техники, в целом описаны в Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999).

[0434] Кроме того, различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке для получения желаемых соединений. Преобразования в синтетической химии и методологии для защитных групп (постановка защиты и снятие защиты), используемые при синтезе соединений, описанных в данном

документе, известны в данной области техники и включают, например, те, которые описаны в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), и последующие их издания.

[0435] Дополнительно или альтернативно можно использовать известный в данной области техники твердофазный синтез. Подходящие твердофазные методы, включая автоматизированные методы синтеза, описаны в F. Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991) and Toy, P.H.; Lam, Y (ed.), *Solid-Phase Organic synthesis, concepts, Strategies, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (2012).

[0436] В некоторых аспектах реакционноспособная группа может альтернативно реагировать более чем с одним из реакционноспособных фрагментов, описанных ниже.

III.A.4.a. Реакционноспособные к амину фрагменты

[0437] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный к амину фрагмент. Используемый в данном документе термин «реакционноспособный к амину фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реакционноспособной группой, имеющей аминфрагмент, таким как первичные амины. Примерами реакционноспособных к амину фрагментов являются сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS-эфир), п-нитрофенол, изотиоцианат, изоцианат и альдегид. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые реагируют с первичными аминами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент может быть присоединен к концевому положению заякоривающего фрагмента, комбинации линкеров или ASO по настоящему изобретению.

[0438] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой NHS-эфир. Как правило, реакционноспособный фрагмент NHS-эфир реагирует с первичным амином реакционноспособной группы с образованием стабильной амидной связи и N-гидроксисукцинимиды (NHS).

[0439] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой п-нитрофенольную группу. Как правило, реакционноспособный фрагмент п-

нитрофенол представляет собой активированный карбамат, который реагирует с первичным амином реакционноспособной группы с образованием стабильной части карбамата и п-нитрофенола.

[0440] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой изотиоцианат. Как правило, изотиоцианат реагирует с первичным амином реакционноспособной группы с образованием стабильного фрагмента тиомочевины.

[0441] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой изоцианат. Как правило, изоцианат реагирует с первичным амином реакционноспособной группы с образованием стабильного фрагмента мочевины.

[0442] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой альдегид. Как правило, альдегиды реагируют с первичными аминами с образованием оснований Шиффа, которые могут быть дополнительно восстановлены с образованием ковалентной связи посредством восстановительного аминирования.

III.A.4.b. Реакционноспособные к тиолу фрагменты

[0443] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный к тиолу фрагмент. Используемый в данном документе термин «реакционноспособный к тиолу фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реакционноспособной группой, имеющей тиоловую группу (или меркаптогруппа). Примерами реакционноспособных к тиолу фрагментов являются акрилаты, малеимиды и пиридилдисульфиды. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые реагируют с тиолом, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный к тиолу фрагмент может быть присоединен к концевому положению заякоривающего фрагмента, комбинации линкеров или ASO по настоящему изобретению.

[0444] В некоторых аспектах реакционноспособный к тиолу фрагмент представляет собой акрилат. Как правило, акрилаты реагируют с тиолами при атоме углерода β к карбонилу акрилата с образованием стабильной сульфидной связи.

[0445] В некоторых аспектах реакционноспособный к тиолу фрагмент представляет собой малеимид. Как правило, малеимиды реагируют с тиолами при любом из атомов углерода от β до карбониллов с образованием стабильной сульфидной связи.

[0446] В некоторых аспектах реакционноспособный к тиолу фрагмент представляет собой пиридилдисульфид. Обычно пиридилдисульфиды реагируют с тиолами при атоме

серы β к пиридилу с образованием стабильной дисульфидной связи и пиридин-2-тиона.

III.A.4.c. Реакционноспособные к гидроксигруппе фрагменты

[0447] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный к гидроксилу фрагмент. Используемый в данном документе термин «реакционноспособный к гидроксилу фрагмент» относится к химической группе, которая может реагировать с реакционноспособной группой, имеющей гидроксильную группу. Примерами реакционноспособных к гидроксилу фрагментов являются изотиоцианаты и изоцианаты. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые реагируют с гидроксильными фрагментами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный к гидроксилу фрагмент может быть присоединен к концевому положению заякоривающего фрагмента, комбинации линкеров или ASO по настоящему изобретению.

[0448] В некоторых аспектах реакционноспособный к гидроксилу фрагмент представляет собой изотиоцианат. Обычно изотиоцианат реагирует с гидроксилом реакционноспособной группы с образованием стабильного карбамотиоатного фрагмента.

[0449] В некоторых аспектах реакционноспособный к амину фрагмент представляет собой изоцианат. Обычно изоцианат реагирует с гидроксилом реакционноспособной группы с образованием стабильного карбаматного фрагмента.

III.A.4.d. Реакционноспособные к карбоновой кислоте фрагменты

[0450] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный к карбоновой кислоте фрагмент. Используемый в данном документе термин «реакционноспособный к карбоновой кислоте фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реакционноспособной группой, содержащей фрагмент карбоновой кислоты. Типичным реакционноспособным к карбоновой кислоте фрагментом является эпоксид. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые реагируют с фрагментами карбоновой кислоты, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный к карбоновой кислоте фрагмент может быть присоединен к концевому положению заякоривающего фрагмента, комбинации линкеров или ASO по настоящему изобретению.

[0451] В некоторых аспектах реакционноспособный к карбоновой кислоте фрагмент представляет собой эпоксид. Обычно эпоксид реагирует с карбоновой кислотой реакционноспособной группы при любом из атомов углерода эпоксида с образованием фрагмента 2-гидроксиэтилацетата.

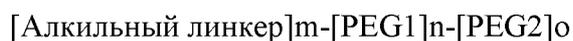
III.A.4.e. Реакционноспособные к азиду фрагменты

[0452] В некоторых аспектах реакционноспособный фрагмент представляет собой реакционноспособный к азиду фрагмент. Используемый в данном документе термин «реакционноспособный к азиду фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реакционноспособной группой, имеющей азидный фрагмент. Иллюстративным реакционноспособным к азиду фрагментом является алкин. Альтернативные реакционноспособные фрагменты, которые реагируют с азидными фрагментами, также хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах реакционноспособный к карбоновой кислоте фрагмент может быть присоединен к концевому положению заякоривающего фрагмента, комбинации линкеров или ASO по настоящему изобретению.

[0453] В некоторых аспектах реакционноспособный к азиду фрагмент представляет собой алкин. Обычно алкин реагирует с азидом реакционноспособной группы посредством реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения, также называемой «клик-химией», с образованием фрагмента 1,2,3-триазола.

III.A.5. Конкретные примеры и топологии

[0454] В конкретных аспектах настоящего изобретения комбинация линкеров состоит из линкера формулы

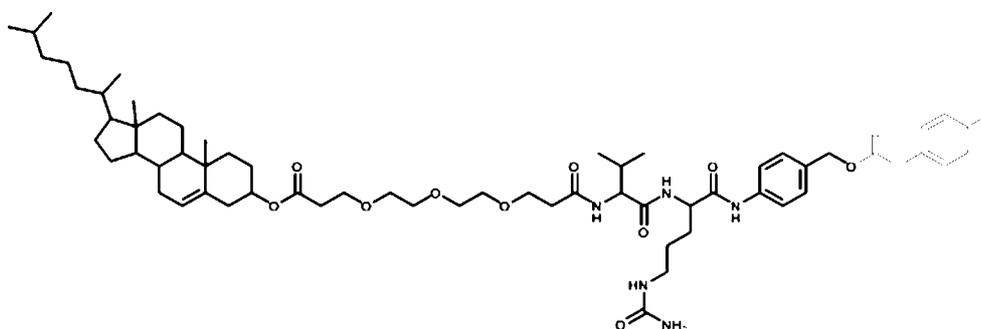


где m , n и o равны 0 или 1, и по меньшей мере одно из m , n или o не равно нулю. Примерами комбинаций линкеров в соответствии с такой формулой являются C6-TEG-HEG, C6-HEG, C6-TEG, C6, TEG-HEG, TEG, C8-TEG-HEG, C8-HEG, C8-TEG, и C8.

[0455] В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит нерасщепляемый линкер (например, TEG или HEG) в сочетании с одним или более расщепляемыми линкерами, например, ферментативно расщепляемым линкером и саморасщепляющимся

линкером.

[0456] В конкретном аспекте комбинация линкеров содержит комбинацию линкеров TEG (неразщепляемый линкер)-Val-Cit (разщепляемый линкер)-pAB (саморазщепляющийся линкер), как показано ниже



[0457] Конкретные комбинации заякоривающих фрагментов и комбинаций линкеров проиллюстрированы в таблицах ниже.

Таблица 2.

Заякоривающий фрагмент	Комбинация линкеров		
	1-й линкер	2-ой линкер	3-й линкер
Холестерин	C6	TEG	HEG
Холестерин	C6	HEG	Отсутствует
Холестерин	C6	TEG	Отсутствует
Холестерин	C6	Отсутствует	Отсутствует
Холестерин	TEG	HEG	Отсутствует
Холестерин	TEG	Отсутствует	Отсутствует
Токоферол	C8	TEG	HEG
Токоферол	C8	HEG	Отсутствует
Токоферол	C8	TEG	Отсутствует
Токоферол	C8	Отсутствует	Отсутствует
Токоферол	TEG	HEG	Отсутствует
Токоферол	HEG	Отсутствует	Отсутствует

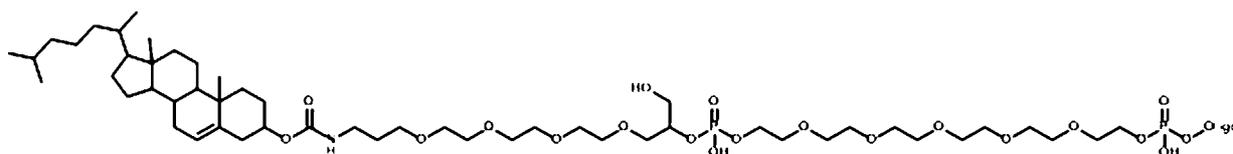
Токоферол	TEG	Отсутствует	Отсутствует
Токоферол	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Пальмитат	C6	TEG	HEG
Пальмитат	C6	HEG	Отсутствует
Пальмитат	C6	TEG	Отсутствует
Пальмитат	C6	Отсутствует	Отсутствует
Холестерин	TEG	Глицерин	HEG

Таблица 3.

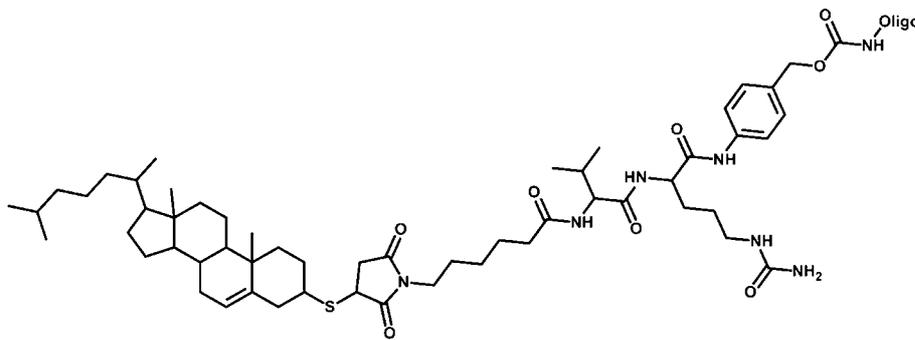
Комбинация линкеров		
Линкер 1	Расщепляемый линкер 2	Линкер 3
C6	Дисульфид Имин Тиокеталь Три/Динуклеотид Val-Cit	C6
Отсутствует		Отсутствует
TEG		TEG
HEG		HEG
TEG-HEG		TEG-HEG

[0458] Примеры конкретных олигонуклеотидов, таких как ASO по настоящему изобретению, приведены ниже

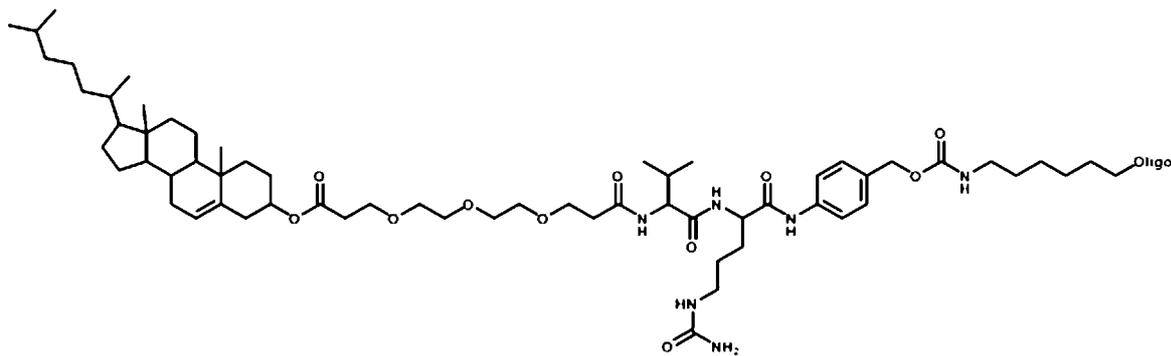
[Холестерин]-[TEG]-[HEG]-[ASO]



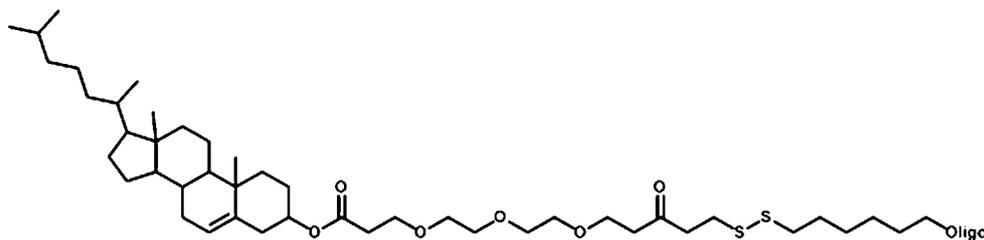
[Холестерин]-[SMal]-[Val-Cit]-[pAB]-[ASO]



[Холестерин]-[TEG]-[Val-Cit]-[C6]-[ASO]



[Холестерин]-[TEG]-[SS]-[C6]-[ASO]



где [холестерин] представляет собой холестериновый заякоривающий фрагмент, [TEG] представляет собой нерасщепляемый линкер TEG, [HEG] представляет собой нерасщепляемый линкер HEG, [SS] представляет собой дисульфид-редокс-расщепляемый линкер, [C6] представляет собой алкильный нерасщепляемый линкер, [SMal] представляет собой S-малеимид, [Val-Cit] представляет собой расщепляемый валин-цитруллиновый линкер, [pAB] представляет собой саморасщепляющийся линкер pAB. В некоторых аспектах ASO по настоящему изобретению имеет структуру в соответствии с приведенными выше примерными структурами, в которой один или более компонентов заменены компонентом того же класса, что и изображенные в примере. Например, заякоривающий фрагмент [холестерин] может быть заменен другим заякоривающим фрагментом, описанным в данном документе, [TEG] может быть заменен другим полимерным нерасщепляемым линкером, описанным в данном документе (например, HEG,

PEG, PG), [Val-Cit] может быть заменен другим расщепляемым пептидазой линкером, или [pAB] может быть заменен другим саморасщепляющимся линкером.

Ш.В. Каркасные фрагменты

[0459] Во ВВ могут быть экспрессированы один или более каркасных фрагментов. В некоторых аспектах для заякоривания ASO на ВВ по настоящему изобретению используют один или более каркасных фрагментов. В других аспектах один или более каркасных фрагментов используют для заякоривания белка или молекулы на ВВ в дополнение к ASO. Таким образом, ВВ по настоящему изобретению содержит заякоривающий фрагмент, связывающий ASO, и каркасный фрагмент, связывающий белок или молекулу, например, нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах ASO связан с каркасным фрагментом. В некоторых аспектах ВВ содержит более одного каркасного фрагмента. В некоторых аспектах первый ASO связан с первым каркасным фрагментом, а второй ASO связан со вторым каркасным фрагментом. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент и второй каркасный фрагмент представляют собой каркасный фрагмент одного и того же типа, например, как первый, так и второй каркасные фрагменты представляют собой каркасный белок X. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент и второй каркасный фрагмент представляют собой различные типы каркасного фрагмента, например, первый каркасный фрагмент представляет собой каркасный белок Y, а второй каркасный фрагмент представляет собой каркасный белок X. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент представляет собой каркас Y, описанный в данном документе. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент представляет собой каркас X, описанный в данном документе. В некоторых аспектах второй каркасный фрагмент представляет собой каркас Y, описанный в данном документе. В некоторых аспектах второй каркасный фрагмент представляет собой каркас X, описанный в данном документе.

[0460] В некоторых аспектах ВВ содержит один или более каркасных фрагментов, которые способны заякоривать ASO на ВВ, например, экзосоме (например, или на поверхности просвета, или на внешней поверхности). В определенных аспектах каркасный фрагмент представляет собой полипептид («каркасный белок»). В некоторых аспектах каркасный белок включает экзосомный белок или его фрагмент. В других аспектах каркасные фрагменты являются неполипептидными фрагментами. В некоторых аспектах каркасные белки включают различные мембранные белки, такие как трансмембранные белки, интегральные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах экзосом. Они могут включать различные белки CD, транспортеры,

интегрины, лектины и кадгерини. В определенных аспектах каркасный фрагмент (например, каркасный белок) включает каркасный белок X. В других аспектах каркасный фрагмент (например, экзосомный белок) включает каркас Y. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент (например, экзосомный белок) включает как каркас X, так и каркас Y.

III.B.1. Сконструированные с помощью каркаса X ВВ, например, экзосомы

[0461] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению имеют мембрану с модифицированным составом. Например, составы их мембран могут быть изменены путем изменения содержания белков, липидов или гликанов в мембране.

[0462] В некоторых аспектах сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы генерируются химическими и/или физическими методами, такими как индуцированное PEG-слияние и/или ультразвуковое слияние. В других аспектах сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, создаются с помощью способов генной инженерии. ВВ, *например*, экзосомы, полученные из генетически модифицированной клетки-продуцента или потомства генетически модифицированной клетки, могут содержать модифицированные мембранные композиции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы, имеют каркасный фрагмент (*например*, экзосомный белок, *например*, каркас X) в более высокой или более низкой плотности (*например*, в более высоком количестве) или включают вариант или фрагмент каркасного фрагмента.

[0463] Например, сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X) могут быть получены из клетки (*например*, клеток HEK293), трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей каркасный фрагмент (*например*, экзосомные белки, *например*, каркас X) или его вариант или фрагмент. ВВ, включающие каркасный фрагмент, экспрессируемые из экзогенной последовательности, могут включать мембраны с модифицированным составом.

[0464] Различные модификации или фрагменты каркасного фрагмента могут использоваться для аспектов настоящего изобретения. Например, каркасный фрагмент, модифицированный с целью повышения аффинности к связывающему агенту, может быть использован для создания сконструированных на поверхности ВВ, которые могут быть очищены с использованием связывающего агента. Можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные для более эффективного нацеливания на ВВ и/или мембраны. Также можно использовать каркасные фрагменты, модифицированные так, чтобы они содержали минимальный фрагмент, необходимый для специфического и

эффективного нацеливания на экзосомные мембраны.

[0465] Каркасные фрагменты могут быть сконструированы для экспрессии в виде слитой молекулы, например, слитой молекулы каркаса X с ASO. Например, слитая молекула может содержать каркасный фрагмент, описанный в данном документе (*например*, каркас X, *например*, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, переносчик АТФ или их фрагмент или вариант), связанный с ASO.

[0466] В некоторых аспектах сконструированные на поверхности (например, с помощью каркаса X) ВВ, описанные в данном документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ, известными в данной области техники. Например, сконструированные на поверхности (например, с помощью каркаса X) ВВ содержат на поверхности модифицированные белки в больших количествах, чем на поверхности природных ВВ или ВВ, полученных с использованием обычных экзосомных белков. Более того, сконструированные на поверхности (например, с помощью каркаса X) ВВ по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению с природными ВВ или ВВ, полученными с использованием обычных экзосомных белков.

[0467] В некоторых аспектах каркас X содержит негативный регулятор рецептора простагландина F2 (полипептид PTGFRN). Белок PTGFRN может также называться партнером 1 CD9 (CD9P-1), белком F, содержащим мотив Glu-Trp-Ile EWI (EWI-F), регуляторным белком рецептора простагландина F2-альфа, белком, связанным с рецептором простагландина F2-альфа или CD315. Полноразмерная аминокислотная последовательность белка PTGFRN человека (номер доступа в базе данных Uniprot Q9P2B2) показана в таблице 4 как SEQ ID NO: 301. Полипептид PTGFRN содержит сигнальный пептид (аминокислоты 1–25 SEQ ID NO: 301), внеклеточный домен (аминокислоты 26–832 SEQ ID NO: 301), трансмембранный домен (аминокислоты 833–853 SEQ ID NO: 301) и цитоплазматический домен (аминокислоты 854–879 SEQ ID NO: 301). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 301 без сигнального пептида, т. е. аминокислот 26–879 SEQ ID NO: 301. В некоторых аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в настоящем изобретении, включает трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в настоящем изобретении, представляет собой трансмембранный домен полипептида PTGFRN и (i) по меньшей мере пять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140,

по меньшей мере 150 аминокислот на N-конце трансмембранного домена, (ii) по меньшей мере пять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 аминокислот на C-конце трансмембранного домена или как (i), так и (ii).

[0468] В некоторых аспектах фрагменты полипептида PTGFRN лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

[0469] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична аминокислотам 26–879 SEQ ID NO: 301. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 302. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 302.

[0470] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 или 318. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, или 318, за

исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, или 318 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот кислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или более на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 или 318.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности каркасного белка X

Белок	Последовательность
Белок PTGFRN (SEQ ID NO: 301)	MGRLASRPLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCNV SDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQRG EILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGNYEDT VQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHHTL ALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTV GSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQEKAVEVA TVVIQPSVLRAAVPKNVSV AEGKELDLTCNITDRADDVRPEVTW SFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVDARSYHLLV RDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTW LEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSW YYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRAQDGFIF SKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNYYCVVSAWTKQRNNSWVKSKDV FSKPVNIFWALEDSVLVVKARQPKPFFAAGNTFEMTCKVSSKNIK SPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRV DGVVLEKVQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLW REAATSLSNPIEIDFQTS GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCITVEG AALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRD WKSDLSLERVSVLEFLLQVHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTS WQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIG YCSSHWCKKEVQETRERRRRLMSMEMD

Фрагмент белка PTGFRN (SEQ ID NO: 302)	GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCITVEGAALDPDDMAFDVSWFA VHSFGLDKAPVLLSSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLQ VHGSEDQDFGNYYCSVTPWVKSPGTSWQKEAEIHSKPVFITVKM DVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCKKEVQETRRE RRRLMSMEM 687-878 SEQ ID NO: 301
--	--

[0471] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 319, 320, 321, 322, 323, 323 или 325. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, 320, 321, 322, 323, 323 или 325, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, 320, 321, 322, 323, 323 или 325 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот кислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или более на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 319, 320, 321, 322, 323, 323 или 325.

[0472] В некоторых аспектах каркас X включает базигин (белок BSG), представленный SEQ ID NO: 303. Белок BSG также известен как 5F7, фактор стимуляции коллагеназы, индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса (EMMPRIN), антиген активации лейкоцитов М6, антиген группы крови ОК, фактор стимуляции коллагеназы опухолевых клеток (TCSF) или CD147. Номер в базе данных Uniprot белка BSG человека: P35613. Сигнальный пептид белка BSG представляет собой аминокислоты 1–21 из SEQ ID NO: 303. Аминокислоты 138-323 SEQ ID NO: 303 представляют собой внеклеточный домен, аминокислоты 324-344 представляют собой трансмембранный домен, а аминокислоты 345-385 SEQ ID NO: 303 представляют собой цитоплазматический домен.

[0473] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична аминокислотам 22–385 SEQ ID NO: 303. В некоторых аспектах фрагменты полипептида BSG лишены одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV, например, аминокислот 221–315 из SEQ ID NO: 303. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 326, 327 или 328. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326, 327 или 328, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326, 327 или 328 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот кислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или более на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 326, 327 или 328.

[0474] В некоторых аспектах каркас X содержит представителя суперсемейства иммуноглобулинов 8 (IgSF8 или белок IGSF8), который также известен как партнер 3 CD81, белок 2, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-2), кератиноцит-ассоциированный трансмембранный белок 4 (KCT-4), LIR-D1, белок, подобный регулятору простагландина (PGRL) или CD316. Полноразмерный белок IGSF8 человека имеет номер доступа Q969P0 в Uniprot и представлен в данном документе в виде SEQ ID NO: 304. Белок IGSF8 человека содержит сигнальный пептид (аминокислоты 1–27 SEQ ID NO: 304), внеклеточный домен (аминокислоты 28–579 SEQ ID NO: 304), трансмембранный домен (аминокислоты 580–600 SEQ ID NO: 304) и цитоплазматический домен (аминокислоты 601–613 SEQ ID NO: 304).

[0475] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере

около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична аминокислотам 28–613 SEQ ID NO: 304. В некоторых аспектах белок IGSF8 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или более на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333.

[0476] Неограничивающие примеры других каркасных белков X можно найти в патенте США № US10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который полностью включен посредством ссылки.

[0477] В некоторых аспектах последовательность кодирует каркасный фрагмент, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с C-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует часть каркасного фрагмента, в котором отсутствуют по меньшей мере 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот с N-конца и с C-конца нативного белка. В некоторых аспектах последовательность кодирует каркасный фрагмент, в котором отсутствует один или более функциональных или структурных доменов нативного белка.

[0478] В некоторых аспектах каркасные фрагменты, *например*, каркас X, *например*, белок PTGFRN связаны с одним или более гетерологичными белками. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с N-концом каркасных фрагментов. Один или несколько гетерологичных белков могут быть связаны с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых аспектах один или несколько гетерологичных белков связаны как с N-концом, так и с C-концом каркасных фрагментов. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок млекопитающего. В некоторых аспектах гетерологичный белок представляет собой белок человека.

[0479] В некоторых аспектах каркас X можно использовать для связывания любого фрагмента, *например*, ASO, с поверхностью просвета и на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы в одно и то же время. *Например*, полипептид PTGFRN можно использовать для связывания ASO внутри просвета (*например*, на поверхности просвета) в дополнение к внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Следовательно, в определенных аспектах каркас X может использоваться для двух целей, *например*, ASO на поверхности просвета и ASO на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркас X представляет собой каркасный белок, способный заякоривать ASO на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

III.B.2. Сконструированные с помощью каркаса Y ВВ, *например*, экзосомы

[0480] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению имеют внутреннее пространство (т.е. просвет), которое отличается от такового у природных ВВ. *Например*, ВВ, *например*, экзосома может быть изменена таким образом, что композиция на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы, имеет содержание белка, липидов или гликанов, отличное от такового у встречающихся в природе экзосом.

[0481] В некоторых аспектах сконструированные ВВ, *например*, экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью, кодирующей каркасный фрагмент (*например*, белки экзосомы, *например*, каркас Y) или модификацию или фрагмент каркасного фрагмента, который изменяет состав или содержимое поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. Различные модификации или фрагменты экзосомного белка, которые могут экспрессироваться на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы, могут быть использованы для аспектов настоящего изобретения.

[0482] В некоторых аспектах экзосомные белки, которые могут изменять поверхность просвета ВВ, *например*, экзосомы, включают, но не ограничиваются ими, миристоилированный, богатый аланином субстрат киназы С (MARCKS), белок 1,

подобный миристоилированному, богатому аланином субстрату киназы C (MARCKSL1), кислоторастворимый белок 1 головного мозга (BASP1) или любую их комбинацию.

[0483] В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит белок MARCKS (номер доступа в Uniprot P29966). Белок MARCKS также известен как субстрат протеинкиназы C, белок с молекулярной массой 80 кДа, легкая цепь. Полноразмерный белок MARCKS человека имеет длину 332 аминокислоты и содержит кальмодулин-связывающий домен в аминокислотных остатках 152-176. В некоторых аспектах каркас Y содержит белок MARCKSL1 (номер доступа в Uniprot P49006). Белок MARCKSL1 также известен как MARCKS-подобный белок 1 и субстрат макрофагальной миристоилированной богатой аланином C-киназы. Полноразмерный белок MARCKSL1 человека имеет длину 195 аминокислот. Белок MARCKSL1 имеет эффекторный домен, участвующий в связывании липидов и кальмодулина в аминокислотных остатках 87-110. В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит белок BASP1 (номер доступа в Uniprot P80723). Белок BASP1 также известен как кислотный белок с массой 22 кДа, обогащенный в нервной ткани, или белок нейрональной аксональной мембраны NAP-22. Полноразмерная последовательность человеческого белка BASP1 (изомер 1) имеет длину 227 аминокислот. В изомере, полученном альтернативным сплайсингом, отсутствуют аминокислоты 88–141 из SEQ ID NO: 403 (изомер 1). В таблице 5 представлены полноразмерные последовательности иллюстративного каркаса Y, описанного в данном документе (т.е. белков MARCKS, MARCKSL1 и BASP1).

Таблица 5. Иллюстративные последовательности каркаса Y

Белок	Последовательность
Белок MARCKS (SEQ ID NO: 401)	MGAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVASSPSKANGQENGHVKVN GDASPAAAESGAKEELQANGSAPAADKEEPAAAGSGAASPSAAE KGEPAAAAAPEAGASPVEKEAPAEGEAAEPGSPTAAEGEAASAA SSTSSPKAEDGATPSNETPKKKKKRFSFKLSGFSFKKNKK EAGEGGEAEAPAAEGGKDEAAGGAAAAAAEAGAASGEQAAAP GEEAAAGEEGAAGGDPQEAKPQEA AVAPEKPPASDETKAAEEPS KVEEKKAEEAGASAAACEAPSAAGPGAPPEQEAAPAEERAAAAA SSACAAPSQEAQPECSPEAPPAEAAE

<p>Белок MARCKSL1 (SEQ ID NO: 402)</p>	<p>MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGDLSPK GEGESPPVNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAELAKGEVPPKETPKK KKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRKEGGDSSASSPTEEEQEQGEIGA CSDEGTAQEGKAAATPESQEPQAKGAEASAASEEEAGPQATEPS TPSGPESGPTPASAEQNE</p>
<p>Белок BASP1 (SEQ ID NO: 403)</p>	<p>MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAATEEEGTPKESEPQ AAAEPAEAKGKPKPDQDAEGKAEKEGKDAAAAKEEAPKAE PEKTEGAAEAKAEPKAPQEQQAAPGPAAGGEAPKAAEAAAAP AESAAPAAGEEPSKEEGEPKTEAPAAPAAQETKSDGAPASDSKP GSSEAAPSSKETPAATEAPSSTPKAQGPAASAEPPKVEAPAANS DQTVTVKE</p>

[0484] В других аспектах каркас Y, применимый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична аминокислотам 2–227 SEQ ID NO: 403. В других аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична любой из SEQ ID NO: 404-567. В других аспектах каркас Y, применимый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 403, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. В других аспектах каркас Y, пригодный в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 403 без Met в аминокислотном остатке 1 SEQ ID NO: 403, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных

мутаций. Мутации могут представлять собой замену, вставку, делецию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 404-567 и 1 аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислоты, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот, 15 аминокислот, 16 аминокислот, 17 аминокислот, 18 аминокислот, 19 аминокислот или 20 аминокислот или более на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 404-567.

[0485] В некоторых аспектах белковая последовательность любой из SEQ ID NO: 404-567 достаточна для того, чтобы представлять собой каркас Y для настоящего изобретения (например, каркасный фрагмент, связанный с ASO).

[0486] В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит пептид с GXKLSKKK, где X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 404). В некоторых аспектах BB, *например*, экзосома, содержит пептид с последовательностью (G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), ξ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg), Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). В дополнительных аспектах экзосома, описанная в данном документе, (например, сконструированная экзосома) содержит пептид с последовательностью (G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом π представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту, Φ представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) и (+) представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Lys, Arg, His); и при этом положение пять не соответствует (+), а положение шесть не соответствует ни (+), ни (Asp или Glu). См. Aasland et al., FEBS Letters 513 (2002) 141-144 касательно номенклатуры аминокислот.

[0487] В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере

около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична любой из SEQ ID NO: 404-567.

[0488] Сконструированные с помощью каркаса Y BB, например, экзосомы, описанные в данном документе, могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 404-567.

[0489] В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен» (ED), при этом ND и/или ED ассоциированы с поверхностью просвета BB, например, экзосомы. В некоторых аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен; при этом внутриклеточный домен содержит «N-концевой домен» (ND) и «эффекторный домен» (ED); при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета BB, например, экзосомой. В контексте данного документа термин «ассоциированный с» относится к взаимодействию между каркасным белком с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, которое не включает ковалентное связывание с компонентом мембраны. Например, каркасы, применимые для настоящего изобретения, могут быть ассоциированы с просветной поверхностью BB, например посредством липидного якоря (например, миристиновой кислоты) и/или многоосновного домена, который электростатически взаимодействует с отрицательно заряженной головкой фосфолипидов мембраны. В других аспектах каркас Y, содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с поверхностью просвета BB, а ED ассоциирован с поверхностью просвета BB посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или по меньшей мере семь смежных основных аминокислот, например, лизинов (Lys) подряд.

[0490] В других аспектах каркас Y, содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND ассоциирован с поверхностью просвета BB, а ED ассоциирован с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством ионного взаимодействия, при этом ED содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или по меньшей мере семь смежных основных аминокислот, например, лизинов (Lys) подряд.

[0491] В некоторых аспектах ND ассоциирован с поверхностью просвета BB, например, экзосомы, посредством липидирования, например, посредством миристоилирования. В некоторых аспектах ND имеет Gly на N-конце. В некоторых аспектах N-концевой Gly является миристоилированным.

[0492] В некоторых аспектах ED ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, например, экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых аспектах ED ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, например, экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатического взаимодействия.

[0493] В некоторых аспектах ED содержит (i) основную аминокислоту (например лизин) или (ii) две или более основных аминокислот (например лизин) рядом друг с другом в полипептидной последовательности. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой лизин (Lys; K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H). В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, при этом n является целым числом от 1 до 10.

[0494] В других аспектах ED содержит по меньшей мере лизин, а ND содержит лизин на С-конце, если N-конец ED напрямую связан с лизином на С-конце ND, т.е., лизин находится на N-конце ED и слит с лизином на С-конце ND. В других аспектах ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов, когда N-конец ED связан с С-концом ND посредством линкера, например, одной или более аминокислот.

[0495] В некоторых аспектах ED содержит K, KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), R, RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ED содержит KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; при этом «:» представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; и где X6 представляет собой основную аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислоту X6 выбирают из группы, состоящей из Lys, Arg и His. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser. В некоторых аспектах X4 выбирают из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met.

[0496] В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит N-концевой домен (ND) и эффекторный домен (ED), при этом ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; при этом «:»

представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X2-X6 независимо представляет собой аминокислоту; при этом X6 представляет собой основную аминокислоту, и при этом ED связан с X6 с помощью пептидной связи и содержит по меньшей мере один лизин на N-конце ED.

[0497] В некоторых аспектах ND каркаса Y, содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где G представляет собой Gly; «:» представляет собой пептидную связь; X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X3 представляет собой любую аминокислоту; X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met; X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

[0498] В некоторых аспектах аминокислоту X3 выбирают из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

[0499] В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например*, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, *например*, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкеров могут быть связаны в тандеме. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предотвращают/уменьшают стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более участков, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности. Когда ND и ED соединены линкером, ED содержит по меньшей мере два лизина, по меньшей мере три лизина, по меньшей мере четыре лизина, по меньшей мере пять лизинов, по меньшей мере шесть лизинов или по меньшей мере семь лизинов.

[0500] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около

70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95 или по меньшей мере около 100 аминокислот.

[0501] В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$, где n является любым целым числом от 1 до 100, а m является любым целым числом от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Ser}]_z$, при этом x является целым числом от 1 до 4, y равно 0 или 1, а z является целым числом от 1 до 50. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит последовательность G_n , при этом n может являться целым числом от 1 до 100. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$, при этом n является целым числом от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$, при этом n является целым числом от 1 до 100.

[0502] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, *т.е.* не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не слит в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (*например*, содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция).

[0503] В других аспектах пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. В других аспектах пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе аминокислоты, встречающиеся в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В других аспектах пептидный линкер может содержать природную полипептидную последовательность.

[0504] В настоящем изобретении также предложена выделенная внеклеточная везикула (ВВ), например, экзосома, содержащая АSO, связанную с каркасным белком Y, при этом каркасный белок Y содержит ND-ED, при этом: ND содержит G: X2:X3:X4:X5:X6; при этом: G представляет собой Gly; «:» представляет собой пептидную связь; X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X3 представляет собой любую аминокислоту; X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Glu, и Met;

X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His; «—» представляет необязательный линкер; и ED представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два смежных лизина (Lys), которые связаны с X6 пептидной связью или одной или более аминокислотами, или (ii) по меньшей мере один лизин, который непосредственно связан с X6 пептидной связью.

[0505] В некоторых аспектах аминокислоту X2 выбирают из группы, состоящей из Gly и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X3 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X4 представляет собой Leu или Glu. В некоторых аспектах аминокислоту X5 выбирают из группы, состоящей из Ser и Ala. В некоторых аспектах аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах аминокислота X2 представляет собой Gly, Ala или Ser; аминокислота X3 представляет собой Lys или Glu, аминокислота X4 представляет собой Leu, Phe, Ser или Glu, аминокислота X5 представляет собой Ser или Ala; и аминокислота X6 представляет собой Lys. В некоторых аспектах «—» линкер содержит пептидную связь или одну или несколько аминокислот.

[0506] В некоторых аспектах ED в каркасном белке представляет Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410) или любую их комбинацию.

[0507] В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414) или (v) любой их комбинации.

[0508] В некоторых аспектах ND в каркасном белке Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 415), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 416), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 417), (iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 418), или (v) любой их комбинации, и ED в каркасном белке содержит K, KK, KKK, KKKG (SEQ ID NO: 419), KKKGY (SEQ ID NO: 420), KKKGYN (SEQ ID NO: 421), KKKGYNV (SEQ ID NO: 422), KKKGYNVN (SEQ ID NO: 423), KKKGYS (SEQ ID NO: 424), KKKGYG (SEQ ID NO: 425), KKKGYGG (SEQ ID NO: 426), KKKGS (SEQ ID NO: 427), KKKGSG (SEQ ID NO: 428), KKKGSGS (SEQ ID NO: 429), KKKS (SEQ ID NO: 430), KKKSG (SEQ ID NO: 431), KKKSGG (SEQ ID NO: 432), KKKSGGS (SEQ ID NO: 433), KKKSGGSG (SEQ ID NO: 434), KKS GGSGG (SEQ ID NO: 435), KKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 436), KRFSFKKS (SEQ ID NO: 437).

[0509] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка Y, применимого для настоящего изобретения, состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414) или (v) любой их комбинации.

[0510] В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

[0511] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка Y, применимого для настоящего изобретения, состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

[0512] В некоторых аспектах длина каркасного белка Y, составляет по меньшей мере приблизительно 8, по меньшей мере приблизительно 9, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 11, по меньшей мере приблизительно 12, по меньшей мере приблизительно 13, по меньшей мере приблизительно 14, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 16, по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 19, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 21, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 23, по меньшей мере приблизительно 24, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 26, по меньшей мере приблизительно 27, по меньшей мере приблизительно 28, по меньшей мере приблизительно 29, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 31, по меньшей мере приблизительно 32, по меньшей мере приблизительно 33, по меньшей мере приблизительно 34, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 36, по меньшей мере приблизительно 37, по меньшей мере приблизительно 38, по меньшей мере приблизительно 39, по меньшей мере приблизительно 39, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 41, по меньшей мере приблизительно 42, по меньшей мере приблизительно 43, по меньшей мере приблизительно

приблизительно 40 до приблизительно 50, от приблизительно 50 до приблизительно 60, от приблизительно 60 до приблизительно 70, от приблизительно 70 до приблизительно 80, от приблизительно 80 до приблизительно 90, от приблизительно 90 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 110, от приблизительно 110 до приблизительно 120, от приблизительно 120 до приблизительно 130, от приблизительно 130 до приблизительно 140, от приблизительно 140 до приблизительно 150, от приблизительно 150 до приблизительно 160, от приблизительно 160 до приблизительно 170, от приблизительно 170 до приблизительно 180, от приблизительно 180 до приблизительно 190, от приблизительно 190 до приблизительно 200, от приблизительно 200 до приблизительно 210, от приблизительно 210 до приблизительно 220, от приблизительно 220 до приблизительно 230, от приблизительно 230 до приблизительно 240, от приблизительно 240 до приблизительно 250, от приблизительно 250 до приблизительно 260, от приблизительно 260 до приблизительно 270, от приблизительно 270 до приблизительно 280, от приблизительно 280 до приблизительно 290, от приблизительно 290 до приблизительно 300, от приблизительно 300 до приблизительно 310, от приблизительно 310 до приблизительно 320, от приблизительно 320 до приблизительно 330, от приблизительно 330 до приблизительно 340 или от приблизительно 340 до приблизительно 350 аминокислот.

[0514] В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 853), (ix) GGKLSKKS GGSGGS (SEQ ID NO: 484), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 855), или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

[0515] В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка Y, применимого для настоящего изобретения, состоит из (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKKS GGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

[0516] В некоторых аспектах каркасный белок Y, применимый в контексте настоящего раскрытия, не содержит N-концевого Met. В некоторых аспектах каркасный белок Y, содержит липидированную аминокислоту, *например*, миристоилированную

аминокислоту, на N-конце каркасного белка, который функционирует как липидный якорь. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой Gly. Присутствие N-концевого Gly является абсолютным требованием для N-миристоилирования. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка является синтетическим. В некоторых аспектах аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка представляет собой аналог глицина, *например* аллилглицин, бутилглицин или пропаргилглицин.

[0517] Неограничивающие примеры каркасных белков можно найти в WO/2019/099942, опубликованной 23 мая 2019 г., и WO/2020/101740, опубликованной 22 мая 2020 г., которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

III.C. Нацеливающий фрагмент

[0518] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит нацеливающий фрагмент, например, экзогенный нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химическое соединение, РНК-аптамер или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит микропротеин, сконструированный белок с анкириновыми повторами (дарпин), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжье наноантитело или любую их комбинацию. В некоторых аспектах экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, однодоменное антитело, содержащее только тяжелую цепь антитело (VHH), одноцепочечное антитело, содержащее только тяжелую цепь акулье антитело (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

[0519] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на печень, сердце, легкие, мозг, почки, центральную нервную систему, периферическую нервную систему, мышцы, кости, сустав, кожу, кишечник, мочевой пузырь, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на опухолевую клетку, дендритную клетку, Т-клетку, В-клетку, макрофаг, нейрон, гепатоцит, клетку Купфера, клетку миелоидного происхождения (например, нейтрофил, моноцит, макрофаг или MDSC (например, моноцитарные MDSC или гранулоцитарные MDSC)), гемопоэтические стволовые клетки или любую их комбинацию.

[0520] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент связан с ВВ, например,

экзосомой, каркасным белком. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой любой каркасный белок, описанный в данном документе. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой каркас X. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой каркас Y.

III.D. Линкеры

[0521] Как описано выше, внеклеточные везикулы (BB) по настоящему изобретению (например, экзосомы и нановезикулы) могут содержать один или более линкеров, которые связывают представляющую интерес молекулу (например, ASO) с BB (например, с внешней поверхностью или на поверхности просвета). В некоторых аспектах ASO связан с BB напрямую или через каркасный фрагмент (например, каркас X или каркас Y). В определенных аспектах ASO связан с каркасным фрагментом линкером. В определенных аспектах ASO связан со вторым каркасным фрагментом линкером.

[0522] В определенных аспектах ASO связан с внешней поверхностью экзосомы с помощью каркаса X. В дополнительных аспектах ASO связан с поверхностью просвета экзосомы с помощью каркаса X или каркаса Y. Линкер может представлять собой любой химический фрагмент, известный в данной области техники.

[0523] В контексте данного документа термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например*, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, *например*, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более линкеров могут быть связаны в тандеме. Когда присутствует несколько линкеров, каждый из линкеров может быть одинаковым или разным. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость или предотвращают/уменьшают стерические затруднения. Линкеры обычно не расщепляются; однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более участков, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце линкерной последовательности.

[0524] В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около

70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95 или по меньшей мере около 100 аминокислот.

[0525] В некоторых аспектах пептидный линкер является синтетическим, *т.е.* не встречающимся в природе. В одном аспекте пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которыми он не связан или генетически не слит в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать неприродные полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция).

[0526] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы (например, ASO).

[0527] В некоторых аспектах линкер является «чувствительным к восстановлению линкером». В некоторых аспектах чувствительный к восстановлению линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых аспектах линкер является «кислотолабильным линкером». В некоторых аспектах кислотолабильный линкер содержит гидразон. Подходящие кислотолабильные линкеры также включают, например, цис-аконитовый линкер, гидразидный линкер, тиокарбамоильный линкер или любую их комбинацию.

[0528] В некоторых аспектах линкер включает нерасщепляемый линкер.

[0529] В некоторых аспектах линкер включает акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (сложный эфир NHS), дигоксигенин (сложный эфир NHS), холестерин-TEG, I-LINKER™, аминомодификатор (например, аминомодификатор C6, аминомодификатор C12, аминомодификатор C6 dT или аминомодификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадиинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-TEG, двойной биотин, PC-биотин или дестиобиотин), модификацию тиола (модификатор тиола C3 S-S, дитиол или модификатор тиола C6 S-S), или любую их комбинацию.

[0530] В некоторых аспектах линкер содержит следующее: терпен, такой как неролидол, фарнезол, лимонен, линалоол, гераниол, карвон, фенхон или ментол; липид, такой как пальмитиновая кислота или миристиновая кислота; холестерин; олеил; ретинил; остатки холестерина; холевая кислота; адамантануксусная кислота; 1-пиренмасляная

кислота; дигидротестостерон; 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин; геранилосигексильная группа; гексадецилглицерин; борнеол; 1,3-пропандиол; гептадецильная группа; О3-(олеоил)литохолевая кислота; О3-(олеоил)холеновая кислота; диметокситритил; феноксазин, малеимидный фрагмент, тип глюкоинидазы, тип CL2A-SN38, фолиевая кислота; углевод; витамин А; витамин Е; витамин К или любая их комбинация.

III.E. Модифицированные ВВ, содержащие фрагменты тропизма

[0531] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, описанная в данном документе, может быть сконструирована для регулирования ее свойств, например, биораспределения, например, путем включения иммуноаффинных лигандов или лигандов когнатных рецепторов. Например, ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе, могут быть сконструированы для направления их к определенному клеточному типу, например, шванновским клеткам, сенсорным нейронам, двигательным нейронам, менингеальным макрофагам или опухолевым клеткам, или могут быть сконструированы для усиления их миграции к определенному компартменту, например, к ЦНС (чтобы улучшить удержание в интраклеточном компартменте) или к микроокружению опухоли.

[0532] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит (i) ASO, описанный в данном документе, и (ii) модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент содержит однодоменный антигенсвязывающий фрагмент, например, VHH и/или vNAR. Используемые в данном документе термины «модифицирующий биораспределение агент» и «нацеливающий фрагмент» используются взаимозаменяемо и относятся к агенту, который может изменять распределение внеклеточных везикул (например, экзосом, нановезикул) *in vivo* или *in vitro* (например, в смешанной культуре клеток разных сортов). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент изменяет тропизм ВВ (например, экзосомы), т.е. нацеливающий фрагмент представляет собой «фрагмент тропизма». В контексте данного документа термин «фрагмент тропизма» относится к нацеливающему фрагменту, который при экспрессии на ВВ (например, экзосоме) изменяет и/или усиливает естественное движение ВВ. Например, в некоторых аспектах фрагмент тропизма может способствовать поглощению ВВ (например, экзосомой) конкретной клеткой, тканью или органом.

[0533] ВВ, например, экзосомы, проявляют преимущественное поглощение в отдельных типах клеток и тканях, и их тропизм можно регулировать путем добавления на их поверхность белков, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности целевых клеток. Фрагмент тропизма может содержать биологическую молекулу, такую как белок,

пептид, липид или углевод, или синтетическую молекулу. Например, в некоторых аспектах фрагмент тропизма может содержать аффинный лиганд, например, антитело (такое как наноантитело к CD19, наноантитело к CD22, наноантитело к CLEC9A или наноантитело к CD3), домен VHH, пептид фагового дисплея, домен фибронектина, верблюжье наноантитело и/или vNAR. В некоторых аспектах фрагмент тропизма может содержать, например, синтетический полимер (например, PEG), природный лиганд/молекулу (например, CD40L, альбумин, CD47, CD24, CD55, CD59) и/или рекомбинантный белок (например, XTEN).

[0534] В некоторых аспектах фрагмент тропизма может увеличивать поглощение ВВ, например, экзосомы, клеткой. В некоторых аспектах фрагмент тропизма, который может увеличивать поглощение ВВ, например, экзосомы, клеткой, включает лимфоцитарный антиген 75 (также известный как DEC205 или CD205), член А семейства 9 лектиновых доменов С-типа (CLEC9A), семейство 6 лектиновых доменов С-типа (CLEC6), член А семейства 4 лектиновых доменов С-типа (также известный как DCIR или CLEC4A), молекулу межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрин (также известную как DC-SIGN или CD209), лектин-подобный окисленный рецептор-1 LDL (LOX-1), рецептор макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO), член А семейства 12 лектиновых доменов С-типа (CLEC12A), член А семейства 10 лектиновых доменов С-типа (CLEC10A), DC-асialogликопротеиновый рецептор (DC-ASGPR), иммунорецептор DC 2 (DCIR2), дектин-1, макрофагальный маннозный рецептор (MMR), BDCA-2 (CD303, CLEC4C), дектин-2, BST-2 (CD317), ланжерин, CD206, CD11b, CD11c, CD123, CD304, XCR1, AXL, SIGLEC 6, CD209, SIRPA, CX3CR1, GPR182, CD14, CD16, CD32, CD34, CD38, CD10, антитело к CD3, или любую их комбинацию.

[0535] В некоторых аспектах, когда желателен тропизм к центральной нервной системе, ВВ, например, экзосома, по настоящему изобретению может содержать тканевый или клеточно-специфический целевой лиганд, который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы, к конкретной ткани или клетке центральной нервной системы. В некоторых аспектах клетка представляет собой глиальную клетку. В некоторых аспектах глиальная клетка представляет собой олигодендроцит, астроцит, эпендимальную клетку, клетку микроглии, шванновскую клетку, сателлитную глиальную клетку, обволакивающую обонятельную клетку или их комбинацию. В некоторых аспектах клетка представляет собой нервную стволовую клетку. В некоторых аспектах специфический к клетке целевой лиганд, который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы, к шванновским клеткам, связывается с маркером поверхности шванновских клеток, таким как миелиновый основной белок (MBP), нулевой миелиновый белок (P0), P75NTR, NCAM, PMP22 или любые их

комбинации. В некоторых аспектах фрагмент клеточно-специфического тропизма включает антитело или его антигенсвязывающую часть, аптамер или агонист или антагонист рецептора, экспрессируемого на поверхности шванновской клетки.

[0536] В некоторых аспектах модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген, экспрессируемый на опухолевой клетке. В некоторых аспектах модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген, экспрессируемый в микроокружении опухоли. В некоторых аспектах модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает мезотелин. Любой антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области техники, который способен связывать мезотелин, может быть использован во ВВ, описанных в данном документе. В некоторых аспектах модифицирующий биораспределение агент или нацеливающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33. Любой антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области техники, который способен связывать CD33, может быть использован во ВВ, описанных в данном документе. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, выбран из анти-CD33 связывающих фрагментов, описанных в патенте США № 5877296, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0537] В принципе, ВВ, например, экзосомы по настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один фрагмент тропизма, который может направлять ВВ, например, экзосому, в конкретную целевую клетку или ткань (например, клетку в ЦНС или шванновскую клетку в периферических нервах), можно вводить с использованием любого подходящего способа введения, известного из уровня техники (например, внутривенной инъекции или инфузии), поскольку присутствие тропизма (отдельно или в сочетании с присутствием антифагоцитарного сигнала, например, CD47, и использованием определенного пути введения) будет индуцировать тропизм ВВ, например, экзосомы, по направлению к необходимой целевой клетке или ткани.

[0538] В некоторых аспектах фрагмент тропизма связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, каркасного белка X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме. Тропизм может быть дополнительно улучшен путем присоединения антифагоцитарного сигнального фрагмента (например, CD47 и/или CD24), фрагмента с продленным периодом полужизни (например, альбумина или PEG) или любой их комбинации к внешней поверхности ВВ, например, экзосоме по настоящему изобретению. В некоторых аспектах

фрагмент антифагоцитарный сигнальный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, каркасным белком X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме.

[0539] Фармакокинетика, биораспределение и, в частности, тропизм и удерживание в необходимой ткани или анатомическом месте также могут быть достигнуты путем выбора соответствующего пути введения (например, интратекальное введение или интраокулярное введение для улучшения тропизма к центральной нервной системе).

[0540] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере два различных фрагмента тропизма. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит три различных фрагмента тропизма. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит четыре различных фрагмента тропизма. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит пять или более различных фрагментов тропизма. В некоторых аспектах один или более фрагментов тропизма увеличивают поглощение ВВ, например, экзосомы, клеткой. В некоторых аспектах каждый фрагмент тропизма присоединен к каркасному фрагменту, например, каркасному белку X или его фрагменту. В некоторых аспектах к одному и тому же каркасному фрагменту, например, каркасному белку X или его фрагменту, может быть присоединено множество фрагментов тропизма. В некоторых аспектах несколько фрагментов тропизма могут быть присоединены в тандеме к каркасному фрагменту, например, каркасному белку X или его фрагменту. В некоторых аспектах описанный в данном документе фрагмент тропизма или комбинация с ним присоединены к каркасному фрагменту, например, каркасному белку X или его фрагменту, через линкер или спейсер. В некоторых аспектах линкер, или спейсер, или их комбинация расположены между двумя фрагментами тропизма, описанными в данном документе.

[0541] Неограничивающие примеры фрагментов тропизма, способных направлять ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению, к различным типам клеток нервной системы, описаны ниже.

III.E.1. Фрагменты тропизма, нацеленные на шванновские клетки

[0542] В некоторых аспектах фрагмент тропизма может нацеливаться на шванновскую клетку. В некоторых аспектах фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к специфическим шванновской клетке мишеням, например, рецептору трансферрина (TfR), аполипопротеину D (ApoD), галектину 1 (LGALS1), миелиновому протеолипидному белку (PLP), глипикану 1 или синдекану 3. В некоторых аспектах фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, по настоящему изобретению, к шванновской клетке, представляет собой

трансферрин или его фрагмент, вариант или производное.

[0543] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на рецептор трансферрина (TfR). Рецепторы трансферрина, например, TfR1 или TfR2, являются белками-носителями трансферрина. Рецепторы трансферрина импортируют железо путем интернализации комплекса трансферрин-ион посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

[0544] TfR1 (см., например, UniProt P02786 TFR1_Human) или рецептор трансферрина 1 (также известный как кластер дифференцировки 71 или CD71) экспрессируется на эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Известно, что TfR1 экспрессируется в различных клетках, таких как эритроциты, моноциты, гепатоциты, клетки кишечника и эритроидные клетки, и активируется в быстро делящихся клетках, таких как опухолевые клетки (немелкоклеточный рак легкого, рак толстой кишки и лейкемия), а также в тканях, пораженных такими расстройствами, как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). TfR2 в основном экспрессируется в печени и эритроидных клетках, в меньшей степени обнаруживается в легких, селезенке и мышцах и имеет 45% идентичности и 66% сходства с TfR1. TfR1 представляет собой трансмембранный рецептор, образующий гомодимер из 760 остатков с дисульфидными связями и молекулярной массой 90 кДа. Аффинность к трансферрину различается между двумя типами рецепторов, причем аффинность к TfR1 по меньшей мере в 25-30 раз выше, чем у TfR2.

[0545] Связывание с TfR1 позволяет крупным молекулам, например, антителам, проникать в головной мозг. Было показано, что некоторые нацеленные на TfR1 антитела преодолевают гематоэнцефалический барьер, не влияя на поглощение железа. Среди них мышинное антитело к крысиному TfR OX26 и крысиное антитело к мышинному TfR 8D3. Аффинность взаимодействия антитело-TfR важна для определения успеха транцитотического транспорта через эндотелиальные клетки ГЭБ. Моновалентное взаимодействие TfR способствует транспорту через ГЭБ из-за измененных путей внутриклеточной сортировки. Эффекты авидности двухвалентных взаимодействий, перенаправляющих транспорт в лизосому. Кроме того, снижение аффинности связывания TfR напрямую способствует диссоциации от TfR, что увеличивает воздействие связывающего TfR антитела на паренхиму головного мозга. См., например, патент США № 8821943, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению может содержать лиганд, который может нацеливаться на TfR, например, нацеливаться на TfR1, такой как трансферрин, или антитело, или другую связывающую молекулу,

способную специфически связываться с TfR. В некоторых аспектах антитело, нацеленное на рецептор трансферрина, представляет собой низкоаффинное антитело к рецептору трансферрина (см., например, US 20190202936A1, который полностью включен в данный документ посредством ссылки).

[0546] В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает весь или часть (например, связывающую часть) лиганда для рецептора трансферрина, например, человеческого трансферрина, доступного в GenBank под номерами доступа NM001063, XM002793, XM039847, NM002343 или NM013900, среди прочих, или его варианта, фрагмента или производного.

[0547] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит фрагмент, нацеленный на рецептор трансферрина, т.е. нацеливающий фрагмент, направленный на рецептор трансферрина. Подходящие фрагменты, нацеленные на рецептор трансферрина, включают трансферрин или вариант трансферрина, такой как, но не ограничиваясь ими, сывороточный трансферрин, лактотрансферрин (лактоферрин), овотрансферрин или меланотрансферрин. Трансферрины представляют собой семейство связывающих негемовое железо белков, обнаруженных у позвоночных, включая сывороточные трансферрины, лактотрансферрины (лактоферрины), овотрансферрины и меланотрансферрины. Сывороточный трансферрин представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи с двумя N-связанными полисахаридными цепями, которые разветвлены и оканчиваются множеством антенн, каждая из которых имеет концевые остатки сиаловой кислоты. Существует два основных домена: домен N, состоящий примерно из 330 аминокислот, и домен C, состоящий примерно из 340 аминокислот, каждый из которых разделен на два субдомена, N1 и N2, а также C1 и C2. Связывание трансферрина с рецептором происходит через C-домен независимо от гликозилирования.

[0548] В некоторых аспектах фрагмент тропизма представляет собой сывороточный трансферрин или вариант трансферрина, такой как, но не ограничиваясь ими, гексасиалотрансферрин, пентасиалотрансферрин, тетрасиалотрансферрин, трисиалотрансферрин, дисиалотрансферрин, моносиалотрансферрин или асиалотрансферрин, или углеводдефицитный трансферрин (CDT), такой как асиало-, моносиало- или дисиалотрансферрин, или безуглеводный трансферрин (CFT), такой как асиалотрансферрин. В некоторых аспектах фрагмент тропизма представляет собой вариант трансферрина, имеющий N-концевой домен трансферрина, C-концевой домен трансферрина, гликозилирование нативного трансферрина, сниженное гликозилирование по сравнению с нативным трансферрином (дикого типа), отсутствие гликозилирования, по

меньшей мере две N-концевые доли трансферрина, по меньшей мере две С-концевые доли трансферрина, по меньшей мере одну мутацию в N-домене, по меньшей мере одну мутацию в С-домене, мутацию, при которой мутант имеет более слабую avidность связывания с рецептором трансферрина, чем нативный трансферрин, и/или мутацию, при которой мутант имеет более сильную avidность связывания с рецептором трансферрина, чем нативный трансферрин, или любую комбинацию вышеперечисленного.

[0549] В некоторых аспектах фрагмент тропизма, нацеленный на рецептор трансферрина, содержит рецептор нового варибельного антигена (vNAR) к рецептору трансферрина, например, связывающий домен с общей структурой мотива (FW1-CDR1-FW2-3-CDR3-FW4). См., например, патент США 2017-0348416, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. vNAR являются ключевым компонентом адаптивной иммунной системы акул. Имея массу всего 11 кДа, эти однодоменные структуры являются самыми маленькими IgG-подобными белками для царства Животные и обеспечивают прекрасную платформу для молекулярной инженерии и открытия биологических препаратов. Свойства vNAR включают высокую аффинность к мишени, простоту экспрессии, стабильность, растворимость, мультиспецифичность и повышенный потенциал проникновения в плотные ткани. См. Ubah et al. *Biochem. Soc. Trans.* (2018) 46(6):1559-1565.

[0550] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит домен vNAR, способный специфически связываться с Tfr1, где домен vNAR содержит или по существу состоит из каркаса vNAR с любым одним пептидом CDR1 в таблице 1 публикации US 2017-0348416 в комбинации с любым одним пептидом CDR3 из таблицы 1 публикации US 2017-0348416.

[0551] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на ApoD. В отличие от других липопротеинов, которые в основном вырабатываются в печени, аполипопротеин D в основном вырабатывается в головном мозге, мозжечке и периферических нервах. ApoD состоит из 169 аминокислот, включая сигнальный пептид секреции из 20 аминокислот. Он содержит два сайта гликозилирования (аспарагины 45 и 78), а молекулярная масса зрелого белка варьирует от 20 до 32 кДа. ApoD связывает стероидные гормоны, такие как прогестерон и прегненолон, с относительно сильной аффинностью, а с эстрогеном - с более слабой аффинностью. Арахидоновая кислота (AA) является лигандом ApoD с гораздо большей аффинностью, чем у прогестерона или прегненолона. Другие лиганды ApoD включают E-3-метил-2-гексеную кислоту, ретиноевую кислоту, сфингомиелин и сфинголипиды. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит лиганд, который может нацеливаться на ApoD, например, антитело или другую связывающую

молекулу, способную специфически связываться с ApoD.

[0552] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на галектин 1. Белок галектин-1 имеет длину 135 аминокислот. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит лиганд, который может нацеливаться на галектин 1, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с галектином 1.

[0553] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на PLP. PLP является основным миелиновым белком ЦНС. Он играет важную роль в формировании или поддержании многослойной структуры миелина. Миелиновая оболочка представляет собой многослойную мембрану, уникальную для нервной системы, которая функционирует как изолятор, значительно повышая эффективность проведения импульсов по аксону. PLP представляет собой высококонсервативный гидрофобный белок из 276–280 аминокислот, который содержит четыре трансмембранных сегмента, две дисульфидные связи и ковалентно связывает липиды (у млекопитающих по меньшей мере шести пальмитатных групп). Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит лиганд, который может нацеливаться на PLP, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с PLP.

[0554] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на глипикан 1. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит лиганд, который может нацеливаться на глипикан 1, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с глипиканом 1. В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелена на синдекан 3. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит лиганд, который может нацеливаться на синдекан 3, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с синдеканом 3.

III.E.2. Фрагменты тропизма, нацеленные на сенсорные нейроны

[0555] В некоторых аспектах описанный в данном документе фрагмент тропизма может направлять ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к сенсорному нейрону. В некоторых аспектах группа тропизма, которая направляет ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к сенсорному нейрону, нацелена на рецептор Trk, например, TrkA, TrkB, TrkC или их комбинацию.

[0556] Рецепторы Trk (киназы рецептора тропомиозина) представляют собой

семейство тирозинкиназ, которые регулируют силу и пластичность синапсов в нервной системе млекопитающих. Общими лигандами рецепторов Trk являются нейротрофины, семейство факторов роста, имеющих решающее значение для функционирования нервной системы. Связывание этих молекул является высокоспецифичным. Каждый тип нейротрофина имеет различную аффинность связывания с соответствующим рецептором Trk. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма, направляющий ВВ, например экзосому, описанную в данном документе, к сенсорному нейрону, содержит нейротрофин.

[0557] Нейротрофины связываются с рецепторами Trk в виде гомодимеров. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма включает по меньшей мере два нейротрофина, описанных в данном документе, например, в тандеме. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит по меньшей мере два нейротрофина, описанных в данном документе, например, в тандеме, которые присоединены к каркасному белку, например, белку X, через линкер. В некоторых аспектах линкер, соединяющий каркасный белок, например, белок X, с нейротрофином (например, гомодимером нейротрофина), имеет длину по меньшей мере 10 аминокислот. В некоторых аспектах линкер, соединяющий каркасный белок, например, белок X, с нейротрофином (например, гомодимером нейротрофина), имеет длину по меньшей мере около 25 аминокислот, около 30 аминокислот, около 35 аминокислот, около 40 аминокислот, около 45 аминокислот или около 50 аминокислот.

[0558] В некоторых аспектах нейротрофин представляет собой предшественник нейротрофина, т.е. пронейротрофин, который позже расщепляется с образованием зрелого белка.

[0559] Фактор роста нервов (NGF) является первым идентифицированным и, вероятно, лучше всего охарактеризованным членом семейства нейротрофинов. Он оказывает заметное влияние на развитие сенсорных и симпатических нейронов периферической нервной системы. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) обладает нейротрофической активностью, аналогичной NGF, экспрессируется в основном в ЦНС и обнаруживается в сердце, легких, скелетных мышцах и седалищном нерве на периферии (Leibrock, J. et al., Nature, 341:149-152 (1989)). Нейротрофин-3 (NT-3) является третьим членом семейства NGF и экспрессируется преимущественно в подмножестве пирамидных и зернистых нейронов гиппокампа и был обнаружен в мозжечке, коре головного мозга и периферических тканях, таких как печень и скелетные мышцы (Ernfors, P. et al., Neuron 1: 983-996 (1990)). Нейротрофин-4 (также называемый NT-4) является наиболее изменчивым членом семейства нейротрофинов. Нейротрофин-6 (NT-6) был

обнаружен у костистых рыб и связывается с рецептором p75.

[0560] В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный на TrkB, содержит, например, NT-4 или BDNF, или их фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный на TrkA, содержит, например, NGF или его фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный на TrkC, содержит, например, NT-3 или его фрагмент, вариант или производное.

[0561] В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). В некоторых аспектах BDNF представляет собой вариант нативного BDNF, такой как вариант с усеченной карбоксильной группой из двух аминокислот. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит полную последовательность BDNF из 119-аминокислот (HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETK CNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIK RGR; SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах используется вариант BDNF с усеченной карбоксильной группой из одной аминокислоты (аминокислоты 1-118 SEQ ID NO: 161).

[0562] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит вариант нативного BDNF с усеченной карбоксильной группой, например вариант, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот отсутствуют на С-конце BDNF. Варианты BDNF включают полный BDNF из 119 аминокислот, вариант из 117 или 118 аминокислот с укороченным карбоксильным концом, варианты с укороченным аминоконцом или варианты с изменением аминокислотного состава на около 20%, около 30 или на около 40%, пока вариант белка все еще связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью.

[0563] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит вариант BDNF с укороченной карбоксильной группой из двух аминокислот (аминокислоты 1-117 SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит вариант BDNF с усеченной карбоксильной группой из трех аминокислот (аминокислоты 1-116 SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит вариант BDNF с укороченной карбоксильной группой из четырех аминокислот (аминокислоты 1-115 SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит вариант BDNF с усеченной карбоксильной группой из пяти аминокислот (аминокислоты 1-114 SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит BDNF, который на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 161 или ее усеченной версии, например,

вариант из 117 или 118 аминокислот с одно- или усеченным карбоксильным концом из одной или двух аминокислот, или варианты с усеченным аминоконцом. См., например, патент США № 8053569B2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0564] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит фактор роста нервов (NGF). В некоторых аспектах NGF представляет собой вариант нативного NGF, такой как усеченный вариант. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает бета-субъединицу белка массой 26 кДа, единственный биологически активный компонент комплекса 7S NGF. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит полноразмерную последовательность из 120 аминокислот бета-NGF (SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM DGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVRRA; SEQ ID NO: 162). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает вариант нативного NGF с усеченной карбоксильной группой, например, вариант, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот отсутствуют на карбокси-конце NGF. Варианты NGF включают полный NGF из 120 аминокислот, более короткие аминокислотные варианты с усеченным карбоксильным концом, варианты с усеченным аминоконцом или варианты с изменением аминокислотного состава на около 20%, около 30% или на около 40%, пока фрагмент тропизма все еще связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит NGF, который на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 162 или ее усеченной версии.

[0565] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит нейротрофин-3 (NT-3). В некоторых аспектах NT-3 представляет собой вариант нативного NT-3, такой как усеченный вариант. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит полноразмерную последовательность из 119 аминокислот NT-3 (YAENKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETRCKE ARPVKN GCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCALSRKIGRT; SEQ ID NO: 163). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает вариант нативного NT-3 с усеченной карбоксильной группой, например вариант, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот отсутствуют на карбокси-конце NT-3. Варианты NT-3 включают полный NT-3 из 119 аминокислот, более короткие аминокислотные варианты с усеченным карбоксильным концом, варианты с усеченным аминоконцом или

варианты с изменением аминокислотного состава на около 20%, около 30% или на около 40%, пока фрагмент тропизма все еще связывается с рецептором TrkC высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит NT-3, который на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 163 или ее усеченной версии.

[0566] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит нейротрофин-4 (NT-4). В некоторых аспектах NT-4 представляет собой вариант нативного NT-4, такой как усеченный вариант. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит полную последовательность из 130 аминокислот NT-4 (GVSETAPASRRGELAVCDVSGWVTDRRTAVDLRGREVEVLGEVPAAGGSPLRQYFFETRCKADNAEEGGPGAGGGGCRGVDRRHVSECKAKQSYVRALTADAQGRVGVWRWIRIDTACVCTLLSRTGRA; SEQ ID NO: 164). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает вариант нативного NT-4 с усеченной карбоксильной группой, например вариант, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот отсутствуют на карбокси-конце NT-4. Варианты NT-4 включают полный NT-4 из 130 аминокислот, более короткие аминокислотные варианты с усеченным карбоксильным концом, варианты с усеченным аминоконцом или варианты с изменением аминокислотного состава на около 20%, около 30% или на около 40%, пока фрагмент тропизма все еще связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит NT-4, который на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 164 или ее усеченной версии.

[0567] Исследования взаимосвязи структура/функция NGF и родственных NGF рекомбинантных молекул продемонстрировали, что мутации в области NGF 25-36, наряду с другими петлевыми и непетлевыми областями β -шпильки, значительно влияли на взаимодействие NGF/рецептор NGF (Ibanez et al., EMBO J., 10, 2105-2110, (1991)). Было продемонстрировано, что небольшие пептиды, полученные из этой области, имитируют NGF в связывании с Mock-рецептором и воздействии на биологические реакции (LeSauter et al. J. Biol. Chem. 270, 6564-6569, 1995). Было обнаружено, что димеры циклических пептидов, соответствующих областям β -петли NGF, действуют как частичные агонисты NGF, поскольку они обладают как способствующей выживаемости, так и ингибирующей NGF активностью, в то время как мономерные и линейные пептиды неактивны (Longo et

al., J. Neurosci. Res., 48, 1-17, 1997). Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит такие пептиды.

[0568] Также были разработаны и синтезированы циклические пептиды, имитирующие области β -петли NGF, BDNF, NT3 и NT-4/5. Некоторые мономеры, димеры или полимеры этих циклических пептидов могут иметь трехмерную структуру, которая в физиологических условиях связывается с рецепторами нейротрофинов. Все эти структурные аналоги нейротрофинов, которые связываются с рецепторами поверхности нервных клеток и интернализуются, могут служить в качестве связывающего агента В соединения по настоящему изобретению для доставки конъюгированного терапевтического фрагмента ТМ в нервную систему. Соответственно, в некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает такие циклические пептиды или их комбинации.

[0569] В некоторых аспектах антитела против рецепторов поверхности нервных клеток, которые способны связываться с рецепторами и интернализироваться, также могут служить фрагментами тропизма, связывающимися с рецептором Trk. Например, моноклональное антитело (MAb) 5C3 специфично в отношении сайта докинга NGF человеческого рецептора p140 TrkA без перекрестной реактивности с человеческим рецептором TrkB. МкАт 5C3 и его Fab имитируют эффекты NGF *in vitro* и проявляют Trk-A-положительные опухоли человека *in vivo* (Kramer et al., Eur. J. Cancer, 33, 2090-2091, (1997)). Исследования молекулярного клонирования, рекомбинации, мутагенеза и моделирования вариабельной области мкАт 5C3 показали, что три или менее его определяющих комплементарность областей (CDR) имеют отношение к связыванию с TrkA. Анализы с рекомбинантными CDR и CDR-подобными синтетическими полипептидами показали, что они обладают агонистической биологической активностью, сходной с интактным мкАт 5C3. Также было продемонстрировано, что моноклональное антитело к рецептору p75 MC192 оказывает нейротрофическое действие. Таким образом, эти антитела и их функционально эквивалентные фрагменты также могут служить в качестве фрагментов тропизма по настоящему изобретению.

[0570] В некоторых аспектах пептидомиметики, синтезированные путем включения неприродных аминокислот или других органических молекул, также могут служить фрагментами тропизма по настоящему изобретению.

[0571] Другие нейротрофины известны в данной области техники. Соответственно, в некоторых аспектах целевой фрагмент содержит нейротрофин, выбранный из группы, состоящей из следующего: фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF),

трансформирующий фактор роста (TGF)-а, TGF- β , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), герегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки «Hedgehog», лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), белок Midline, плеотрофин, морфогенетические белки кости (BMP), нетрины, сапонины, семафорины, и фактор стволовых клеток (SCF).

[0572] В некоторых аспектах фрагмент тропизма, направляющий ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к сенсорному нейрону, содержит пептид вируса ветряной оспы (VZV).

III.E.3. Фрагменты тропизма, нацеленные на моторные нейроны

[0573] В некоторых аспектах описанный в данном документе фрагмент тропизма может направлять ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к моторному нейрону. В некоторых аспектах фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, описанную в данном документе, к моторному нейрону, содержит пептид гликопротеина вируса бешенства (RVG), пептид целевого аксонального импорта (TAXI), пептид P75R или пептид Tet-C.

[0574] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит пептид гликопротеина вируса бешенства (RVG). См., например, публикацию заявки на патент США 2014-00294727, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых аспектах пептид RVG содержит аминокислотные остатки 173-202 RVG (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG; SEQ ID NO: 601) или его вариант, фрагмент или производное. В некоторых аспектах фрагмент тропизма представляет собой фрагмент SEQ ID NO: 601. Такой фрагмент SEQ ID NO: 601 может иметь, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, удаленных с N-конца и/или с C-конца SEQ ID NO: 601. Функциональный фрагмент, полученный из SEQ ID NO: 601, может быть идентифицирован путем последовательного удаления N- и/или C-концевых аминокислот из SEQ ID NO: 601 и оценки функции полученного пептидного фрагмента, например, функции пептидного фрагмента связывать ацетилхолиновый рецептор и/или способности проникать через гематоэнцефалический барьер. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит фрагмент SEQ ID NO: 601 длиной 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 или 15 аминокислот. В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит фрагмент SEQ ID NO: 601 длиной менее 15 пептидов.

[0575] «Вариант» пептида RGV, например, SEQ ID NO: 601, относится к молекуле, по существу сходной по структуре и функции, т. е. где функция представляет собой способность проходить или проникать через ГЭБ, либо к целой молекуле или ее фрагменту. Вариант пептида RVG может содержать мутацию или модификацию, которая отличается от эталонной аминокислоты в SEQ ID NO: 601. В некоторых аспектах вариант SEQ ID NO: 601 представляет собой фрагмент SEQ ID NO: 601, как описано в данном документе. В некоторых аспектах вариант RVG может представлять собой другую изоформу SEQ ID NO: 601 или может содержать другие изомерные аминокислоты. Варианты могут быть природными, синтетическими, рекомбинантными или химически модифицированными полинуклеотидами или полипептидами, выделенными или полученными с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Варианты RVG могут включать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены. См., например, патент США № 9757470, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0576] В некоторых аспектах фрагмент тропизма содержит пептид целевого аксонального импорта (TAXI). В некоторых аспектах пептид TAXI представляет собой циклизованный пептид TAXI с последовательностью SACQSQSQMRCGGG (SEQ ID NO: 602). See, e.g., Sellers et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113:2514-2519, и патент США № 9056892, который в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Транспортные пептиды TAXI, как описано в данном документе, могут иметь любую длину. Обычно транспортный пептид имеет длину от 6 до 50 аминокислот, более типично от 10 до 20 аминокислот. В некоторых аспектах транспортный пептид TAXI содержит аминокислотную последовательность QSQSQMR (SEQ ID NO: 603), ASGAQAR (SEQ ID NO: 604), PF, или TSTAPHLRLRLTSR (SEQ ID NO: 605). Необязательно транспортный пептид TAXI дополнительно включает фланкирующую последовательность для облегчения включения в конструкцию для доставки или носитель, например, линкер. В одном аспекте пептид фланкирован цистеинами. В некоторых аспектах транспортный пептид TAXI дополнительно содержит дополнительную последовательность, выбранную для облегчения доставки в ядра. Например, пептид, облегчающий доставку в ядро, представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS). Как правило, этот сигнал состоит из нескольких коротких последовательностей положительно заряженных лизинов или аргининов, таких как PPKRQKV (SEQ ID NO: 606). В одном аспекте NLS имеет аминокислотную последовательность PPKRQKV (SEQ ID NO: 607).

[0577] В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению содержит пептидный шаттл BBB, описанный в таблице ниже. См., например, Oller-Salvia et al. (2016) Chem. Soc. Rev. 45, 4690-4707, и Jafari et al. (2019) Expert Opinion on Drug Delivery

16:583-605, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

SEQ ID NO	Пептид	Последовательность
608	Ангиопеп-2	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH
609	АроВ (3371–3409)	SSVIDALQYKLEGTTRLTRK-RGLKLATALSLSNKFVEGS
610	АроЕ (159–167) ₂	(LRKLRKRL) ₂
611	Пептид-22	Ac-C(&)MPRLRGC(&)-NH ₂
612	THR	THRPPMWSPVWP-NH ₂
613	Ретро-энантио THR	pwvpswmprrht-NH ₂
614	CRT	C(&)RTIGPSVC(&)
615	Лептин-30	YQQILTSMPSRNVIQISND-LENLRDLLHVL
616	RVG29	YTIWMPENPRPGTPCDIFT-NSRGKRASNG-OH
617	^D CDX	GreirtGraerwsekf-OH
618	Апамин	C(& ₁)NC(& ₂)KAPETALC(& ₁)-AR-RC(& ₂)QQH-NH ₂
619	MiniAp-4	[Dap](&)KAPETALD(&)
620	GSH	γ-L-глутамил-CG-OH
621	G23	HLNILSTLWKYRC
622	g7	GFtGFLS(O-β-Glc)-NH ₂
623	TGN	TGNYKALPHNG
624	TAT (47–57)	YGRKKRRQRRR-NH ₂
625	SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
626	Дикетопиперазины	&(N-MePhe)-(N-MePhe)Дикетопиперазины
627	PhPro	(Фенилпролин) ₄ -NH ₂

Номенклатура циклических пептидов (&) адаптирована к 3-буквенному аминокислотному коду по сравнению с кодом, описанным Spengler *et al.* *Pept. Res.*, 2005, **65**, 550–555

[Dap] означает диаминопропионовую кислоту.

III.F. Антифагоцитарный сигнал

[0578] Клиренс введенных ВВ, например, экзосом, иммунной системой организма может снизить эффективность введенной ВВ, например, экзосомы, терапии. В некоторых аспектах поверхность ВВ, например, экзосомы, модифицирована для ограничения или блокировки поглощения ВВ, например, экзосомы, клетками иммунной системы, например,

макрофагами. В некоторых аспектах поверхность ВВ, например, экзосомы, модифицирована для экспрессии одного или более поверхностных антигенов, которые ингибируют поглощение ВВ, например, экзосомы, макрофагом. В некоторых аспектах поверхностный антиген связан с внешней поверхностью ВВ (например, экзосомы).

[0579] Поверхностные антигены, применимые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, антигены, которые метят клетку как «собственную» клетку. В некоторых аспектах поверхностный антиген содержит антифагоцитарный сигнал. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал выбран из CD47, CD24, их фрагмента и любой их комбинации. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал содержит CD24, например, CD24 человека. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал содержит фрагмент CD24, например, CD24 человека. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии CD47 или его фрагмента на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы.

[0580] CD47, также называемый поверхностным антигеном лейкоцитов CD47 и ассоциированным с интегрином белком (IAP), как используется в данном документе, представляет собой трансмембранный белок, который обнаруживается во многих клетках организма. CD47 часто называют сигналом «не ешь меня», поскольку он сигнализирует иммунным клеткам, в частности миелоидным клеткам, о том, что конкретная клетка, экспрессирующая CD47, не является чужеродной клеткой. CD47 представляет собой рецептор SIRPA, связывание с которым предотвращает созревание незрелых дендритных клеток и ингибирует продукцию цитокинов зрелыми дендритными клетками. Взаимодействие CD47 с SIRPG опосредует межклеточную адгезию, усиливает суперантиген-зависимую опосредованную Т-клетками пролиферацию и костимулирует активацию Т-клеток. Также известно, что CD47 играет роль как в клеточной адгезии, действуя как рецептор адгезии для THBS1 на тромбоцитах, так и в модуляции интегринов. CD47 также играет важную роль в формировании памяти и синаптической пластичности в гиппокампе (по сходству). Кроме того, CD47 может играть роль в мембранном транспорте и/или интегрин-зависимой сигнальной трансдукции, предотвращать преждевременную элиминацию эритроцитов и участвовать в изменениях проницаемости мембран, вызванных вирусной инфекцией.

[0581] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, описанная в данном документе, модифицирована для экспрессии человеческого CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. Каноническая аминокислотная последовательность человеческого CD47 и различных известных изоформ описана в данном документе (UniProtKB - Q08722) как SEQ ID NO: 629-632. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована

для экспрессии полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 629, или ее фрагмент. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 630, или ее фрагмент. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 631, или ее фрагмент. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 632, или ее фрагмент.

[0582] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полноразмерного CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии фрагмента CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы, где фрагмент содержит внеклеточный домен CD47, например, CD47 человека. Любой фрагмент CD47, который сохраняет способность блокировать и/или ингибировать фагоцитоз макрофагом, может быть использован в ВВ, например, экзосомах, описанных в данном документе. В некоторых аспектах фрагмент содержит аминокислоты от 19 до около 141 канонической последовательности человеческого CD47 (например, аминокислоты 19-141 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент содержит аминокислоты от 19 до около 135 канонической последовательности человеческого CD47 (например, аминокислоты 19-135 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент содержит аминокислоты от 19 до около 130 канонической последовательности человеческого CD47 (например, аминокислоты 19-130 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент содержит аминокислоты от 19 до около 125 канонической последовательности человеческого CD47 (например, аминокислоты 19-125 SEQ ID NO 629).

[0583] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, которая имеет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по крайней мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотами от 19 до около 141 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-141 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, которая имеет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по

меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по крайней мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотами от 19 до около 135 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-135 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, которая имеет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по крайней мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотами от 19 до около 130 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-130 SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, которая имеет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по крайней мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотами от 19 до около 125 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-125 SEQ ID NO 629).

[0584] В некоторых аспектах CD47 или его фрагмент модифицированы для увеличения аффинности CD47 и его лиганда SIRP α . В некоторых аспектах фрагмент CD47 содержит Velcro-CD47 (см., например, Ho et al., JBC 290:12650-63 (2015), который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых аспектах Velcro-CD47 содержит замену C15S относительно последовательности человеческого CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 629).

[0585] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит CD47 или его фрагмент, экспрессированный на поверхности ВВ, например, экзосомы, на уровне, который выше, чем у немодифицированной ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах CD47 или его фрагмент слиты с каркасным белком. Любой каркасный белок, описанный в данном документе, можно использовать для экспрессии CD47 или его фрагмента на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, модифицирована для экспрессии фрагмента CD47, слитого с N-концом каркасного белка X. В некоторых аспектах ВВ, например экзосома, модифицирована для экспрессии фрагмента CD47, слитого с N-концом PTGFRN.

[0586] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 20 молекул, по меньшей мере около 30 молекул, по меньшей мере около 40, по

меньшей мере около 50, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 350, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 450, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 750 или по меньшей мере около 1000 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 20 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 30 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 40 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 50 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 100 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 200 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 300 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 400 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 500 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит по меньшей мере около 1000 молекул CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы.

[0587] В некоторых аспектах экспрессия CD47 или его фрагмента на поверхности ВВ, например, экзосомы, приводит к снижению поглощения ВВ, например, экзосомы, миелоидными клетками по сравнению с ВВ, например, экзосомой, не экспрессирующей CD47 или его фрагмент. В некоторых аспектах поглощение миелоидными клетками ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 95% по отношению к поглощению миелоидными клетками ВВ, например, экзосом, которые не экспрессируют CD47 или его фрагмент.

[0588] В некоторых аспектах экспрессия CD47 или его фрагмента на поверхности

ВВ, например, экзосомы, приводит к снижению локализации ВВ, например, экзосомы, в печени по сравнению с ВВ, например, экзосомой, не экспрессирующей CD47 или его фрагмент. В некоторых аспектах локализация в печени ВВ, например экзосом, экспрессирующих CD47 или его фрагмент, снижается по на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25 %, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 95% по отношению к локализации в печени ВВ, например, экзосом, не экспрессирующих CD47 или его фрагмент.

[0589] В некоторых аспектах период полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, увеличивается по сравнению с периодом полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент. В некоторых аспектах время полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, увеличивается в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 2,5 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 3,5 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 4,5 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз или в по меньшей мере около 10 раз по сравнению с периодом полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент.

[0590] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, экспрессирующая CD47 или его фрагмент, имеет повышенное удержание в кровотоке, например, в плазме, по сравнению с удержанием ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент, в кровотоке, например, плазме. В некоторых аспектах удержание в кровотоке, например, плазме, ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, увеличивается в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 2,5 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 3,5 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 4,5 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз или в по меньшей мере около 10 раз по сравнению с удержанием в кровотоке, например, плазме, ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент.

[0591] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, экспрессирующая CD47 или его фрагмент, имеет измененное биораспределение по сравнению с экзосомой, которая не

экспрессирует CD47 или его фрагмент. В некоторых аспектах измененное биораспределение приводит к повышенному поглощению эндотелиальными клетками, Т-клетками или повышенному накоплению в различных тканях, включая, помимо прочего, скелетные мышцы, сердечную мышцу, диафрагму, почки, костный мозг, центральную нервную систему, легкие, спинномозговую жидкость (СМЖ) или любую их комбинацию.

IV. Клетка-продуцент для получения сконструированных экзосом

[0592] ВВ, *например*, экзосомы, по настоящему раскрытию могут быть получены из клетки, выращенной *in vitro*, или взятой из жидкости организма субъекта. Когда экзосомы, получают из клеточной культуры *in vitro*, могут быть использованы различные клетки-продуценты, *например*, клетки НЕК293, клетки СНО и MSC. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент не является дендритной клеткой, макрофагом, В-клеткой, тучной клеткой, нейтрофилом, клеткой Бровича — Купфера, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

[0593] Клетки эмбриональной почки человека 293, также часто называемые клетками НЕК 293, НЕК-293, 293 или, менее точно, клетками НЕК, представляют собой специфическую линию клеток, первоначально полученную из клеток эмбриональной почки человека, выращенных в культуре ткани.

[0594] Клетки НЕК 293 были получены в 1973 году путем трансфекции культур нормальных эмбриональных клеток почки человека урезанной ДНК аденовируса типа 5 в лаборатории профессора Алекса ван дер Эба в Лейдене, Нидерланды. Клетки культивировали и трансфицировали аденовирусом. Последующий анализ продемонстрировал, что трансформация была вызвана вставкой примерно 4,5 т.п.н. из левого плеча вирусного генома, которые были включены в хромосому 19 человека.

[0595] Во всестороннем исследовании геномов и транскриптомов НЕК 293 и пяти производных линий клеток сравнивали транскриптом НЕК 293 с транскриптомом почек, надпочечников, гипофиза и центральной нервной ткани человека. Профиль НЕК 293 больше всего напоминал профиль клеток надпочечников, которые обладают многими свойствами нейронов.

[0596] Клетки НЕК 293 имеют сложный кариотип, демонстрирующий две или более копий каждой хромосомы и модальное число хромосом 64. Они описываются как гипотриплоидные, содержащие менее чем в три раза больше хромосом, чем гаплоидная гамета человека. Хромосомные аномалии включают в общей сложности три копии X-хромосомы и четыре копии хромосомы 17 и хромосомы 22.

[0597] Варианты клеток НЕК293, пригодные для получения ВВ, включают, но не ограничиваются ими, НЕК 293F, НЕК 293FT и НЕК 293T.

[0598] Клетка-производитель может быть генетически модифицирована, чтобы содержать экзогенные последовательности, кодирующие ASO, для продукции ВВ, описанных в данном документе. Генетически модифицированная клетка-производитель может содержать экзогенную последовательность путем временной или стабильной трансформации. Экзогенная последовательность может быть трансформирована в виде плазмиды. В некоторых аспектах экзогенная последовательность представляет собой вектор. Экзогенные последовательности могут быть стабильно интегрированы в геномную последовательность клетки-производителя, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых аспектах создается стабильная линия клеток для продукции экзосом с измененным просветом.

[0599] Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-производителя, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-производитель можно использовать различные способы, известные в данной области. Например, клетки, модифицированные с использованием различных способов редактирования генов (*например*, способы, использующие гомологичную рекомбинацию, систему, опосредованную транспозоном, систему loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN), входят в объем данного описания.

[0600] Экзогенные последовательности могут содержать последовательность, кодирующую каркасный фрагмент, раскрытый в данном документе, или его фрагмент или вариант. Дополнительная копия последовательности, кодирующей каркасный фрагмент, может быть введена для получения экзосомы, описанной в данном документе (*например*, имеющего более высокую плотность каркасного фрагмента на поверхности или на поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы). Экзогенная последовательность, кодирующая модификацию или фрагмент каркасного белка, может быть введена для получения сконструированной в просвете экзосомы, содержащей модификацию или фрагмент каркасного белка.

[0601] В некоторых аспектах клетка-производитель может быть модифицирована, *например*, трансфицирована одним или более векторами, кодирующими каркасный фрагмент, связанный с ASO.

[0602] В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению (*например*, экзосомы, сконструированные на поверхности и/или сконструированные в

просвете), могут быть получены из клетки, трансформированной последовательно, кодирующей полноразмерный зрелый каркасный фрагмент, описанный в данном документе, или каркасный фрагмент, связанный с ASO. Любой из каркасных фрагментов, описанных в данном документе, может быть экспрессирован из плазмиды, экзогенной последовательности, встроенной в геном, или другой экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как синтетическая матричная РНК (мРНК).

V. Фармацевтические композиции

[0603] В данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие *ВВ*, например, экзосомы, по данному изобретению, имеющие желаемую степень чистоты, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители или носители могут частично определяться конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих множество внеклеточных везикул. (См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005)). Фармацевтические композиции, как правило, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[0604] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и экзосому, описанные в данном документе. В определенных аспектах *ВВ*, , экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах ASO и один или более дополнительных терапевтических агентов по настоящему изобретению можно вводить в одной и той же *ВВ*. В других аспектах ASO и один или более дополнительных терапевтических агентов по настоящему изобретению вводят в разных *ВВ*. Например, настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую *ВВ*, содержащую ASO, и *ВВ*, содержащую дополнительный терапевтический агент. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, содержащая *ВВ*, например, экзосому, вводится до введения дополнительного терапевтического агента(-ов). В других аспектах фармацевтическая композиция, содержащая *ВВ*, например, экзосому, вводится после введения дополнительного терапевтического агента(-ов). В дополнительных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая *ВВ*, например, экзосому, вводится одновременно с дополнительным терапевтическим агентом(-ами).

[0605] Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов (*например*, животных или человека) при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (PEG).

[0606] Примеры носителей или разбавителей включают, без ограничений, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или соединение несовместимо с внеклеточными везикулами, описанными в данном документе, предполагается их применение в фармацевтических композициях. Дополнительные терапевтические агенты также могут быть включены в эти композиции. Как правило, фармацевтическая композиция составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем ее введения. ВВ, например, экзосомы можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, интратуморальным, внутримышечным путем или в виде ингаляций. В определенных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая экзосомы, вводится внутривенно, *например* путем инъекции. ВВ, например, экзосомы, можно необязательно вводить в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении заболевания, расстройства или патологического состояния, для лечения которых предназначены ВВ, например, экзосомы.

[0607] Растворы или суспензии могут включать следующие компоненты:

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

[0608] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stenophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Обычно композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, что она должна легко выходить из шприца. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, *например*, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, *например*, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов можно выполнять посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию соединения, которое замедляет всасывание, *например* моностеарата алюминия и желатина.

[0609] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения ВВ, например, экзосом, в эффективном количестве и в соответствующем растворителе с одним или более ингредиентами, перечисленными в данном документе или известными в данной области техники, по мере необходимости. Обычно дисперсии готовят путем включения ВВ, например экзосом, описанных в настоящем документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и

сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка активного ингредиента с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. ВВ, например, экзосомы можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить устойчивое или пульсирующее высвобождение ВВ, например, экзосомы.

[0610] Системное введение композиций, содержащих экзосомы, также может осуществляться через слизистые оболочки. Для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники, и включают в себя, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может быть осуществлено за счет использования *например*, назальных спреев.

[0611] В определенных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, например, экзосомы, вводится внутривенно субъекту, которому фармацевтическая композиция может принести пользу. В определенных аспектах осуществления композицию вводят в лимфатическую систему, например путем внутрелимфатической инъекции или путем внутриузловой инъекции (см., например, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)), или путем внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем интратуморальной инъекции, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[0612] В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую экзосомы, вводят в виде жидкой суспензии. В определенных аспектах фармацевтическую композицию вводят в виде состава, способного образовывать депо после введения. В определенных предпочтительных аспектах депо медленно высвобождает ВВ, например, экзосомы, в кровоток или остается в форме депо.

[0613] Обычно фармацевтически приемлемые композиции являются высокоочищенными, чтобы не содержать примесей, они биосовместимы и нетоксичны и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, вода является высокоочищенной и очищенной от контаминантов, *например*, эндотоксинов.

[0614] Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное масло, но не ограничиваясь ими. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать скользящее вещество, смачивающее вещество, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгирующий агент,

суспендирующий агент и/или консервант.

[0615] В некоторых аспектах фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемая соль включает соль натрия, соль калия, соль аммония или любую их комбинацию.

[0616] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе, и необязательно дополнительный фармацевтически активный или терапевтический агент. Дополнительный терапевтический агент может представлять собой биологический агент, агент на основе малой молекулы или агент на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент представляет собой дополнительный антагонист СЕВР/β. В некоторых аспектах антагонист СЕВР/β представляет собой любой антагонист СЕВР/β, описанный в данном документе. В некоторых аспектах дополнительный антагонист СЕВР/β представляет собой антитело к СЕВР/β. В некоторых аспектах дополнительный антагонист СЕВР/β представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах дополнительный антагонист СЕВР/β представляет собой малую молекулу.

[0617] В некоторых аспектах дополнительный антагонист СЕВР/β содержит ASO. В некоторых аспектах дополнительный антагонист СЕВР/β содержит любую ASO, описанную в данном документе.

[0618] Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, например, экзосомы, описанные в данном документе. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для интратуморальной инъекции.

[0619] В определенных аспектах препарат экзосом подвергается воздействию облучения, *например*, рентгеновских лучей, гамма-лучей, бета-частиц, альфа-частиц, нейтронов, протонов, элементарных ядер, УФ-лучей для повреждения остаточных репликационно-компетентных нуклеиновых кислот.

[0620] В определенных аспектах препарат экзосом подвергается гамма-облучению с применением дозы облучения более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 кГр.

[0621] В определенных аспектах препарат экзосом подвергается облучению рентгеновскими лучами с применением дозы облучения более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более 10 000 мЗв.

VI. Наборы

[0622] В данном документе также предложены наборы, содержащие одну или более экзосом, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающая один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одна или более экзосом, предложенных в данном документе, и необязательно инструкция по использованию. В некоторых аспектах наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит инструкции по введению ВВ в соответствии с любым описанным в данном документе способом. В некоторых аспектах набор предназначен для лечения заболевания или патологического состояния, связанного с гемопоэзом. В некоторых аспектах набор представляет собой диагностический набор.

VII. Способы получения ВВ

[0623] В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к способам получения ВВ, описанных в данном документе. В некоторых аспектах способ включает: получение ВВ, например экзосомы, из клетки-продуцента, при этом клетка-продуцент содержит один или более компонентов ВВ, например, экзосомы (например, ASO); и необязательно выделение полученной ВВ, например, экзосомы. В некоторых аспектах способ включает: модификацию клетки-продуцента путем введения одного или более компонентов ВВ, описанных в данном документе (например, ASO); получение ВВ, например экзосомы, из модифицированной клетки-продуцента; и необязательно выделение полученной ВВ, например, экзосомы. В дополнительных аспектах способ включает: получение ВВ из клетки-продуцента; выделение полученной ВВ; и модификацию выделенной ВВ. В некоторых аспектах способ дополнительно включает включение выделенного ВВ в фармацевтическую композицию.

VII.A. Способы модификации клетки-продуцента

[0624] Как описано выше, в некоторых аспектах способ получения ВВ включает модификацию клетки-продуцента одним или более фрагментами (например, ASO). В определенных аспектах один или более фрагментов содержат ASO. В некоторых аспектах один или более фрагментов дополнительно содержат каркасный фрагмент, описанный в

данном документе (например, каркас X или каркас Y).

[0625] В некоторых аспектах клетка-продуцент может представлять собой клетку из линии клеток млекопитающих, линии клеток растений, линии клеток насекомых, линии клеток грибов или линии прокариотических клеток. В определенных аспектах клетка-продуцент представляет собой клетку из линии клеток млекопитающих. Неограничивающие примеры клеточных линий млекопитающих включают: линию клеток эмбриональной почки человека (НЕК), линию клеток яичника китайского хомячка (СНО), линию клеток HT-1080, линию клеток HeLa, линию клеток PERC-6, линию клеток CEVEC, линию клеток фибробластов, линию клеток амниоцитов, линию эпителиальных клеток, линию клеток мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и их комбинации. В определенных аспектах линия клеток млекопитающих включает клетки НЕК-293, клетки фибробластов крайней плоти человека BJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN[®], клетки амниоцитов CAP[®], жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1 или их комбинации. В некоторых аспектах клетка-продуцент является первичной клеткой. В определенных аспектах первичная клетка может представлять собой первичную клетку млекопитающего, первичную клетку растения, первичную клетку насекомого, первичную клетку грибов или первичную прокариотическую клетку.

[0626] В некоторых аспектах клетка-продуцент не является иммунной клеткой, такой как антигенпрезентирующая клетка, Т-клетка, В-клетка, натуральная клетка-киллер (NK-клетка), макрофаг, Т-хелпер или регуляторная Т-клетка (Трег). В других аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой (например, дендритными клетками, макрофагами, В-клетками, тучными клетками, нейтрофилами, клеткой Купфера — Бровича или клеткой, полученной из любых таких клеток).

[0627] В некоторых аспектах один или более фрагментов могут представлять собой трансген или мРНК и введены в клетку-продуцент путем трансфекции, вирусной трансдукции, электропорации, экстррузии, обработки ультразвуком, слияния клеток или других способов, которые известны специалистам в данной области техники.

[0628] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством трансфекции. В некоторых аспектах один или более фрагментов могут быть введены в подходящие клетки-продуценты с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Parapetrou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). В некоторых аспектах катионные липиды образуют комплексы с одним или более фрагментами за счет зарядовых взаимодействий. В некоторых из этих аспектов положительно заряженные комплексы связываются с отрицательно заряженной поверхностью клетки и поглощаются клеткой посредством эндоцитоза. В некоторых

других аспектах для трансфекции клеток-продуцентов может быть использован катионный полимер. В некоторых из этих аспектов катионный полимер представляет собой полиэтиленимин (PEI). В определенных аспектах химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрэн, могут использоваться для введения одного или более фрагментов в клетки-продуценты. Один или более фрагментов также могут быть введены в клетку-продуцент с использованием физического метода, такого как трансфекция, опосредованная частицами, «генная пушка», биолистика или технология бомбардировки частицами (Parapetrou *et al.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). Для оценки эффективности трансфекции клетки-продуцента можно использовать репортерный ген, такой как, например, бета-галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок.

[0629] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством вирусной трансдукции. В качестве носителей для переноса генов можно использовать ряд вирусов, включая вирус мышинного лейкоза (MMLV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус простого герпеса (HSV), лентивирусы и спумавирусы. Опосредованные вирусами носители для переноса генов содержат векторы на основе ДНК-вирусов, таких как аденовирус, аденоассоциированный вирус и вирус герпеса, а также векторы на основе ретровирусов.

[0630] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством электропорации. Электропорация создает переходные поры в клеточной мембране, что позволяет вводить в клетку различные молекулы. В некоторых аспектах ДНК и РНК, а также полипептиды и неполипептидные терапевтические агенты могут быть введены в клетку-продуцент посредством электропорации.

[0631] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством микроинъекции. В некоторых аспектах для введения одного или более фрагментов в клетку-продуцент на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

[0632] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством экструзии.

[0633] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством обработки ультразвуком. В некоторых аспектах клетку-продуцент подвергают воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение клеточной мембраны, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0634] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством слияния клеток. В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят

путем электрического слияния клеток. В других аспектах для слияния клеток-продуцентов используют полиэтиленгликоль (PEG). В дополнительных аспектах для слияния клеток-продуцентов используют вирус Сендай.

[0635] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем гипотонического лизиса. В таких аспектах клетка-продуцент может подвергаться воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать один или более фрагментов. В других аспектах для набухания клетки-продуцента и для создания пор в мембране клетки-продуцента может использоваться контролируемый диализ против гипотонического раствора. Затем клетка-продуцент подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[0636] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем обработки детергентом. В определенных аспектах клетку-продуцент обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает мембрану клетки-продуцента, создавая поры, позволяющие загружать один или более фрагментов. После загрузки клеток-продуцентов детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[0637] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором. В определенных аспектах клетки-продуценты имеют поверхностный рецептор, который при связывании с одним или более фрагментами вызывает интернализацию рецептора и связанных фрагментов.

[0638] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем фильтрации. В определенных аспектах клетки-продуценты и один или более фрагментов могут быть пропущены через фильтр с размером пор, меньшим, чем у клетки-продуцента, что вызывает временное разрушение мембраны клетки-продуцента и позволяет одному или более фрагментам проникать в клетку-продуцент.

[0639] В некоторых аспектах клетку-продуцент подвергают нескольким циклам замораживания-размораживания, что приводит к разрушению клеточной мембраны и позволяет загружать один или более фрагментов.

VII.B. Способы модификации ВВ, например, экзосомы

[0640] В некоторых аспектах способ получения ВВ, например, экзосомы, включает модификацию выделенной ВВ путем непосредственного введения одного или более фрагментов во ВВ. В определенных аспектах один или более фрагментов содержат ASO. В некоторых аспектах один или более фрагментов содержат каркасный фрагмент, описанный в данном документе (например, каркас X или каркас Y).

[0641] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ путем трансфекции. В некоторых аспектах один или более фрагментов могут быть введены во ВВ с использованием синтетических макромолекул, таких как катионные липиды и полимеры (Parapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). В определенных аспектах химические вещества, такие как фосфат кальция, циклодекстрин или полибрэн, могут использоваться для введения одного или более фрагментов во ВВ.

[0642] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ путем электропорации. В некоторых аспектах ВВ подвергают воздействию электрического поля, которое вызывает образование временных отверстий в мембране ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0643] В определенных аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ посредством микроинъекции. В некоторых аспектах для введения одного или более фрагментов ВВ на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

[0644] В определенных аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ посредством экструзии.

[0645] В определенных аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ посредством обработки ультразвуком. В некоторых аспектах ВВ воздействуют звуковыми волнами высокой интенсивности, вызывающими временное разрушение мембраны ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

[0646] В некоторых аспектах один или более фрагментов могут быть конъюгированы с поверхностью ВВ. Конъюгирование может быть достигнуто химическим или ферментативным способами, известными в данной области техники.

[0647] В некоторых аспектах ВВ содержит один или более фрагментов, которые химически конъюгированы. Химическая конъюгация может быть достигнута путем ковалентного связывания одного или более фрагментов с другой молекулой с применением линкера или без него. Образование таких конъюгатов находится в компетенции специалистов в данной области, и известны различные методы выполнения конъюгации, при этом выбор конкретной методики определяется материалами, которые подлежат конъюгации. В определенных аспектах полипептиды конъюгированы с ВВ. В некоторых аспектах неполипептиды, такие как липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы, являются конъюгированными с ВВ.

[0648] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ путем гипотонического лизиса. В таких аспектах ВВ продуцент может подвергаться воздействию буфера с низкой ионной силой, что приводит к разрыву в ней и позволяет загружать один

или более фрагментов. В других аспектах контролируемый диализ против гипотонического раствора может использоваться для набухания ВВ и для создания пор в мембране ВВ. ВВ подвергается воздействию условий, которые позволяют повторно герметизировать мембрану.

[0649] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ путем обработки детергентом. В определенных аспектах внеклеточные везикулы обрабатывают мягким детергентом, который временно нарушает работу мембраны ВВ, создавая поры, позволяющие загружать один или более фрагментов. После загрузки ВВ детергент вымывают, таким образом герметизируя мембрану.

[0650] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных аспектах ВВ имеют поверхностный рецептор, который при связывании с одним или более фрагментами вызывает интернализацию рецептора и связанных фрагментов.

[0651] В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят во ВВ путем механического воздействия. В некоторых аспектах внеклеточные везикулы можно бомбардировать одним или более фрагментами, прикрепленным к тяжелой или заряженной частице, такой как золотые микроносители. В некоторых из этих аспектов частица может быть механически или электрически ускорена, так что она проходит через мембрану ВВ.

[0652] В некоторых аспектах внеклеточные везикулы подвергают нескольким циклам замораживания-оттаивания, что приводит к разрушению мембраны ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

VII.C. Способы выделения ВВ, например, экзосомы

[0653] В некоторых аспектах способы получения ВВ, описанных в данном документе, включают выделение ВВ из клеток-продуцентов. В определенных аспектах ВВ высвобождаются клеткой-продуцентом в среду для культивирования клеток. Предполагается, что все известные способы выделения ВВ считаются подходящими для применения в настоящем изобретении. Например, для выделения ВВ из среды или другого исходного материала могут быть использованы их физические свойства, включая разделение на основе электрического заряда (например, электрофоретическое разделение), размера (например, фильтрация, молекулярное просеивание и т. п.), плотности (например, обычное или градиентное центрифугирование), постоянной Сведберга (например, осаждение с применением внешней силы или без нее и т. п.). Альтернативно или дополнительно, выделение может быть основано на одном или более биологических свойствах и включать методы, в которых могут использоваться поверхностные маркеры

(например, для преципитации, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания с лигандом, неспецифического связывания с лигандом, аффинной очистки и т.д.).

[0654] Выделение и обогащение могут быть выполнены обычным и неселективным способом, обычно включая последовательное центрифугирование. Альтернативно, выделение и обогащение могут быть выполнены более специфичным и селективным способом, как с использованием ВВ или с использованием поверхностных маркеров, специфичных для клеток-продуцентов. Например, специфические поверхностные маркеры могут быть использованы при иммунопреципитации, сортировке FACS, аффинной очистке, магнитном разделении с лигандами, связанными с гранулами.

[0655] В некоторых аспектах для выделения ВВ можно использовать эксклюзионную хроматографию. Методы эксклюзионной хроматографии известны в данной области техники. В данном документе представлены иллюстративные неограничивающие методики. В некоторых аспектах выделяют фракцию пустотного объема, которая содержит представляющие интерес ВВ. Кроме того, в некоторых аспектах ВВ могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения методами центрифугирования (одной или нескольких хроматографических фракций), как это общеизвестно в данной области техники. В некоторых аспектах, например, центрифугирование в градиенте плотности можно использовать для дальнейшего выделения внеклеточных везикул. В определенных аспектах может быть желательно дополнительно отделить ВВ, полученные из клеток-продуцентов от ВВ, полученных из другого источника. Например, ВВ, полученные из клетки-продуцента, могут быть отделены от ВВ, полученных не из клеток-продуцентов, путем захвата на иммуносорбенте с использованием антигена и антитела, специфичного для клетки-продуцента.

[0656] В некоторых аспектах выделение ВВ может включать комбинации методов, которые включают, без ограничений, дифференциальное центрифугирование, мембранную фильтрацию на основе размеров, иммунопреципитацию, сортировку методом проточной цитометрии и магнитную сепарацию.

[0657] Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985)

DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* Патент США № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) и Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

VIII. Способы применения

[0658] В определенных аспектах данное изобретение предлагает способы предотвращения и/или лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту ВВ (например, экзосом), описанных в данном документе (например, содержащих ASO по настоящему изобретению). Как описано в данном документе, ASO, подходящие для настоящего изобретения, могут специфически гибридизоваться с одной или более областями транскрипта *CEBP/β* (например, пре-мРНК или мРНК), что приводит к снижению и/или ингибированию экспрессии белка *CEBP/β* в клетке. Соответственно, ВВ (например, экзосомы), содержащие такой ASO (например, ВВ, описанные в данном документе), могут быть полезны для профилактики и/или лечения любого заболевания или нарушения, связанного с повышенной экспрессией белка *CEBP/β*.

[0659] В некоторых аспектах заболевание или нарушение, которое можно лечить настоящими способами, включает злокачественное новообразование. В некоторых аспектах злокачественное новообразование связано с повышенной экспрессией белка *CEBP/β*. Неограничивающие примеры злокачественных новообразований, которые можно лечить с помощью настоящего изобретения, включают колоректальный рак, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)), рак поджелудочной железы, лейкемию, рак матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак желчных протоков, рак желудка, или любую их комбинацию.

[0660] При введении субъекту, страдающему злокачественным новообразованием, в определенных аспектах ВВ (например, экзосомы) по настоящему изобретению могут

активировать иммунный ответ и усиливать нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта. В некоторых аспектах злокачественное новообразование, подлежащее лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или так называемые «горячие опухоли» или «воспалительные опухоли». В некоторых аспектах злокачественное новообразование, подлежащее лечению, характеризуется низкими уровнями или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли или так называемые «холодные опухоли» или «невоспалительные опухоли». В некоторых аспектах ВВ вводится в количестве и в течение времени, достаточных для превращения «холодной опухоли» в «горячую опухоль», т.е. указанное введение приводит к инфильтрации лейкоцитов (таких как Т-клеток) в микроокружение опухоли. В определенных аспектах злокачественное новообразование представляет собой рак мочевого пузыря, рак шейки матки, почечно-клеточный рак, рак яичек, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак яичников, лимфома, рак печени, глиобластома, меланома, миелома, лейкемия, рак поджелудочной железы или их комбинации. Другими словами, термин «дистальная опухоль» или «отдаленная опухоль» относится к опухоли, которая распространилась из исходной (или первичной) опухоли в отдаленные органы или отдаленные ткани, например, лимфатические узлы. В некоторых аспектах ВВ по настоящему изобретению приводят к лечению опухоли после метастатического распространения.

[0661] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят внутривенно в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в вену субъекта.

[0662] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят внутриартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

[0663] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят субъекту с помощью интратекального введения. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят путем интратекального введения с последующим приложением механической конвективной силы к туловищу. См., например, Verma et al., *Alzheimer's Dement.* 12:e12030 (2020); который полностью включен в данный документ посредством ссылки). Таким образом, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам введения ВВ, например, экзосомы, субъекту, нуждающемуся в этом, включающим введение ВВ, например, экзосомы, субъекту посредством интратекальной инъекции с последующим применением механической конвективной силы к туловищу субъекта. В некоторых аспектах механическая конвективная сила достигается с помощью высокочастотного устройства для очистки

грудной клетки или пояснично-грудного отдела дыхательной системы (например, Smart Vest или Smart Wrap, ELECTROMED INC, Нью-Прага, Миннесота, США). В некоторых аспектах механическая конвективная сила, например, колеблющийся жилет, облегчает распространение введенных интратекально ВВ, например, экзосом, дальше по нерву, что позволяет улучшить доставку ВВ, например, экзосом, в нервы.

[0664] В некоторых аспектах внутри- и транскомпарментальное биораспределение экзосом можно регулировать с помощью экзогенных экстракорпоральных сил, действующих на субъекта после компарментальной доставки экзосом. Это включает приложение механической конвекции, например, путем применения перкуссии, вибрации, встряхивания или массажа части тела или всего тела. Например, после интратекального введения приложение к грудной клетки вибрационного воздействия с помощью нескольких средств, включая вибрирующий механический жилет, может обеспечить биораспределение экзосом вдоль оси центральной нервной системы или вдоль черепных и спинномозговых нервов, что может быть полезным при лечении нервных расстройств с помощью экзосом, несущих лекарственное средство.

[0665] В некоторых аспектах приложение внешних механических конвективных сил через вибрирующий жилет или другие подобные средства можно использовать для удаления экзосом и другого материала из спинномозговой жидкости интратекального пространства и выведения в периферический кровоток. Этот аспект может помочь удалить эндогенные токсичные экзосомы и другие вредные макромолекулы, такие как бета-амилоид, тау-белок, альфа-синуклеин, TDP43, нейрофиламент и избыток спинномозговой жидкости из интратекального пространства в периферию для элиминации.

[0666] В некоторых аспектах экзосомы, доставляемые интрацеребровентрикулярным путем, могут перемещаться по всей оси центральной нервной системы путем одновременного включения люмбальной пункции и обеспечения вентрикуло-люмбальной перфузии, при которой дополнительная жидкость вливается в желудочки после введения экзосом, при этом обеспечивая отток существующего нейроаксиального столба СМЖ, которые представляет собой люмбальную пункцию. Вентрикуло-люмбарная перфузия может позволить экзосоме, введенной интрацеребровентрикулярно, распространиться по всей оси центральной нервной системы и полностью покрыть субарахноидальное пространство для лечения злокачественного новообразования мозговых оболочек и других заболеваний.

[0667] В некоторых аспектах применение внешнего экстракорпорального сфокусированного ультразвука, тепловой энергии (тепла) или холода можно использовать для манипулирования компарментной фармакокинетикой и свойствами высвобождения

лекарственного средства экзосомами, сконструированными таким образом, чтобы быть чувствительными к этим явлениям.

[0668] В некоторых аспектах внутрикомпарментным поведением и биораспределением экзосом, сконструированных таким образом, чтобы содержать парамагнитный материал, можно управлять с помощью внешнего приложения магнитов или магнитного поля.

[0669] В некоторых аспектах ВВ вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (СМЖ).

[0670] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят интратуморально в одну или более опухолей субъекта.

[0671] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосомы) вводят субъекту с помощью интраназального введения. В некоторых аспектах ВВ можно инсуффлировать в нос в форме для местного введения или системного введения. В некоторых аспектах ВВ вводят в виде назального спрея.

[0672] В некоторых аспектах ВВ (например) экзосомы вводят субъекту с помощью интраперитонеального введения. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в брюшину субъекта. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ лимфатических сосудах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ одном или более лимфатических узлах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в одном или более шейных лимфатических узлах, паховых лимфатических узлах, средостенных лимфатических узлах или грудных лимфатических узлах. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в поджелудочной железе.

[0673] В некоторых аспекта ВВ, например, экзосомы вводят субъекту с помощью периокулярного введения. В некоторых аспектах вводят инъекции в периокулярные ткани. Периокулярное введение лекарственного средства включает пути субконъюнктивального, переднего субтенонового, заднего субтенонового и ретробульбарного введения.

[0674] Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0675] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

VIII.A. Способы лечения рака мозга

[0676] Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения рака мозга у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых аспектах способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества ВВ, например, экзосомы, содержащей ASO, как описано в данном документе. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, способна целенаправленно доставлять терапевтический агент, например, ASO, как описано в данном документе, в ЦНС для лечения рака головного мозга. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, способна активировать иммунный ответ у субъекта, тем самым усиливая иммунный ответ субъекта против нейроиммунологического расстройства. В некоторых аспектах композицию вводят субъекту интратекально или интратекально.

[0677] Также в данном документе предусмотрены способы предотвращения метастазирования опухоли головного мозга у субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиций, описанных в данном документе, при этом композиция способна предотвращать рост опухоли головного мозга в одном месте у субъекта от стимуляции роста одной или более опухолей в другом месте у субъекта. В некоторых аспектах композицию вводят интратекально или интратекально в первую опухоль в одном месте, и композиция, вводимая в первую опухоль, предотвращает метастазирование одной или более опухолей во втором месте.

[0678] В некоторых аспектах введение ВВ, например, экзосомы, описанной в данном документе, ингибирует и/или уменьшает рост опухоли головного мозга у субъекта. В некоторых аспектах рост опухоли головного мозга (например, объем или массу опухоли) снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на около 100% по сравнению с эталоном (например, объем опухоли у соответствующего субъекта после введения ВВ, например, экзосомы, без ASO).

[0679] Используемый в данном документе термин «опухоль головного мозга» относится к аномальному росту клеток в головном мозге (например, в мозговых оболочках). Опухоли головного мозга можно разделить на первичные и вторичные опухоли головного мозга. «Первичная опухоль головного мозга» относится к опухолям головного мозга, возникающим внутри головного мозга. «Вторичная опухоль головного мозга» относится к опухолям головного мозга, которые возникают в результате образования раковых клеток в

первичных участках вне головного мозга, которые метастазируют (т.е. распространяются) в головной мозг. Если не указано иное, термин «опухоль головного мозга» может относиться как к первичным, так и к вторичным опухолям головного мозга.

[0680] В некоторых аспектах опухоль головного мозга, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает акустическую невриному, карциному сосудистого сплетения, краниофарингиому, эмбриональную опухоль, глиому, медуллобластому, менингиому, опухоль головного мозга у детей, пинеобластому, опухоль гипофиза или их комбинации.

[0681] В некоторых аспектах опухоль головного мозга, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает глиому. Используемый в данном документе термин «глиома» относится к типу опухоли, которая начинается в глиальных клетках головного мозга или позвоночника. В некоторых аспектах глиому можно классифицировать по определенному типу клеток, с которыми они имеют общие гистологические признаки. Соответственно, глиому, которую можно лечить с помощью ВВ (например, экзосомы), описанные в данном документе, можно классифицировать как эпендимому (эпендимальные клетки), астроцитому (астроциты), олигодендроглиому (олигодендроциты), глиому ствола мозга (например, диффузную глиому ствола головного мозга), глиому зрительного нерва, смешанную глиому, олигоастроцитому или любую их комбинацию. В некоторых аспектах астроцитомы включает мультиформную глиобластому (GBM).

[0682] Описанные в данном документе глиомы могут быть дополнительно классифицированы в соответствии с их степенью, которая определяется патологоанатомической оценкой опухоли. В некоторых аспектах нейропатологическую оценку и диагностику образцов опухоли головного мозга проводят в соответствии с Классификацией ВОЗ опухолей центральной нервной системы. В некоторых аспектах глиома, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает глиому низкой степени злокачественности. «Глиома низкой степени злокачественности» [степень II согласно ВОЗ] хорошо дифференцирована (не анапластична) и, как правило, проявляет доброкачественные тенденции и предвещает лучший прогноз для пациента. Однако в некоторых аспектах глиомы низкой степени злокачественности могут иметь одинаковую частоту рецидивов и увеличиваться в степени с течением времени, поэтому их следует классифицировать как злокачественные. В некоторых аспектах глиома, которую можно лечить, представляет собой глиому высокой степени злокачественности. «Глиомы высокой степени злокачественности» [степени III–IV по ВОЗ] являются недифференцированными или анапластическими, злокачественными и имеют худший прогноз. Из многочисленных используемых систем классификации наиболее распространенной является система

классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для астроцитомы, в соответствии с которой опухоли классифицируются от I (наименее запущенное заболевание — лучший прогноз) до IV (самое запущенное заболевание — наихудший прогноз). Неограничивающие примеры глиом высокой степени злокачественности включают анапластические астроцитомы и мультиформную глиобластому.

[0683] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанную в данном документе, можно использовать для лечения глиомы степени I, степени II, степени III, степени IV или их комбинаций, как определено в соответствии с системой классификации ВОЗ. В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанную в данном документе, можно использовать для лечения любого типа глиом.

[0684] В некоторых аспектах глиома, которую можно лечить настоящими способами, представляет собой диффузную глиому ствола головного мозга (DIPG), тип глиомы ствола головного мозга. Диффузная глиому ствола головного мозга в первую очередь поражает детей, обычно в возрасте от 5 до 7 лет. Медиана времени выживаемости при DIPG составляет менее 12 месяцев. Операция по удалению опухоли обычно невозможна или не рекомендуется при DIPG. По своей природе эти опухоли диффузно разрастаются по всему стволу мозга, прорастая между нормальными нервными клетками.

[0685] В других аспектах глиома, которую можно лечить способами по настоящему изобретению, представляет собой глиому с мутацией IDH1 и IDH2. Пациенты с глиомой, несущие мутации IDH1 или IDH2, имеют относительно благоприятную выживаемость по сравнению с пациентами с глиомой с генами IDH1/2 дикого типа. При глиоме III степени ВОЗ глиома с мутацией IDH1/2 имеет средний прогноз ~ 3,5 года, тогда как глиома дикого типа IDH1/2 имеет плохой прогноз со средней общей выживаемостью 1,5 года. При глиобластоме разница больше.

[0686] В некоторых аспектах нейроиммунологическое нарушение, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает неопластический менингит. Используемый в данном документе термин «неопластический менингит» относится к опухоли, которая распространилась из исходного очага опухоли в твердую мозговую оболочку и лептоменингеальные оболочки, представляющие собой тонкие тканевые оболочки, покрывающие головной и спинной мозг. В некоторых аспектах также могут быть вовлечены соединительнотканые оболочки нервов, которые простираются от мозговых оболочек до нервов и в них. Неопластический менингит также известен как карциноматозный менингит, лептоменингеальная карцинома, лептоменингеальный карциноматоз, лептоменингеальные метастазы, лептоменингеальная болезнь (LMD),

локальное новообразование мозговых оболочек, менингеальный карциноматоз и менингеальные метастазы. В определенных аспектах неопластический менингит вызывается лейкемией. В некоторых аспектах неопластический менингит вызывается меланомой, раком молочной железы, легкого, желудочно-кишечного тракта или их комбинациями. В определенных аспектах неопластический менингит вызывается глиомой.

[0687] В некоторых аспектах ВВ (например, экзосома), описанная в данном документе, может повторно активировать макрофаги (например, в нервной системе) и/или устранять анергию нервной системы. В некоторых аспектах повторная активация макрофагов (например, в нервной системе) и/или устранение анергии нервной системы может помочь в лечении нейроиммунологического нарушения (например, путем устранения неопластических или инфекционных поражений в нервной системе).

[0688]

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Анализ in vitro снижения уровня мРНК и/или белка

[0689] Иллюстративные ASO, описанные в данном документе, были разработаны для специфического нацеливания на транскрипт *CEBP/β* (Фиг. 1). Описанные ASO будут протестированы на их способность подавлять экспрессию мРНК *CEBP/β* и/или белка *CEBP/β* в репортерных клеточных линиях, содержащих последовательность, кодирующую человеческий *CEBP/β*, расположенную против хода транскрипции относительно репортера. *CEBP/β*-специфическая кРНК будет использоваться в качестве положительного контроля.

[0690] Вкратце, репортерные клеточные линии, экспрессирующие *CEBP/β*, будут выращивать в среде для культивирования клеток и высевать на 96-луночный планшет. Затем клетки обрабатывают различными концентрациями ВВ (например, экзосомами), содержащими одну или более ASO, описанных в данном документе («EV-ASO»). Способы получения таких ВВ представлены в другом месте настоящего изобретения. Приблизительно через 3 дня после обработки EV-ASO клетки собирают и из клеток выделяют РНК и/или белок. Затем уровни экспрессии мРНК *CEBP/β* и/или белка *CEBP/β* в клетках будут количественно определены с использованием таких анализов, как количественная ПЦР и вестерн-блоттинг.

[0691] Ведущий ASO будет выбран первым с использованием селекции *in silico* на основе перекрестной реактивности альтернативных транскриптов, перекрестной реактивности видов, специфичности в отношении представляющего интерес гена, наличия SNP в ASO, длины ASO, разнообразия расположения, токсичных мотивов и предсказанной аффинности связывания. Затем ASO будут подвергать скринингу на способность подавлять

(как минимум на 50% при 2 нМ и менее чем на 20% при нокдауне GAPDH при 20 нМ) экспрессию гена-мишени в клеточных линиях, трансфицированных целевой последовательностью (мРНК *CEBP/β*). Затем ASO будут анализировать на способность вызывать нокдаун целевого гена в первичных макрофагах, по меньшей мере, от двух доноров. Также будут наблюдаться стабильность экспрессии конститутивных генов, разнообразие расположения последовательностей и экспрессия предсказанных побочных эффектов после лечения. Оптимальные ASO, обладающие самой высокой репрограммирующей активностью (изменения экспрессии генов, продукция цитокинов, супрессия Т-клеток) в первичных макрофагах, будут выбраны в качестве перспективных ASO.

Пример 2. Конструирование экзосомы

[0692] Для создания экзосом, описанных в данном документе, будет использоваться клеточная линия эмбриональной почки человека (НЕК) (например, НЕК293SF). Клетки будут стабильно трансфицированы каркасом X, каркасом Y и/или заякоривающим фрагментом, связанным с представляющим интерес агентом.

[0693] После трансфекции клетки НЕК выращивают до высокой плотности в химически определенной среде в течение 7 дней. Затем кондиционированные среды для культивирования клеток собирают и центрифугируют при 300–800 x g в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и клеточного дебриса. В супернатант среды добавляют 1000 Ед/л реагента BENZONASE® и инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 1 часа. Супернатант будет собран и центрифугирован при 16000 x g в течение 30 минут при 4 °С для удаления остаточного клеточного дебриса и других крупных загрязнителей. Затем супернатант будет подвергнут ультрацентрифугированию при 133900 x g в течение 3 часов при 4 °С для осаждения экзосом. Супернатант удаляют, а любые остаточные среды удаляют со дна пробирки. Осадок ресуспендируют в 200-1000 мкл PBS (-Ca-Mg).

[0694] Для дальнейшего обогащения популяций экзосом осадок будут обрабатывать с помощью очистки в градиенте плотности (сахароза или OPTIPREP™).

[0695] Для отделения фракции экзосом градиент будут центрифугировать при 200000 × g в течение 16 часов при 4 °С в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti.

[0696] С поверхностного слоя будут осторожно удалять слой экзосом, разводить его в ~32,5 мл PBS в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и снова подвергать ультрацентрифугированию при 133900 × g в течение 3 часов при 4 °С для осаждения

очищенных экзосом. Полученный осадок будет ресуспендировать в минимальном объеме PBS (~ 200 мкл) и хранить при 4 °C.

[0697] Для градиента OPTIPREP™ будут готовить 3-уровневый стерильный градиент с использованием одинаковых объемов 10%, 30% и 45% реагента OPTIPREP™ в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, для ротора SW 41 Ti. Осадок будут добавлять к градиенту OPTIPREP™ и ультрацентрифугировали при 200000 × g в течение 16 часов при 4 °C для отделения фракции экзосом. Экзосомный слой затем будет осторожно собирать из верхних ~ 3 мл из пробирки.

[0698] Фракцию экзосом будут разводить в ~32 мл PBS в 38,5 мл пробирке Ultra-Clear (344058) и подвергать ультрацентрифугированию при 133900 g в течение 3 часов при 4 °C для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем будут ресуспендировать в минимальном объеме PBS (~ 200 мкл) и хранили при 4 °C до возможности использования.

Пример 3: Дизайн ASO

[0699] Мышиные и человеческие ASO были сконструированы для нацеливания на экспрессию *CEBP/β* (идентификационный номер гена 1051). Целевые последовательности были выбраны с использованием эталонных последовательностей NM_001285878.1 для человеческого *CEBP/β* и NM_009883.4 для мышиного *CEBP/β*. Список возможных ASO был создан для каждого гена путем заполнения ASO по всей длине формирующегося транскрипта. Были созданы ASO, имеющие 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов в длину.

[0700] ASO были ранжированы на основе следующих свойств: должны совпадать со всеми формами сплайсинга; низкая энергия самодимеризации (целевая активность); нет мотива GGGG (может вызвать проблемы с синтезом); менее 3 динуклеотидов CpG в олиго (потенциальная иммуностимуляция); менее 8 оснований палиндромной последовательности (потенциальная димеризация и иммуностимуляция); более 2 несоответствий и не более 17 смежных оснований при нецелевом попадании в любой ген, включая известные микроРНК и днРНК, а также как формирующиеся, так и зрелые транскрипты; отсутствие дублирования с повторяющимися последовательностями; и отсутствие совпадения с SNP, превышающим или равным 0,01 MAF в общей популяции. Дополнительные критерии включали прогнозируемую перекрестную реактивность видов (например, транскрипты человека, яванского макака, резуса, крысы, мыши); и (OT) фильтр нецелевых попаданий менее или равный 3 несоответствиям (мм) в зрелых транскриптах, менее или равный 3 мм в транскриптах днРНК, менее или равный 3 мм в микроРНК и менее или равный 3 мм в формирующихся транскриптах.

Пример 4: Загрузка ASO в экзосомы

[0701] Мышам BALB/c с подкожными (п/к) опухолями CT26 внутривенно вводили однократную дозу экзосом 2E11, нагруженных репортерным ASO («exo ASO»; 8 мкг флуоресцентно меченного Cy5 exoASO), или однократную дозу (8 мкг) свободного репортерного ASO («свободного ASO»). Через один час после введения наблюдалось повышенное поглощение exo-ASO в CD11b⁺ дендритных клетках, моноцитах и mMDSC в крови (Фиг. 2A); клетки Купфера в печени (Фиг. 2B); макрофаги тяжелой красной пульпы селезенки, моноциты и mMDSC в селезенке (Фиг. 2C); и дендритные клетки и mMDSC в опухолевой ткани (Фиг. 2D-2E), о чем свидетельствует СИФ, относительно локализации свободного ASO. Поглощение exo-ASO также было выше в костном мозге (Фиг. 2F-2G) по сравнению с поглощением свободной ASO и отрицательных контролей (Фиг. 2H-2K) демонстрирует экспрессию родственных рецепторов PTGFRN при глиобластоме (GBM) в различных типах клеток по пяти мишеням, при этом самая высокая экспрессия присутствует в миелоидных клетках.

[0702] Мышей BALB/c с подкожными опухолями CT26 лечили однократной внутриопухолевой дозой (4 мкг) exo-ASO или свободной ASO. Через один час после введения опухоли вырезали и подвергали ферментативному расщеплению, а суспензии опухолевых клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. Поглощение exo-ASO наблюдали в опухолевых клетках, макрофагах, супрессорных клетках миелоидного происхождения и дендритных клетках (Фиг. 2L-2M; MDSC = супрессорные клетки миелоидного происхождения; mMDSC = моноцитарные MDSC; gMDSC = гранулоцитарные MDSC; cDC2 = обычные дендритные клетки 2 типа; cDC1 = обычные дендритные клетки 1) типа.

Пример 5. Exo-CEBP/β-ASO способны реполяризовать макрофаги M2

[0703] Первичные макрофаги человека поляризовали обработкой IL4/IL10/TGFβ и обрабатывали увеличивающимися концентрациями Exo-CEBP/β-ASO. Первичные макрофаги M2 человека инкубировали в течение 48 часов с эквивалентными дозами exoASO и свободного ASO, нацеленными на CEBP/β, наряду со скремблированным контролем exoASO. Анализ экспрессии генов выполняли с помощью Nanostring с использованием панели nCounter Human Myeloid Innate Immunity Panel версии 2 или с помощью мультиплексной проточной цитометрии LEGENDPLEX. *In vitro* обработка первичных макрофагов человека Exo-CEBP/β-ASO вызывает дозозависимый нокдаун CEBP/β (Фиг. 3A), соответственно, а также снижает экспрессию гена макрофага M2, CD163 (Фиг. 3B). Было обнаружено, что эффективность Exo-ASO несколько выше, чем

эффективность свободных ASO. Экспрессия различных генов M2 снижалась, а экспрессия различных генов M1 повышалась после обработки Echo-CEBP/ β -ASO (Фиг. 4A-4J и 4O). Кроме того, продукция цитокинов повышалась и подавлялась после стимуляции липополисахаридом (ЛПС) и обработки Echo-CEBP/ β -ASO (Фиг. 4K-4N).

Пример 6: Нокдаун целевого гена Echo-CEBP/ β -ASO в клетках CD11b.

[0704] *In vivo*, первичными клетками-реципиентами для Echo-CEBP/ β -ASO являются клетки CD11b. Для дальнейшего измерения поглощения и известной эффективности Echo-ASO мышей с опухолями CT26 лечили внутриопухолевой (в/о) инъекцией 4 мкг Echo-CEBP/ β -ASO или скремблированного echoASO, 3 инъекции (один раз в два дня) и умерщвляли. Затем CD11b⁺ клетки выделяли и обогащали (Фиг. 5A-5F). Опухоли CT26 лечили внутриопухолевым путем (в/о) с помощью 4 мкг echoASO C/EBP β или скремблированного echoASO, 3 инъекции (один раз в два дня). После лечения ассоциированные с опухолью миелоидные клетки выделяли с использованием CD11b-положительной селекции на магнитных частицах (обогащение 80%). Анализ экспрессии генов в ассоциированных с опухолью миелоидных клетках, обогащенных CD11b⁺, выполняли с помощью Nanostring с использованием панели nCounter Human Myeloid Innate Immunity Panel версии 2.

[0705] Хотя это и не конечная точка, объем опухоли был значительно ниже у мышей, получавших Echo-CEBP/ β -ASO, по сравнению с мышами, получавшими контроль скремблированным Echo-ASO, а у мышей, получавших Echo-CEBP/ β -ASO, опухоли, как правило, были меньше, чем у мышей, которые получали контроль свободным ASO (Фиг. 5G). Нокдаун гена-мишени Echo-ASO был более выражен в CD11b-обогащенных клетках, чем в необогащенных клетках после обработки Echo-CEBP/ β -ASO (Фиг. 6A). Кроме того, Echo-ASO были эффективны в снижении экспрессии Arg1 в большей степени в обогащенных CD11b клетках, чем в необогащенных клетках, как было измерено с помощью количественной ПЦР (Фиг. 6B).

[0706] Обогащенные CD11b клетки, обработанные Echo-CEBP/ β -ASO, также показали перепрограммирование макрофагов, о чем свидетельствует повышение экспрессии различных генов M1 и снижение экспрессии различных генов M2 (Фиг. 7A-7W).

Пример 7: Лечение фиброза с помощью Echo-CEBP/ β -ASO.

[0707] Чрезмерная активация макрофагов M2 приводит к непрерывной продукции TGF β и факторов роста, которые способствуют пролиферации миофибробластов, активации EMT/EndoMT и отложению внеклеточного матрикса. Макрофаги M2 являются переломной точкой между заживлением раны и обострением профибротического процесса.

Чтобы проверить, можно ли использовать Echo-CEBP/β-ASO для лечения фиброза у субъекта, первичные макрофаги M2 человека поляризовали обработкой IL-13/TGFβ, которые являются движущими факторами фиброза. Затем клетки подвергали воздействию возрастающих концентраций свободного CEBP/β-ASO (Фиг. 8А и 8В) или Echo-CEBP/β-ASO (Фиг. 8А и 8В); и анализировали экспрессию CEBP/β (Фиг. 8В) или экспрессию TGFβ1 (Фиг. 8В).

[0708] Чтобы проверить возможность доставки Echo-ASO *in vivo* с использованием интраназального введения, мышам в возрасте 6 недель вводили блеомицин, чтобы индуцировать легочный фиброз. Через две недели мышам интраназально вводили Echo-ASO-Cy5, и мышей умерщвляли через 4 часа после введения. У индуцированных блеомицином мышей, которым вводили Echo-ASO-Cy5, наблюдался повышенный общий поток Cy5 по сравнению с мышами, которым не вводили Echo-ASO-Cy5 («наивными»), и по сравнению с мышами, не получавшими лечение, которым вводили отрицательный контроль PBS («-С») (Фиг. 9).

[0709] Поглощение экзосом наблюдали макрофагами легких и эндотелиальными клетками легочных капилляров как в нормальных легких, так и в легочных тканях с индуцированным легочным фиброзом (Фиг. 10А-10Н и 11А-11Н).

Пример 8: Лечение мышинной модели гепатокарциномы с использованием Echo-CEBP/β-ASO.

[0710] Мышей Heral-6 будут использовать для проверки эффективности Echo-CEBP/β-ASO *in vivo* в отношении лечения опухоли. Линия Heral-6 представляет собой ортотопическую мышиную модель гепатокарциномы. Образцы были получены от CRO и проанализированы при помощи гибридизации *in situ* на экспрессию CEBP/β (Фиг. 12А-12В).

Пример 9: Лечение мышинной модели карциномы толстой кишки с использованием Echo-CEBP/β-ASO

[0711] Опухолевые клетки СТ26 имплантировали подкожно в бока мышам BALB/c (n = 10 для каждой группы). Через восемь дней после имплантации мышам внутриопухолево вводили echoASO-CEBP/β или свободный CEBP/β ASO или внутривентриально антитела к PD1 или антитела к CSF1R (n=10 мышей в группе). В качестве контроля две группы мышей получали либо скремблированный echoASO, либо PBS. Анализ средних геометрических объемов опухоли демонстрируют, что у мышей, получавших

exoASO-CEBP/β, наблюдался очень небольшой рост опухоли в течение 30 дней после имплантации (Фиг. 13В). У мышей, получавших лечение свободным CEBP/β ASO, наблюдалось снижение роста опухоли по сравнению с мышами, получавшими лечение антителами к CSF1R. У шести из 10 мышей, получавших exo-ASO CEBP/β, наблюдался полный ответ, в то время как ни одна из мышей в других группах не достигала его (Фиг. 13С-13Н).

Пример 10: Лечение гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) в мышинной модели с использованием Exo-CEBP/β

[0712] Exo ASO 2 и свободный ASO 2 вводили путем внутривенной инъекции (в/в) в хвостовую вену здоровых самок мышей C57BL/6J (C57Bl/6Jrj). Схема лечения представлена в Таблице 7 ниже:

Таблица 7

1	8	Без лечения	-	-
2	8	Exo ASO 2	Доза №1	IV
3	8	Анти-PD-1	10	в/б
4	8	Свободный ASO 2	Доза №2	IV
5	8	Анти-CSF1R	10	в/б

[0713] При умерщвлении печень собирали, взвешивали, проводили макроскопическое исследование и оценивали на наличие видимых поражений. Одну долю собирали в RNAlater (5 объемов RNAlater на 1 объем (г) ткани), затем замораживали для анализа внутренней экспрессии генов и 2 доли для ИГХ на животное (собирали в 10% NBF в течение 24 часов при комнатной температуре, затем переносили в PBS при 4°C). Ежедневно наблюдали за жизнеспособностью и поведением животных, а в течение особо важного периода проведения эксперимента проводили ежедневное клиническое наблюдение. Массу тела измеряли не менее двух раз в неделю.

[0714] ExoASO C/EBPβ индуцирует дозозависимый нокдаун (KD) генов-мишеней в первичных макрофагах M2 человека с большей эффективностью (IC50), чем свободный ASO. Мы оценили эффективность exoASO-C/EBPβ отдельно или в сочетании с терапией

анти-PD1, как показано на Фиг. 15А-15Н. ЕхоASO C/EBPβ был так же эффективен, как и монотерапия (60% полных ответов (CR)), тогда как мкАт к PD1 или к CSFR1 не были эффективны (0% CR, Фиг. 15А-15Н). ЕхоASO-C/EBPβ в сочетании с мкАт к PD-1 приводил к большей эффективности (80% CR) и повышению выживаемости (70% на 55-й день) по сравнению с монотерапией ехоASO-C/EBPβ (50% выживаемость на 50-й день) (Фиг. 16). Стойкие противоопухолевые ответы наблюдались при терапии ехоASO, поскольку не было роста опухоли при повторном заражении у мышей, которые достигли CR против первичной опухоли. (Фиг. 17)

[0715] Мы оценили противоопухолевую эффективность с использованием ортотопической модели гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Мышам внутривенно вводили дозы: ехоASO-C/EBPβ; свободный C/EBPβ ASO; мкАт к PD1 или мкАт к CSFR1. Лечение ехоASO-C/EBPβ ослабляло опосредованное ГЦК увеличение отношения печени к массе тела ($\leq 10\%$) (Фиг. 18А-18Н) и приводило к малозаметным опухолевым поражениям или их отсутствию у 50% получавших лечение мышей (Фиг. 19А-19Е). Уменьшение опухоли дополнительно усиливалось, когда ехоASO-C/EBPβ комбинировали с антителом к PD-1, что приводило к дальнейшему ослаблению ГЦК-опосредованного увеличения размера печени (Фиг. 18Н) и процента определенных поражений (Фиг. 19В).

[0716] Напротив, увеличенное соотношение массы печени к массе тела ($\geq 10\%$) и наблюдаемые опухолевые поражения наблюдались у всех мышей (100%), получавших либо свободный ASO к C/EBPβ, либо мкАт к CSFR1. ЕхоASO C/EBPβ столь же эффективен, как и монотерапия в отношении богатых TAM опухолей при местном или системном введении (Фиг. 20). ЕхоASO-C/EBPβ обладает повышенной эффективностью при введении в комбинации с антителами к контрольным точкам.

Пример 11: Лечение мышинной модели мультиформной глиобластомы с использованием Ехо-C/EBPβ-ASO

[0717] Мышей, имеющих мультиформную глиобластому (GBM), будут лечить внутриопухолевым введением ехо-C/EBPβ-ASO или свободного C/EBPβ-ASO. В качестве контроля две группы мышей будут получать либо скремблированный ехоASO, либо PBS. Среднее геометрическое объемов опухоли будет измеряться не менее чем через 30 дней после имплантации. Будут контролировать локализацию макрофагов и экспрессию маркерных генов, включая появление инфильтрирующих опухоль макрофагов.

Пример 12: Лечение злокачественного новообразования мозговых оболочек (LMD) в мышинной модели с использованием Ехо-C/EBPβ-ASO

[0718] Мышей со злокачественным новообразованием мозговых оболочек (LMD)

будут лечить внутриопухолевым введением экзо-С/ЕВРβ-ASO или свободного С/ЕВРβ ASO. В качестве контроля две группы мышей будут получать либо скремблированный ехoASO, либо PBS. Среднее геометрическое объемов опухоли будет измеряться не менее чем через 30 дней после имплантации. Будут контролировать локализацию макрофагов и экспрессию маркерных генов, включая появление инфильтрирующих опухоль макрофагов.

Пример 13: Введение ехoСЕВР/β-ASO с помощью CIVO®

[0719] Клетки YUMM1.7 имплантировали в бока мышей C57bl/6J с последующими внутриопухолевыми микроинъекциями ехoСЕВР/β-ASO, свободного С/ЕВРβ-ASO или скремблированного ехoASO с использованием платформы Comparative In Vivo Oncology (CIVO®) от Presage Biosciences (Фиг. 21А-21G). Мышей подвергали эвтаназии через 24 часа после однократной дозы (n=6 мышей в группе). Экспрессия TNFα, CD11b, iNOS и F4/80 с помощью гибридизации in situ (ISH) через двадцать четыре часа после введения дозы показана на Фиг. 21А-21L, где каждая панель представляет собой разные места инъекции при одной и той же опухоли. Мощная индукция экспрессии маркеров макрофагов M1 TNFα (Фиг. 21I) и iNOS (Фиг. 21K) и маркера моноцитов CD11b (Фиг. 21J) наблюдалась после лечения ехoASO к СЕВРβ по сравнению со свободным ASO (Фиг. 21Е-21Н) или контролем скремблированным ехoASO (Фиг. 21А-21D). Эти данные PD указывают на поляризацию к провоспалительному фенотипу M1 с помощью нацеленных на СЕВР/β ехoASO

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0720] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в данной заявке, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения путем ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0721] Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные аспекты, приведенное выше описание не является ограничивающим. Понятно, что различные изменения могут быть сделаны без отклонения от сущности и объема изобретения. Многие изменения станут очевидными для специалистов в данной области техники после рассмотрения этого описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Внеклеточная везикула, содержащая антисмысловой олигонуклеотид (ASO – англ.: antisense oligonucleotide), который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β* (или SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13).
2. Внеклеточная везикула по п. 1, отличающаяся тем, что ASO не представляет собой TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO: 90).
3. Внеклеточная везикула по п. 1 или п. 2, которая нацелена на клетку, выбранную из группы, состоящей из макрофага, клетки-супрессора миелоидного происхождения (MDSC), моноцита, базофила, нейтрофила, эозинофила и любой их комбинации.
4. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–3, отличающаяся тем, что ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1–518 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, или нуклеотидов 521-2113 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13.
5. Внеклеточная везикула по п. 4, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*.
6. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–5, отличающаяся тем, что ASO способен снижать экспрессию белка *CEBP/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок *CEBP/β*.
7. Внеклеточная везикула по п. 6, отличающаяся тем, что экспрессия белка *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.

8. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–7, отличающаяся тем, что ASO способен снижать уровень мРНК *CEBP/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *CEBP/β*.
9. Внеклеточная везикула по п. 8, отличающаяся тем, что уровень мРНК *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.
10. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–9, отличающаяся тем, что ASO представляет собой гэдмер, миксмер или тоталмер.
11. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–10, отличающаяся тем, что ASO содержит один или более аналогов нуклеозидов.
12. Внеклеточная везикула по п. 11, отличающаяся тем, что один или более аналогов нуклеозидов включают в себя 2'-О-алкил-РНК; 2'-О-метил РНК (2'-ОМе); 2'-алкокси-РНК; 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ); 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-РНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA или бициклический аналог нуклеозида.
13. Внеклеточная везикула по п. 11 или п. 12, отличающаяся тем, что один или более аналогов нуклеозидов представляют собой модифицированный по сахару нуклеозид.
14. Внеклеточная везикула по п. 13, отличающаяся тем, что модифицированный по сахару нуклеозид представляет собой повышающий аффинность модифицированный по сахару в положении 2' нуклеозид.
15. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11–14, отличающаяся тем, что один или более аналогов нуклеозидов содержат нуклеозид, содержащий бициклический сахар.
16. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11–14, отличающаяся тем, что один или более аналогов нуклеозидов включают в себя LNA.
17. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11–16, отличающаяся тем, что один или более аналогов нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из ограниченного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-ограниченного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ), α-L-LNA, β-D-LNA, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-LNA, окси-LNA, тио-

LNA и любой их комбинации.

18. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–17, отличающаяся тем, что ASO содержит одно или более 5'-метилцитозиновых азотистых оснований.

19. Внеклеточная везикула по любому из пп. 10–18, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в (i) 5'-нетранслируемой области (UTR); (ii) кодирующей области или (iii) 3'-UTR транскрипта СЕВР/β.

20. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–19, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей (i) нуклеотиды 1–600 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотиды 100–600 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 200–600 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 300–600 SEQ ID NO: 13; (v) 400–600 SEQ ID NO: 13, (vi) нуклеотиды 500–1000 SEQ ID NO: 13; (vii) нуклеотиды 900–1200 SEQ ID NO: 13; (viii) нуклеотиды 1000–1300 SEQ ID NO: 13; (ix) нуклеотиды 1300–1500 SEQ ID NO: 13; (x) 489–649 SEQ ID NO: 13; (xi) нуклеотиды 594–728 SEQ ID NO: 13; (xii) нуклеотиды 765–700 SEQ ID NO: 13; (xiii) нуклеотиды 936–1076 SEQ ID NO: 13; (xiv) нуклеотиды 999–2068 SEQ ID NO: 13; (xv) 1203–1357 SEQ ID NO: 13; (xvi) нуклеотиды 1355–1487 SEQ ID NO: 13 (xvii) 529–609 SEQ ID NO: 13; (xviii) нуклеотиды 634–688 SEQ ID NO: 13; (xix) нуклеотиды 805- 700 SEQ ID NO: 13; (xx) нуклеотиды 976–1036 SEQ ID NO: 13; (xxi) нуклеотиды 1039–2028 SEQ ID NO: 13 ;(xxii) 1243–1317 SEQ ID NO: 13; или (xxiii) нуклеотиды 1395–1447 SEQ ID NO: 13.

21. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–20, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) 539–599 SEQ ID NO: 13; (ii) нуклеотиды 644–678 SEQ ID NO: 13; (iii) нуклеотиды 815–690 SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотиды 986–1026 SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотиды 1049–2018 SEQ ID NO: 13; (vi) 1253–1307 SEQ ID NO: 13; или (vii) нуклеотиды 1405–1437 SEQ ID NO: 13.

22. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–21, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности, выбранной из последовательностей на Фиг. 1.

23. Внеклеточная везикула по любому из пп. 14–22, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность полностью комплементарна нуклеотидной последовательности в транскрипте СЕВР/β.

24. Внеклеточная везикула по любому из пп. 13–31, отличающаяся тем, что ASO

содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 194–296, с одним или двумя несовпадениями.

25. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–24, отличающаяся тем, что ASO имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкций на Фиг. 1, где заглавная буква обозначает модифицированный по сахару нуклеозид, а строчная буква обозначает ДНК.

26. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–25, отличающаяся тем, что ASO имеет длину от 14 до 20 нуклеотидов.

27. Внеклеточная везикула по любому из пп. 4–26, отличающаяся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.

28. Внеклеточная везикула по п. 35, отличающаяся тем, что одна или несколько модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатную связь.

29. Внеклеточная везикула по п. 27 или п. 28, отличающаяся тем, что модифицированы по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей.

30. Внеклеточная везикула по п. 29, отличающаяся тем, что каждая из межнуклеозидных связей в ASO представляет собой фосфоротиоатную связь.

31. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–30, которая дополнительно содержит якорный фрагмент.

32. Внеклеточная везикула по п. 31, отличающаяся тем, что ASO связан с якорным фрагментом.

33. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–32, дополнительно содержащая экзогенный нацеливающий фрагмент.

34. Внеклеточная везикула по п. 33, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химическое соединение, РНК-аптамер или любую их комбинацию.

35. Внеклеточная везикула по п. 33 или п. 34, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид.

36. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–35, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент содержит микропротеин, сконструированный белок с

анкириновыми повторами (дарпин), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжье наноантитело или любую их комбинацию.

37. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–36, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, однодоменное антитело, содержащее только тяжелую цепь антитело (VHH), одноцепочечное антитело, содержащее только тяжелую цепь акулье антитело (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или любую их комбинацию.

38. Внеклеточная везикула по п. 37, отличающаяся тем, что антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

39. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–38, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на печень, сердце, легкие, головной мозг, почки, центральную нервную систему, периферическую нервную систему, мышцы, кости, суставы, кожу, кишечник, мочевой пузырь, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию.

40. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–39, отличающаяся тем, что экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на опухолевые клетки, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, макрофаги, нейроны, гепатоциты, клетки Купфера, клетки миелоидного происхождения (например, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, гемопоэтические стволовые клетки, MDSC (например, моноцитарные MDSC или гранулоцитарные MDSC)) или любую их комбинацию.

41. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–40, отличающаяся тем, что ВВ содержит каркасный фрагмент, связывающий экзогенный нацеливающий фрагмент с ВВ.

42. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–41, отличающаяся тем, что якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас X.

43. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33–41, отличающаяся тем, что якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас Y.

44. Внеклеточная везикула по п. 42, отличающаяся тем, что каркас X представляет собой каркасный белок, способный прикреплять ASO на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

45. Внеклеточная везикула по п. 42 или п. 44, отличающаяся тем, что каркас X выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F₂ (белка

PTGFRN); базигина (белка BSG); члена суперсемейства иммуноглобулинов 2 (белка IGSF2); члена суперсемейства иммуноглобулинов 3 (белка IGSF3); члена суперсемейства иммуноглобулинов 8 (белка IGSF8); интегрин бета-1 (белка ITGB1); интегрин альфа-4 (белка ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белка SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белков АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4); их функционального фрагмента и любой их комбинации.

46. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–45, отличающаяся тем, что якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой белок PTGFRN или его функциональный фрагмент.

47. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–46, отличающаяся тем, что якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 302.

48. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–47, отличающаяся тем, что якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 301.

49. Внеклеточная везикула по п. 43, отличающаяся тем, что каркас Y представляет собой каркасный белок, способный прикреплять ASO на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

50. Внеклеточная везикула по п. 43 или п. 49, отличающаяся тем, что каркас Y выбран из группы, состоящей из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы С (белка MARCKS), миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы С типа 1 (белка MARCKSL1), кислоторастворимого белка головного мозга 1 (белка BASP1), их функционального фрагмента и любой их комбинации.

51. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43, 49 и 50, отличающаяся тем, что каркас Y представляет собой белок BASP1 или его функциональный фрагмент.

52. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43, и 49–51, отличающаяся тем, что каркас Y содержит N-концевой домен (ND – англ.: N terminus domain) и эффекторный домен (ED – англ.: effector domain), при этом ND и/или ED связаны с поверхностью просвета ВВ.

53. Внеклеточная везикула по п. 52, отличающаяся тем, что ND связан с поверхностью

просвета экзосомы посредством миристоилирования.

54. Внеклеточная везикула по п. 52 или п. 53, отличающаяся тем, что ED связан с поверхностью просвета экзосомы посредством ионного взаимодействия.

55. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–53, отличающаяся тем, что ED содержит (i) основную аминокислоту или (ii) две или более основных аминокислот в последовательности, при этом основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Lys, Arg, His и любой их комбинации.

56. Внеклеточная везикула по п. 55, отличающаяся тем, что основная аминокислота представляет собой (Lys)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 10.

57. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–56, отличающаяся тем, что ED содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410) или любую их комбинацию.

58. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–57, отличающаяся тем, что ND содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X2:X3:X4:X5:X6, при этом G представляет собой Gly; при этом «:» представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X2–X6 независимо представляет собой аминокислоту; и при этом X6 содержит основную аминокислоту.

59. Внеклеточная везикула по п. 58, отличающаяся тем, что:

- (i) X2 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (ii) X4 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- (iii) X5 выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X6 выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His; или
- (v) любая комбинация из (i)–(iv).

60. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–59, отличающаяся тем, что ND содержит аминокислотную последовательность G:X2:X3:X4:X5:X6, где

- (i) G представляет собой Gly;
- (ii) «:» представляет собой пептидную связь;
- (iii) X2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly,

Ala и Ser;

(iv) X3 представляет собой аминокислоту;

(v) X4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;

(vi) X5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и

(vii) X6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.

61. Внеклеточная везикула по любому из пп. 58–60, отличающаяся тем, что X3 выбран из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, и Arg.

62. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–61, отличающаяся тем, что ND и ED соединены посредством линкера.

63. Внеклеточная везикула по п. 62, отличающаяся тем, что линкер содержит одну или более аминокислот.

64. Способ по любому из пп. 52–63, отличающийся тем, что ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKK (SEQ ID NO: 411), (ii) GAKLSKK (SEQ ID NO: 412), (iii) GGKQSKK (SEQ ID NO: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414), (v) GGKLSK (SEQ ID NO: 415) или (vi) любой их комбинации.

65. Внеклеточная везикула по п. 64, отличающаяся тем, что ND содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSKKK (SEQ ID NO: 438), (ii) GGKLSKKS (SEQ ID NO: 439), (iii) GAKLSKKK (SEQ ID NO: 440), (iv) GAKLSKKS (SEQ ID NO: 441), (v) GGKQSKKK (SEQ ID NO: 442), (vi) GGKQSKKS (SEQ ID NO: 443), (vii) GGKLAKKK (SEQ ID NO: 444), (viii) GGKLAKKS (SEQ ID NO: 445) и (ix) любой их комбинации.

66. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52–65, отличающаяся тем, что ND содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 411).

67. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43 и 49–66, отличающаяся тем, что каркас Y имеет длину по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере

около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот.

68. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49–67, отличающаяся тем, что каркас Y содержит (i) GGKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKSKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKSKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKSKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKSKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKSKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

69. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49–68, отличающаяся тем, что каркас Y состоит из (i) GGKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKSKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKSKKKGYSGG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKSKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKSKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKSKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKSKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

70. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49–69, отличающаяся тем, что каркас Y не содержит Met на N-конце.

71. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43 и 49–70, отличающаяся тем, что каркас Y содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка.

72. Внеклеточная везикула по п. 71, отличающаяся тем, что аминокислотный остаток на N-конце каркаса Y представляет собой Gly.

73. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–72, отличающаяся тем, что ASO связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ.

74. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–73, отличающаяся тем, что ASO связан

с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ.

75. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–74, отличающаяся тем, что якорный фрагмент содержит стерол, GM1, липид, витамин, небольшую молекулу, пептид или их комбинацию.

76. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–74, отличающаяся тем, что якорный фрагмент содержит холестерин.

77. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–74, отличающаяся тем, что якорный фрагмент содержит фосфолипид, лизофосфолипид, жирную кислоту, витамин (например, витамин D и/или витамин E) или любую их комбинацию.

78. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31–77, отличающаяся тем, что ASO связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом посредством линкера.

79. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–78, отличающаяся тем, что ASO связан с ВВ посредством линкера.

80. Внеклеточная везикула по п. 78 или п. 79, отличающаяся тем, что линкер представляет собой полипептид.

81. Внеклеточная везикула по п. 78 или п. 79, отличающаяся тем, что линкер представляет собой неполипептидный фрагмент.

82. Внеклеточная везикула по п. 78 или п. 79, отличающаяся тем, что линкер содержит этиленгликоль.

83. Внеклеточная везикула по п. 82, отличающаяся тем, что линкер содержит HEG, TEG, PEG или любую их комбинацию.

84. Внеклеточная везикула по п. 78 или п. 79, отличающаяся тем, что линкер содержит акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (сложный эфир NHS), дигоксигенин (сложный эфир NHS), холестерин-TEG, I-LINKER™, аминоксидирующий агент (например, аминоксидирующий агент C6, аминоксидирующий агент C12, аминоксидирующий агент C6 dT или аминоксидирующий агент Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-TEG, двойной биотин, PC-биотин или дестиобиотин), модификацию тиола (модификатор тиола C3 S-S, дитиол или модификатор тиола C6 S-S), или любую их комбинацию.

85. Внеклеточная везикула по любому из пп. 78–84, отличающаяся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

86. Внеклеточная везикула по п. 85, отличающаяся тем, что линкер содержит валин-

аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

87. Внеклеточная везикула по любому из пп. 78–86, отличающаяся тем, что линкер содержит (i) малеимидный фрагмент и (ii) валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

88. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–87, отличающаяся тем, что ВВ представляет собой экзосому.

89. Антисмысловый олигонуклеотид (ASO), содержащий непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β* (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13).

90. ASO по п. 89, который не представляет собой или представляет собой TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO: 90).

91. ASO по п. 89 или п. 90, который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-518 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, или нуклеотидов 521-2113 транскрипта *CEBP/β*, соответствующего нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13.

92. ASO по п. 91, отличающийся тем, что его непрерывная нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *CEBP/β*.

93. ASO по любому из пп. 89–92, который способен снижать экспрессию белка *CEBP/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок *CEBP/β*.

94. ASO по п. 93, отличающийся тем, что экспрессия белка *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.

95. ASO по любому из пп. 89–94, который способен снижать уровень мРНК *CEBP/β* в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *CEBP/β*.
96. ASO по п. 95, отличающийся тем, что уровень мРНК *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *CEBP/β* в клетке человека, которая не подвергалась воздействию ASO.
97. ASO по любому из пп. 91–96, который представляет собой гэтмер, миксмер или тоталмер.
98. ASO по любому из пп. 91–97, который содержит один или более аналогов нуклеозидов.
99. ASO по п. 98, отличающийся тем, что один или более аналогов нуклеозидов включают в себя 2'-О-алкил-РНК; 2'-О-метил РНК (2'-ОМе); 2'-алкокси-РНК; 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ); 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-РНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA или бициклический аналог нуклеозида (LNA).
100. ASO по п. 98 или п. 99, отличающийся тем, что один или более аналогов нуклеозидов представляют собой модифицированный по сахару нуклеозид.
101. ASO по п. 100, отличающийся тем, что модифицированный по сахару нуклеозид представляет собой повышающий аффинность модифицированный по сахару в положении 2' нуклеозид.
102. ASO по любому из пп. 97–101, отличающийся тем, что один или более аналогов нуклеозидов содержат нуклеозид, содержащий бициклический сахар.
103. ASO по любому из пп. 97–102, отличающийся тем, что один или более аналогов нуклеозидов содержат LNA.
104. ASO по п. 103, отличающийся тем, что LNA выбрана из группы, состоящей из ограниченного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-ограниченного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ), α-L-LNA, β-D-LNA, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-LNA, окси-LNA, тио-LNA и любой их комбинации.

105. ASO по любому из пп. 89–104, который содержит одно или более 5'-метилцитозиновых азотистых оснований.
106. ASO по любому из пп. 89–105, отличающийся тем, что ASO содержит любую из последовательностей от SEQ ID NO: 194 до SEQ ID NO: 206.
107. ASO по любому из пп. 89–106, отличающийся тем, что ASO имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкций на Фиг. 1, где заглавная буква обозначает модифицированный по сахару нуклеозид, а строчная буква обозначает ДНК.
108. ASO по любому из пп. 89–107, отличающийся тем, что ASO имеет длину от 14 до 20 нуклеотидов.
109. ASO по любому из пп. 89–108, отличающийся тем, что непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.
110. ASO по п. 109, отличающийся тем, что одна или более модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатную связь.
111. ASO по п. 109 или п. 110, отличающийся тем, что модифицированы по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей.
112. ASO по п. 111, отличающийся тем, что каждая из межнуклеозидных связей в ASO представляет собой фосфоротиоатную связь.
113. Конъюгат, содержащий ASO по любому из пп. 89–112, причем указанный ASO ковалентно присоединен к по меньшей мере одному ненуклеотидному или неполинуклеотидному фрагменту.
114. Конъюгат по п. 113, отличающийся тем, что ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент содержит белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.
115. Внеклеточная везикула, содержащая ASO по любому из пп. 89–112 или конъюгат по п. 113 или п. 114.
116. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112 или конъюгат по п. 113 или п. 114 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.
117. Фармацевтическая композиция по п. 116, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемая соль включает в себя соль натрия, соль калия, соль аммония или любую их

комбинацию.

118. Фармацевтическая композиция по п. 116 или п. 117, которая дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

119. Фармацевтическая композиция по п. 118, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист СЕВР/β.

120. Фармацевтическая композиция по п. 119, отличающаяся тем, что антагонист СЕВР/β представляет собой химическое соединение, миРНК, кшРНК, антисмысловой олигонуклеотид, белок или любую их комбинацию.

121. Фармацевтическая композиция по п. 119 или п. 120, отличающаяся тем, что антагонист СЕВР/β представляет собой антитело к СЕВР/β или его фрагмент.

122. Фармацевтическая композиция по п. 119 или п. 120, отличающаяся тем, что антагонист СЕВР/β содержит антисмысловой олигонуклеотид (ASO).

123. Набор, содержащий внеклеточную везикулу по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгат по п. 113 или п. 114 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 116–122 и инструкции по применению.

124. Диагностический набор, содержащий внеклеточную везикулу по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгат по п. 113 или п. 114 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 116–122 и инструкции по применению.

125. Способ ингибирования или снижения экспрессии белка СЕВР/β в клетке, включающий в себя введение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114, или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122 в клетку, экспрессирующую белок СЕВР/β, причем экспрессия белка СЕВР/β в клетке ингибируется или снижается после введения.

126. Способ лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122.

127. Применение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122 в производстве лекарственного препарата для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

128. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112,

конъюгат по п. 113 или п. 114 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 116–122 для применения в лечении ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

129. Способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114, или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122, причем заболевание или нарушение выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, нарушения обмена веществ/ССЗ и любой их комбинации.

130. Применение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122 в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, причем заболевание или нарушение выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, нарушения обмена веществ/ССЗ и любой их комбинации.

131. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгат по пп. 113 или 114 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 116–122 для применения в лечении заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, причем заболевание или нарушение выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, нарушения обмена веществ/ССЗ и любой их комбинации.

132. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или 130, или композиция для применения по п. 128 или п. 131, отличающиеся тем, что ASO ингибирует или снижает экспрессию мРНК *CEBP/β* в клетке после введения.

133. Способ, применение или композиция для применения по п. 132, отличающиеся тем, что уровень мРНК *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на около 100% после введения по сравнению с уровнем мРНК *CEBP/β* в клетке, которая не подвергалась воздействию ASO.

134. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или п. 130 или композиции для применения по п. 128 или п. 131, отличающиеся тем, что экспрессия белка *CEBP/β* снижается на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по

меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или на около 100% после введения по сравнению с экспрессией белка СЕВР/β в клетке, которая не подвергалась воздействию АСО.

135. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или п. 130 или композиции для применения по п. 128 или п. 131, отличающиеся тем, что вводят внеклеточную везикулу, АСО, конъюгат или фармацевтическую композицию интракардиально, перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, пульмонально, местно или интравентрикулярно.

136. Способ по п. 126, применение по п. 127 или композиция для применения по п. 128, отличающиеся тем, что ракового заболевания выбрано из группы, состоящей из следующего: фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, лимфома, лейкоз, рак печени, глиобластома, меланома, миелома, базальноклеточный рак, аденокарцинома, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатома, рак желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональный рак, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиома, глиобластома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиомы, менингиомы, меланома, нейробластома, ретинобластома, фолликулярная лимфома, лимфома Ходжкина, В-клеточная лимфома и любая их комбинация.

137. Способ по п. 129, применение по п. 130 или композиция для применения по п. 131, отличающиеся тем, что заболевание или нарушение включает в себя фиброз.

138. Способ по п. 129, применение по п. 130 или композиция для применения по п. 131, отличающиеся тем, что заболевание или нарушение включает в себя фиброз, выбранный из группы, состоящей из следующего: фиброз печени (НАСГ), цирроз, легочный фиброз, кистозный фиброз, хронический язвенный колит/ВЗК, фиброз мочевого пузыря, фиброз почек, CAPS (синдром Макла-Уэлса), фиброз предсердий, эндомиокардиальный фиброз,

перенесенный инфаркт миокарда, глиальный рубец, артериальная ригидность, артрофиброз, болезнь Крона, контрактура Дюпюитрена, келоидный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, болезнь Пейрони, нефрогенный системный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, ретроперитонеальный фиброз, склеродермия/системный склероз, адгезивный капсулит и любая их комбинация.

139. Способ активации менингеальных макрофагов у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122.

140. Способ лечения ракового заболевания центральной нервной системы у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122.

141. Способ индуцирования M1-поляризации менингеальных макрофагов у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122.

142. Способ индуцирования инфильтрации менингеальных макрофагов в опухоль у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1–88 и 115, ASO по любому из пп. 89–112, конъюгата по п. 113 или п. 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116–122.

Фиг. 1

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3),5'-3'(номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBPb-540	AGTCCGCCTCGTAGT	194	15	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsAbsGbsTb	540	554
ASO-CEBPb-565	TTGCCGCCGTACGCA	195	15	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	579
ASO-CEBPb-569	CGCCTTGCCGCCGTA	196	15	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	569	583
ASO-CEBPb-648	GCTCGTGGTCGCCGA	197	15	GbsCbsTbs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	662
ASO-CEBPb-816	CGTAGTCGTCGGAGA	198	15	CbsGbsTbsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsAbsGbsAb	816	830
ASO-CEBPb-817	CCGTAGTCGTGGAG	199	15	CbsCbsGbsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsAbsGb	817	831
ASO-CEBPb-818	CCCGTAGTCGTCGGA	200	15	CbsCbsCbsdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGbsGbsAb	818	832
ASO-CEBPb-819	CCCCGTAGTCGTCGG	201	15	CbsCbsCbs(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	819	833
ASO-CEBPb-820	CCCCGTAGTCGTCG	202	15	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsTbsCbsGb	820	834
ASO-CEBPb-851	GCCGTACTCGGCCGG	203	15	GbsCbsCbsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdGs(5MdC)sCbsGbsGb	851	865
ASO-CEBPb-853	TAGCCGTACTCGGCC	204	15	TbsAbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsGbsCbsCb	853	867
ASO-CEBPb-856	ACGTAGCCGTACTCG	205	15	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sTbsCbsGb	856	870
ASO-CEBPb-858	TCACGTAGCCGTACT	206	15	TbsCbsAbs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAbsCbsTb	858	872
ASO-CEBPb-987	AGTCCGCGGGCTCGA	207	15	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTsCbsGbsAb	987	1001
ASO-CEBPb-1056	GCGCGTACGGGAAGC	208	15	GbsCbsGbs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdAsAbsGbsCb	1056	1070
ASO-CEBPb-1064	AGCGCGCAGCGCGTA	209	15	AbsGbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1078
ASO-CEBPb-1065	AAGCGCGCAGCGCGT	210	15	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1079
ASO-CEBPb-1066	TAAGCGCGCAGCGCG	211	15	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sGbsCbsGb	1066	1080

Фиг. 1 (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3),5'-3'(номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBPr-1071	CGAGGTAAGCGCGCA	212	15	CbsGbsAbsdGsdGsdTsdAsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsCbsAb	1071	1085
ASO-CEBPr-1270	CGCCGGATCTTGAC	213	15	CbsGbsCbs(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsTbsAbsCb	1270	1284
ASO-CEBPr-1273	TCGCGCCGGATCTTG	214	15	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sTbsTbsGb	1273	1287
ASO-CEBPr-1274	CTCGCGCCGGATCTT	215	15	CbsTbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCbsTbsTb	1274	1288
ASO-CEBPr-1405	TCGCGCGACAGCTGC	216	15	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sTbsGbsCb	1405	1419
ASO-CEBPr-1407	GCTCGCGCGACAGCT	217	15	GbsCbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdAs(5MdC)sdAsGbsCbsTb	1407	1421
ASO-CEBPr-539	AGTCCGCCTCGTAGTA	218	16	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdAsGbsTbsAb	539	554
ASO-CEBPr-540	CAGTCCGCCTCGTAGT	219	16	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsAbsGbsTb	540	555
ASO-CEBPr-563	TGCCGCCGTACGCAGC	220	16	TbsGbsCbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sAbsGbsCb	563	578
ASO-CEBPr-564	TTGCCGCCGTACGCAG	221	16	TbsTbsGbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsCbsAbsGb	564	579
ASO-CEBPr-565	CTTGCCGCCGTACGCA	222	16	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	580
ASO-CEBPr-568	CGCCTGCCGCCGTAC	223	16	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsTbsAbsCb	568	583
ASO-CEBPr-644	CGTGGTCGCCGATGCT	224	16	CbsGbsTbsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdAsdTsGbsCbsTb	644	659
ASO-CEBPr-645	TCGTGGTCGCCGATGC	225	16	TbsCbsGbsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdAsTbsGbsCb	645	660
ASO-CEBPr-648	CGCTCGTGGTCGCCGA	226	16	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	663
ASO-CEBPr-819	CCCCGTAGTCGTCGG	227	16	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	819	834
ASO-CEBPr-855	ACGTAGCCGTACTCGG	228	16	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsCbsGbsGb	855	870
ASO-CEBPr-860	GGCTCACGTAGCCGTA	229	16	GbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsTbsAb	860	875

Фиг. 1 (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBPb-986	AGTCCGCGGGCTCGAA	230	16	AbsGbsTbs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsAbsAb	986	1001
ASO-CEBPb-987	CAGTCCGCGGGCTCGA	231	16	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdGs(5MdC)sdTsCbsGbsAb	987	1002
ASO-CEBPb-996	TTCCGCTTGCAGTCCG	232	16	TbsTbsCbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)sdAsdGsdTsCbsCbsGb	996	1011
ASO-CEBPb-1049	ACGGGAAGCCC GCCGC	233	16	AbsCbsGbsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsCb	1049	1064
ASO-CEBPb-1050	TACGGGAAGCCC GCCGC	234	16	TbsAbsCbsdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsCbsCbsGb	1050	1065
ASO-CEBPb-1064	AAGCGCGCAGCGGTA	235	16	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1079
ASO-CEBPb-1065	TAAGCGCGCAGCGCT	236	16	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1080
ASO-CEBPb-1066	GTAAGCGCGCAGCGCG	237	16	GbsTbsAbsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sGbsCbsGb	1066	1081
ASO-CEBPb-1083	ACCGCTGGTAGCCGA	238	16	AbsCbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdGsdGsdTsdAsdGs(5MdC)sCbsGbsAb	1083	1098
ASO-CEBPb-1088	TCGGCACCGCTGGTA	239	16	TbsCbsGbsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdGsGbsTbsAb	1088	1103
ASO-CEBPb-1253	CGTCGCTGTGCTTGTC	240	16	CbsGbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdTsdGs(5MdC)sdTsdTsGbsTbsCb	1253	1268
ASO-CEBPb-1269	CGCCGATCTTGACT	241	16	CbsGbsCbs(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsAbsCbsTb	1269	1284
ASO-CEBPb-1272	TCGCGCCGGATCTTGT	242	16	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTbsGbsTb	1272	1287
ASO-CEBPb-1274	GCTCGCGCCGGATCTT	243	16	GbsCbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCbsTbsTb	1274	1289
ASO-CEBPb-539	CAGTCCGCTCGTAGTA	244	17	CbsAbsGbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdAsGbsTbsAb	539	555
ASO-CEBPb-564	CTTGCCGCGTACGCAG	245	17	CbsTbsTbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdGsCbsAbsGb	564	580
ASO-CEBPb-565	CCTTGCCGCGTACGCA	246	17	CbsCbsTbsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sGbsCbsAb	565	581
ASO-CEBPb-567	CGCCTTGCCGCGTACG	247	17	CbsGbsCbs(5MdC)sdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAbsCbsGb	567	583

Фиг. 1 (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3),5'-3'(номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBp-647	CGCTCGTGGTCGCCGAT	248	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGbsAbsTb	647	663
ASO-CEBp-648	GCGCTCGTGGTCGCCGA	249	17	GbsCbsGbs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCbsGbsAb	648	664
ASO-CEBp-815	CCGTAGTCGTCGGAGAA	250	17	CbsCbsGbsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsdAsGbsAbsAb	815	831
ASO-CEBp-818	CCCCCGTAGTCGTCGGA	251	17	CbsCbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGbsGbsAb	818	834
ASO-CEBp-820	TGCCCCCGTAGTCGTCG	252	17	TbsGbsCbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsTbsCbsGb	820	836
ASO-CEBp-854	ACGTAGCCGACTCGGC	253	17	AbsCbsGbsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsGbsCb	854	870
ASO-CEBp-855	CACGTAGCCGACTCGG	254	17	CbsAbsCbsdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsCbsGbsGb	855	871
ASO-CEBp-859	GGCTCACGTAGCCGTAC	255	17	GbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGsdTsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsTbsAbsCb	859	875
ASO-CEBp-1050	GTACGGGAAGCCCGCG	256	17	GbsTbsAbs(5MdC)sdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsCbsCbsGb	1050	1066
ASO-CEBp-1053	CGCGTACGGGAAGCCCG	257	17	CbsGbsCbsdGsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdAsdAsdGs(5MdC)sCbsCbsGb	1053	1069
ASO-CEBp-1062	AGCGCGCAGCGGTACG	258	17	AbsGbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdTsAbsCbsGb	1062	1078
ASO-CEBp-1063	AAGCGCGCAGCGGTAC	259	17	AbsAbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsTbsAbsCb	1063	1079
ASO-CEBp-1064	TAAGCGCGCAGCGGTA	260	17	TbsAbsAbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGbsTbsAb	1064	1080
ASO-CEBp-1065	GTAAGCGCGCAGCGGT	261	17	GbsTbsAbsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCbsGbsTb	1065	1081
ASO-CEBp-1265	CGGATCTGTACTCGTC	262	17	CbsGbsGbsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGbsTbsCb	1265	1281
ASO-CEBp-1270	CGCGCCGGATCTTGATC	263	17	CbsGbsCbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsTbsAbsCb	1270	1286
ASO-CEBp-1271	TCGCGCCGGATCTTGTA	264	17	TbsCbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsGbsTbsAb	1271	1287
ASO-CEBp-1272	CTCGCGCCGGATCTTGT	265	17	CbsTbsCbsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTbsGbsTb	1272	1288

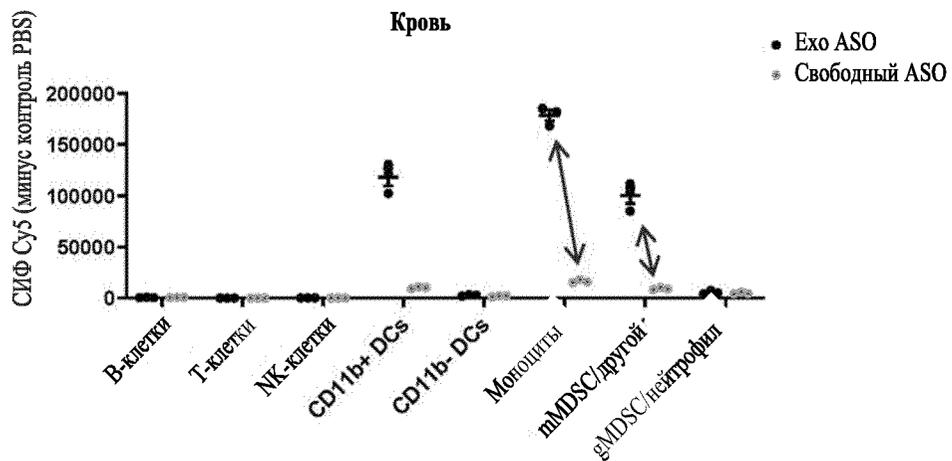
Фиг. 1 (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBPb-1274	CGCTCGCGCCGGATCTT	266	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCbsTbsTb	1274	1290
ASO-CEBPb-1277	TTGCGCTCGCGCCGGAT	267	17	TbsTbsGbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsGbsAbsTb	1277	1293
ASO-CEBPb-564	CGCCTTGCCGCCGTACGCA G	268	20	CbsGbsCbsCmsTmsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsCmsGmsCbsAbsGb	564	583
ASO-CEBPb-565	CCGCCCTTGCCGCCGTACGC A	269	20	CbsCbsGbsCmsCmsdTsdTsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsAmsCmsGbsCbsAb	565	584
ASO-CEBPb-818	TTGCCCCGTAGTCGTCGG A	270	20	TbsTbsGbsCmsCms(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAsdGsdTs(5MdC)sdGsTmsCmsGbsGbsAb	818	837
ASO-CEBPb-1061	TAAGCGCGCAGCGGTAC GG	271	20	TbsAbsAbsGmsCmsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsTmsAmsCbsGbsGb	1061	1080
ASO-CEBPb-1062	GTAAGCGCGCAGCGGTA CG	272	20	GbsTbsAbsAmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sGmsTmsAbsCbsGb	1062	1081
ASO-CEBPb-1064	AGGTAAGCGCGCAGCGG TA	273	20	AbsGbsGbsTmsAmsdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sGmsCmsGbsTbsAb	1064	1083
ASO-CEBPb-1267	CGCGCCGGATCTTGACTC G	274	20	CbsGbsCbsGmsCms(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsAmsCmsTbsCbsGb	1267	1286
ASO-CEBPb-1272	GCGCTCGCGCCGGATCTT GT	275	20	GbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCmsTmsTbsGbsTb	1272	1291
ASO-CEBPb-645	GCGCTCGTGGTCGCCGAT GC	276	20	GbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sGmsAmsTbsGbsCb	645	664
ASO-CEBPb-848	TAGCCGTA CT CGGCCGCT T	277	20	TbsAbsGbsCmsCmsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sGmsGmsCbsTbsTb	848	867
ASO-CEBPb-849	GTAGCCGTA CT CGGCCG CT	278	20	GbsTbsAbsGmsCms(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdGs(5MdC)sCmsGmsGbsCbsTb	849	868
ASO-CEBPb-850	CGTAGCCGTA CT CGGCCG GC	279	20	CbsGbsTbsAmsGms(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdGsCmsCmsGbsGbsCb	850	869
ASO-CEBPb-1063	GGTAAGCGCGCAGCGGT AC	280	20	GbsGbsTbsAmsAmsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsCmsGmsTbsAbsCb	1063	1082
ASO-CEBPb-1070	TAGCCGAGGTAAGCGCGC AG	281	20	TbsAbsGbsCmsCmsdGsdAsdGsdGsdTsdAsdAsdGs(5MdC)sdGsCmsGmsCbsAbsGb	1070	1089
ASO-CEBPb-1071	GTAGCCGAGGTAAGCGCG CA	282	20	GbsTbsAbsGmsCms(5MdC)sdGsdAsdGsdGsdTsdAsdAsdGs(5MdC)sGmsCmsGbsCbsAb	1071	1090
ASO-CEBPb-1262	CGGATCTTGACTCGTCGC T	283	20	CbsGbsGbsAmsTms(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsTmsCmsGbsCbsTb	1262	1281

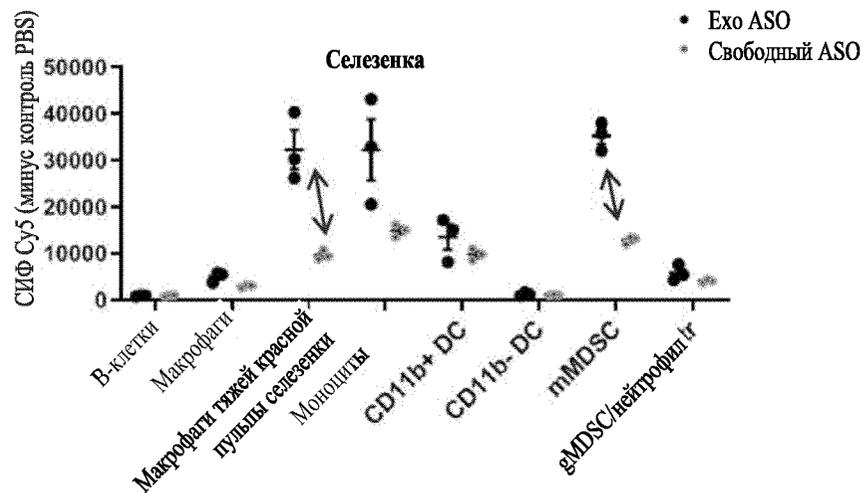
Фиг. 1 (продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (нт)	15-мерный LNA-гэпмер (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolabs)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 13)	
					Начало	Конец
ASO-CEBPb-1274	TTGCGCTCGCGCCGGATCT T	284	20	TbsTbsGbsCmsGms(5MdC)sdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAmsTmsCbsTbsTb	1274	1293
ASO-CEBPb-1275	GTTGCGCTCGCGCCGGAT CT	285	20	GbsTbsTbsGmsCmsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsGmsAmsTbsCbsTb	1275	1294
ASO-CEBPb-644	CGCTCGTGGTCGCCGATG CT	286	20	CbsGbsCbsTmsCmsdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsAmsTmsGbsCbsTb	644	663
ASO-CEBPb-647	GCGCGCTCGTGGTCGCCG AT	287	20	GbsCbsGbsCmsGms(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGsCmsCmsGbsAbsTb	647	666
ASO-CEBPb-851	ACGTAGCCGTA CT CGGCCG G	288	20	AbsCbsGbsTmsAmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sdGsGmsCmsCbsGbsGb	851	870
ASO-CEBPb-1266	GCGCCGGATCTTGACTCG T	289	20	GbsCbsGbsCmsCmsdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAsCmsTmsCbsGbsTb	1266	1285
ASO-CEBPb-1268	TCGCGCCGGATCTTGACT C	290	20	TbsCbsGbsCmsGms(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsTmsAmsCbsTbsCb	1268	1287
ASO-CEBPb-1270	GCTCGCGCCGGATCTTGTA C	291	20	GbsCbsTbsCmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsTmsGmsTbsAbsCb	1270	1289
ASO-CEBPb-646	CGCGCTCGTGGTCGCCGA TG	292	20	CbsGbsCbsGmsCmsdTs(5MdC)sdGsdTsdGsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sCmsGmsAbsTbsGb	646	665
ASO-CEBPb-1060	AAGCGCGCAGCGGTACG GG	293	20	AbsAbsGbsCmsGms(5MdC)sdGs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdTsAmsCmsGbsGbsGb	1060	1079
ASO-CEBPb-1263	CCGGATCTTGACTCGTCG C	294	20	CbsCbsGbsGmsAmsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdTsdAs(5MdC)sdTs(5MdC)sGmsTmsCbsGbsCb	1263	1282
ASO-CEBPb-1269	CTCGCGCCGGATCTTGTA T	295	20	CbsTbsCbsGmsCmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdTsdTsGmsTmsAbsCbsTb	1269	1288
ASO-CEBPb-1271	CGCTCGCGCCGGATCTTGT A	296	20	CbsGbsCbsTmsCmsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sTmsTmsGbsTbsAb	1271	1290

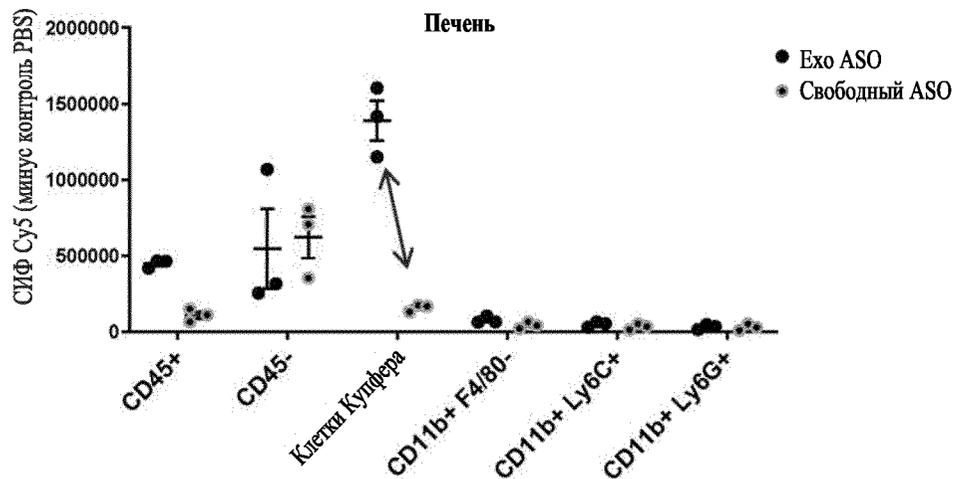
Фиг. 2А



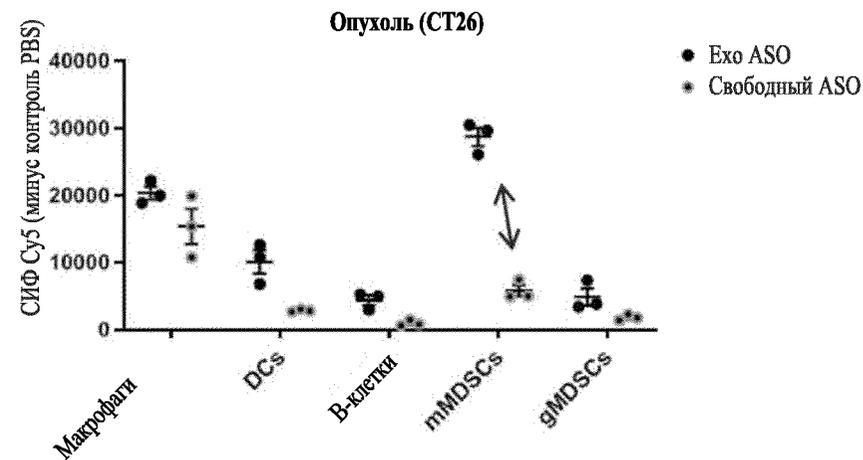
Фиг. 2С



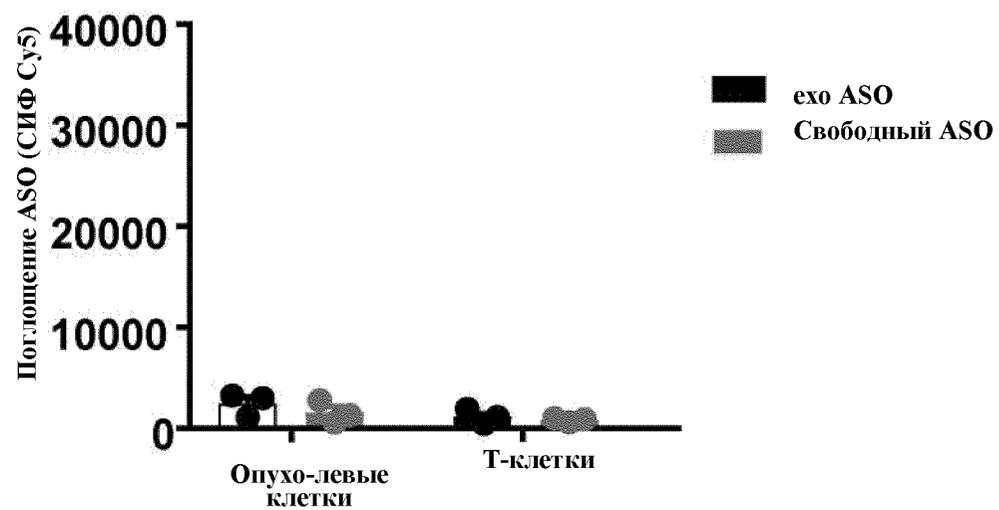
Фиг. 2В



Фиг. 2D



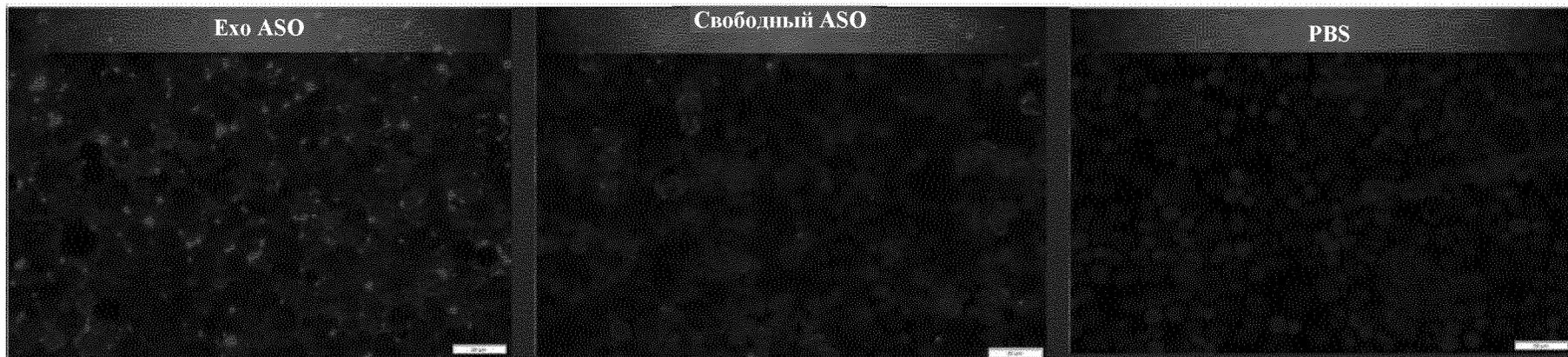
Фиг. 2Е



Фиг. 2F

Фиг. 2H

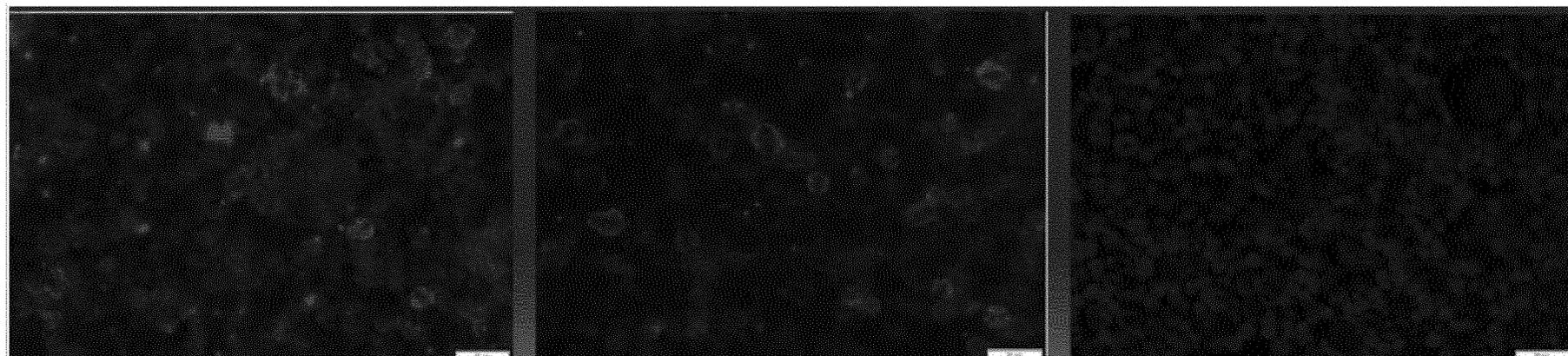
Фиг. 2J

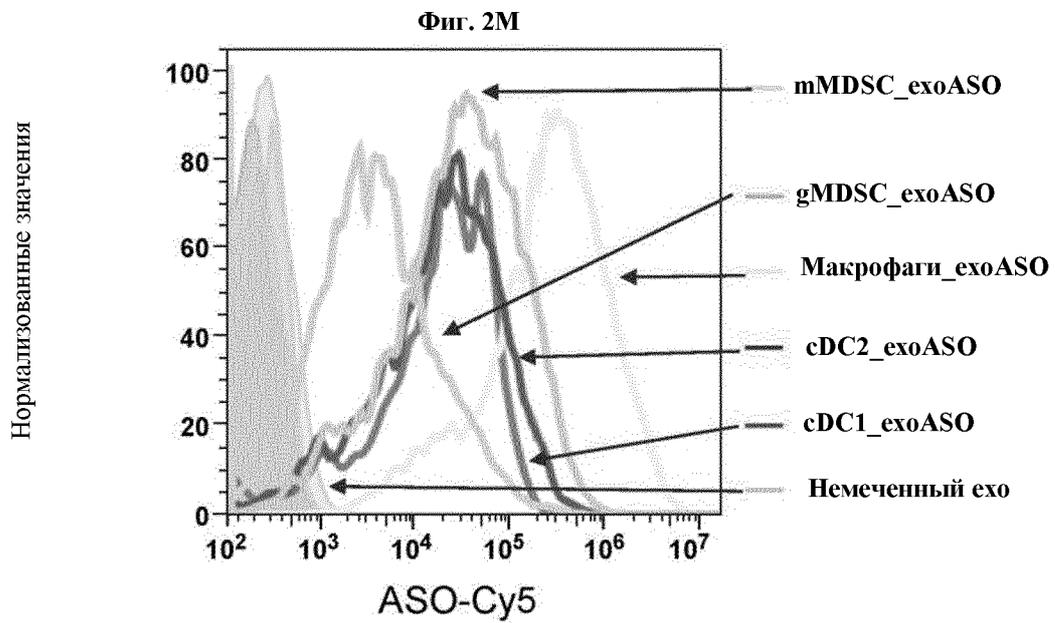
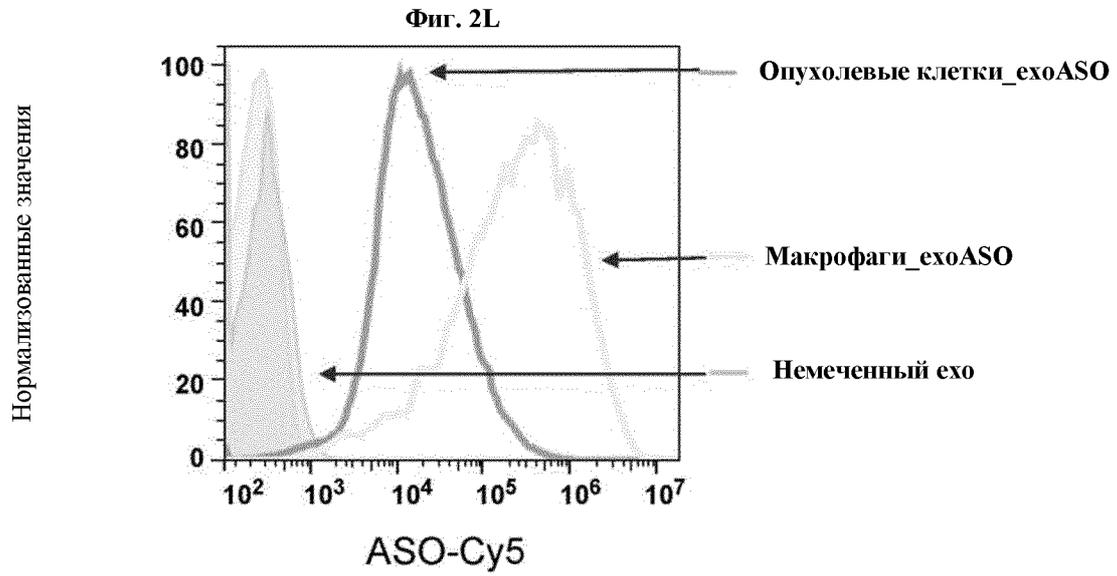


Фиг. 2G

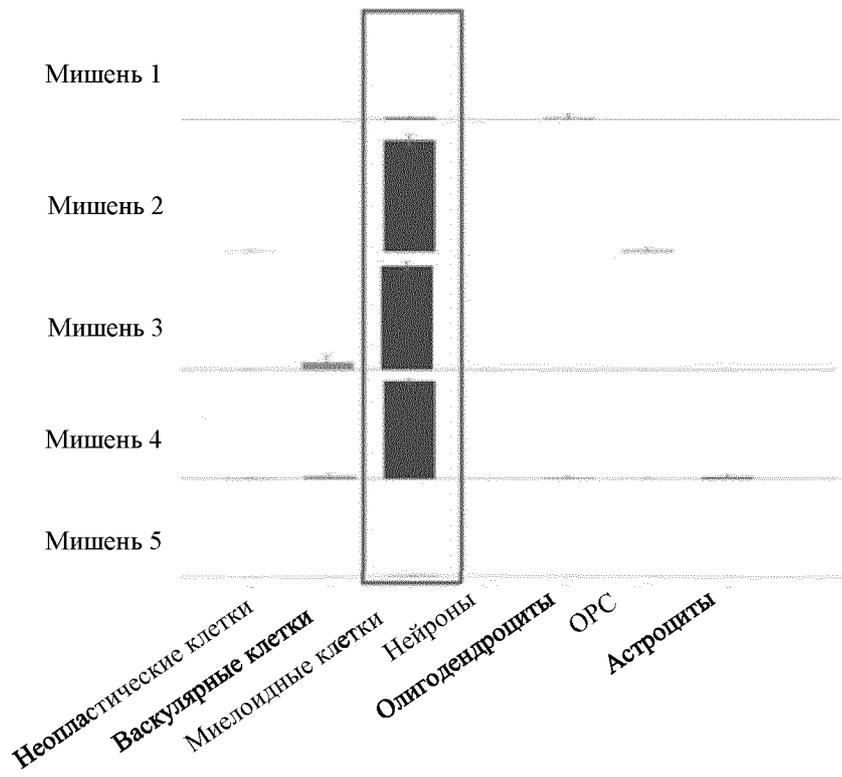
Фиг. 2I

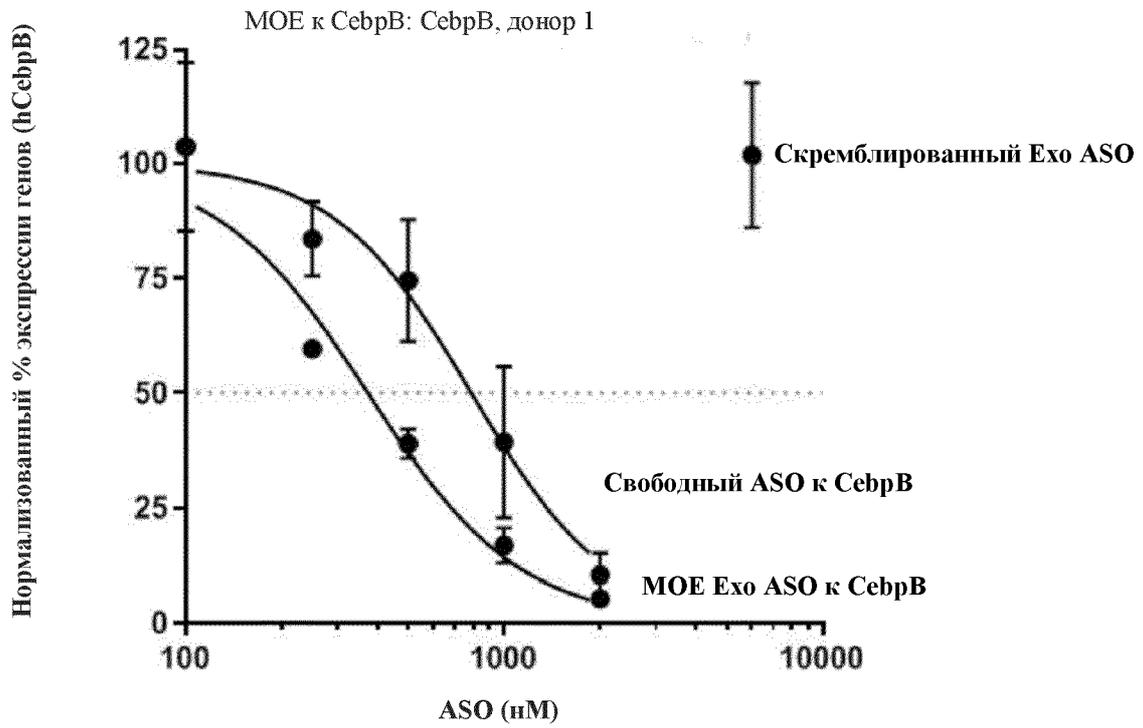
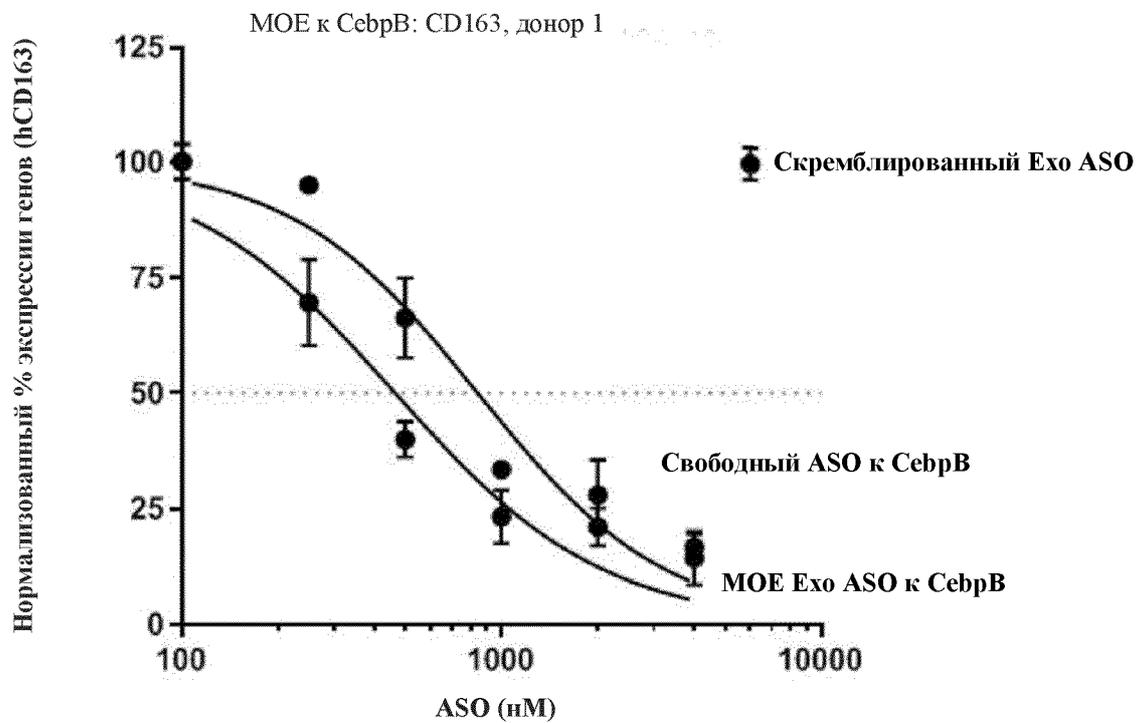
Фиг. 2K



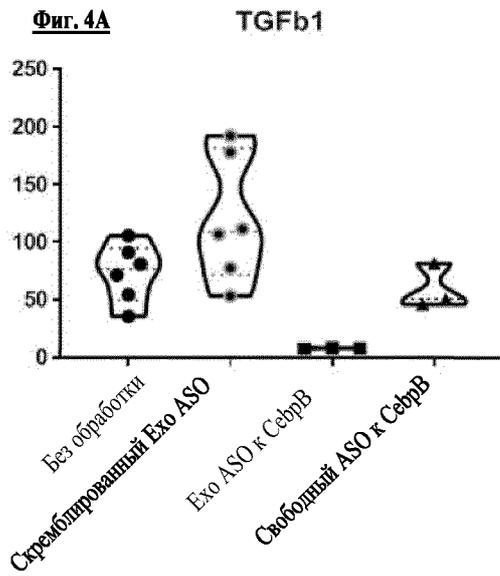


Фиг. 2N

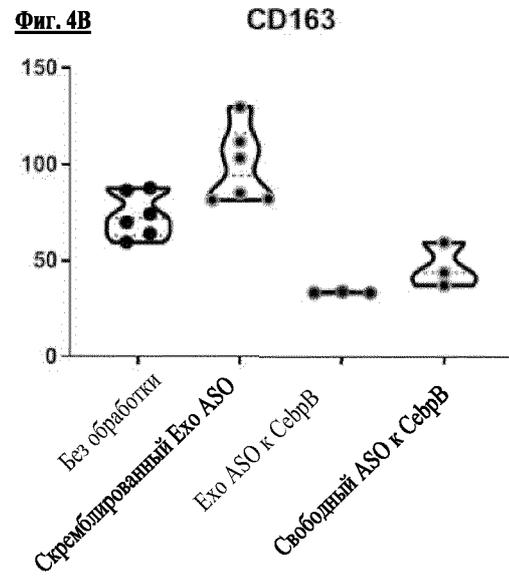


Фиг. 3А**Фиг. 3В**

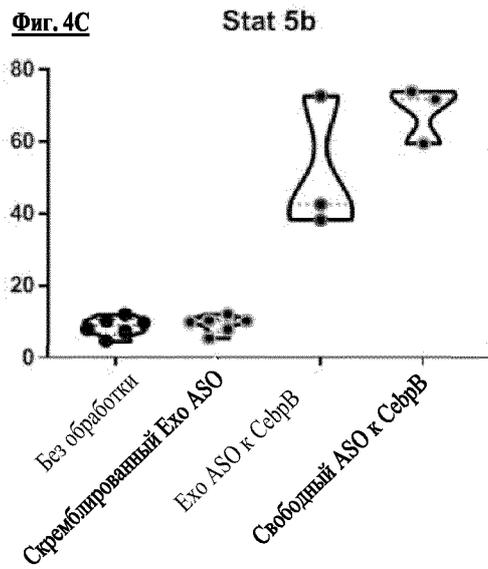
Нормализованные линейные значения мРНК



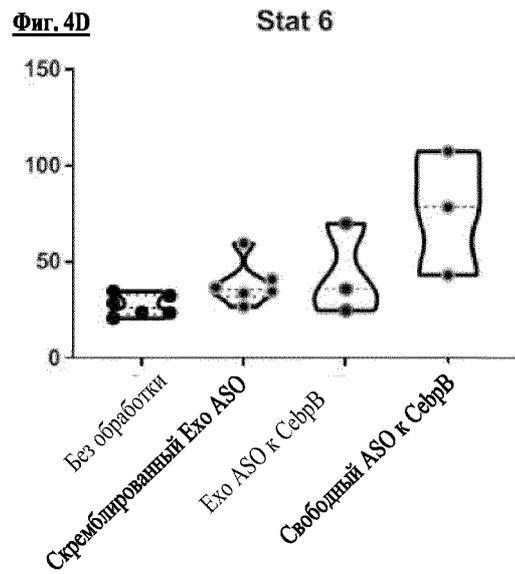
Нормализованные линейные значения мРНК



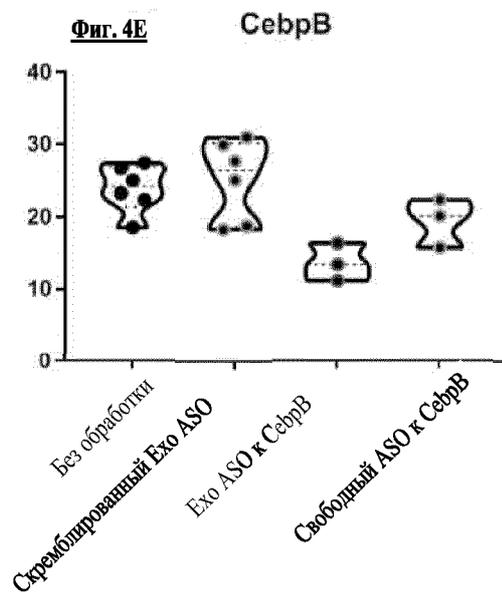
Нормализованные линейные значения мРНК



Нормализованные линейные значения мРНК

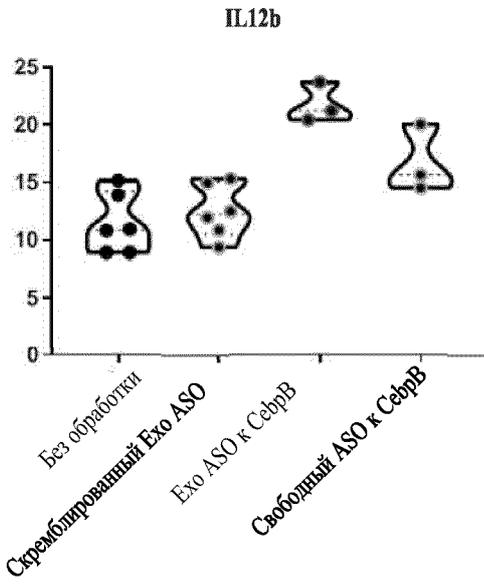


Нормализованные линейные значения мРНК

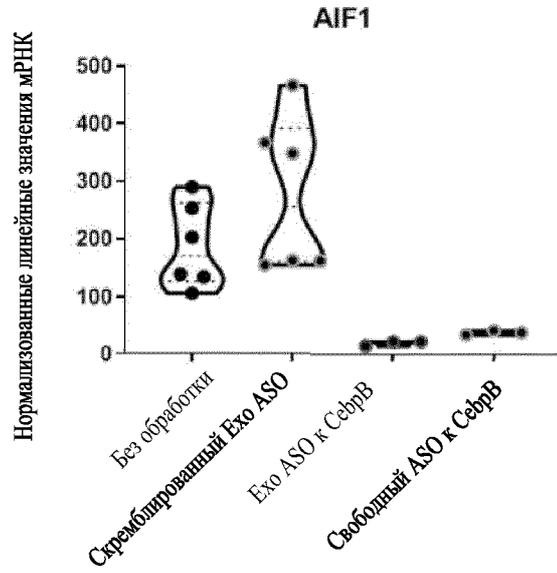


Нормализованные линейные значения мРНК

Фиг. 4F

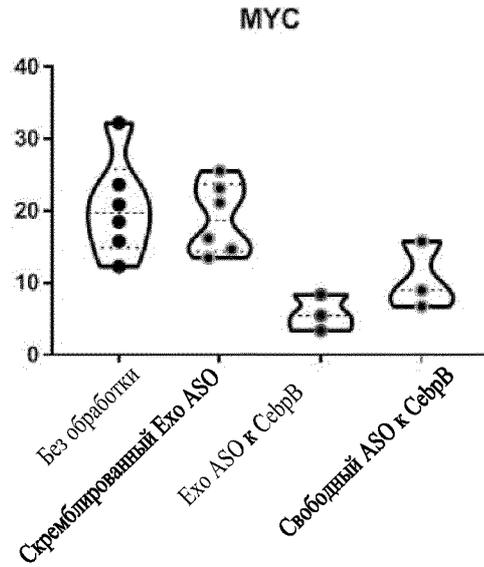


Фиг. 4G

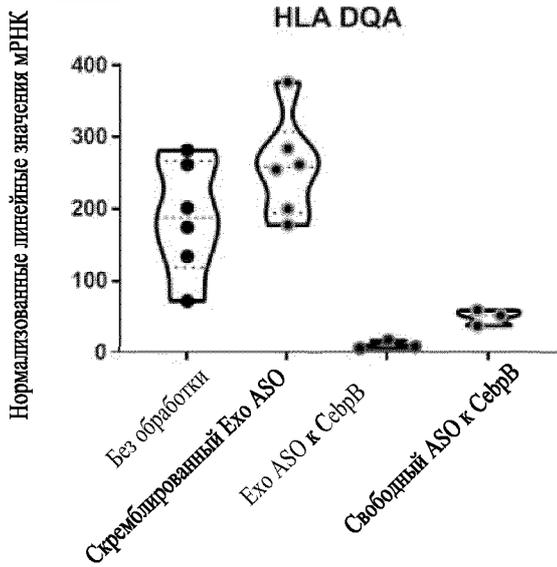


Нормализованные линейные значения мРНК

Фиг. 4H

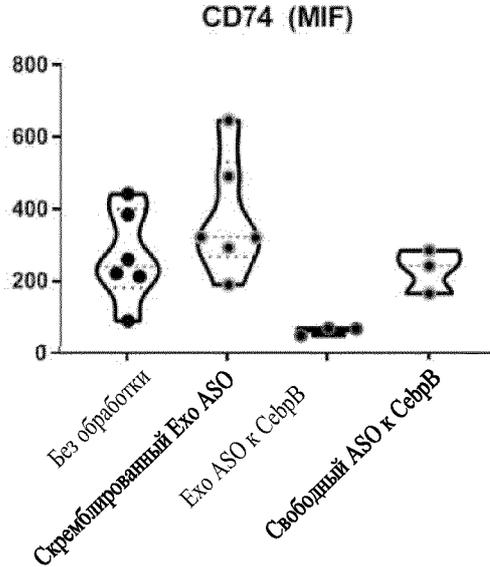


Фиг. 4I

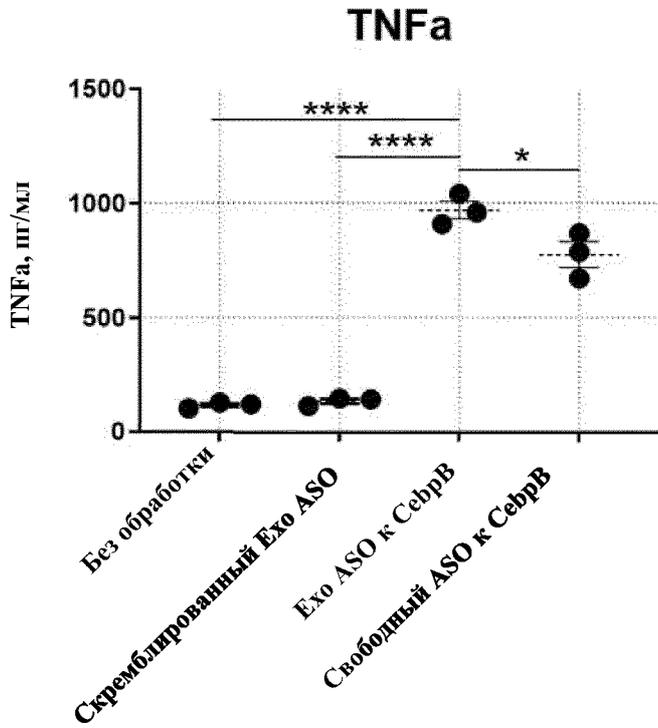


Нормализованные линейные значения мРНК

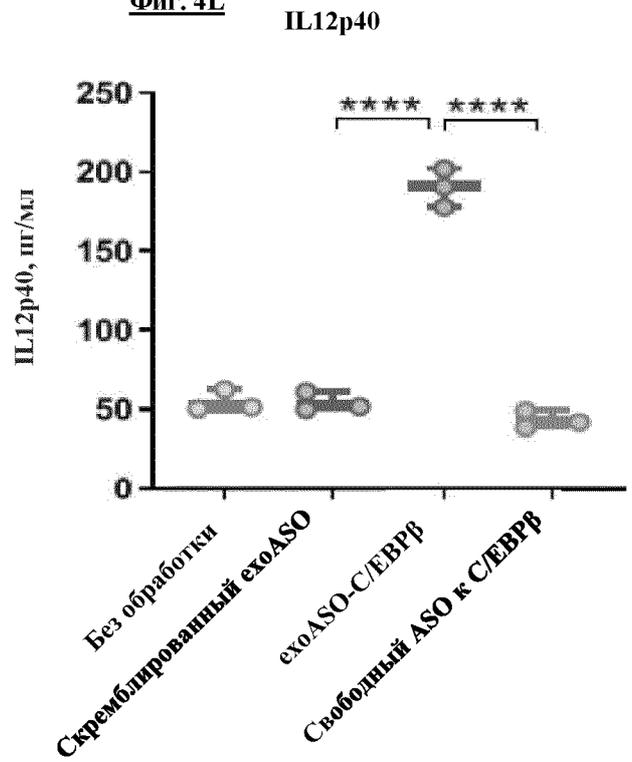
Фиг. 4J



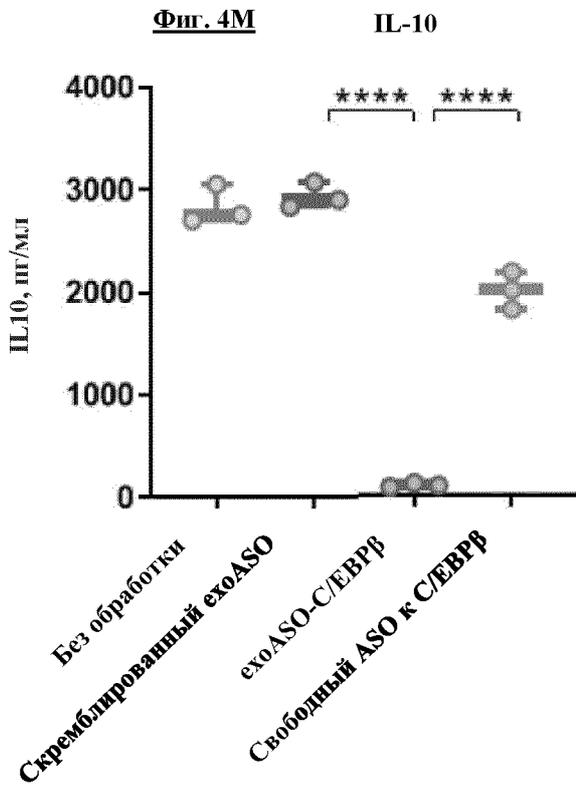
Фиг. 4K



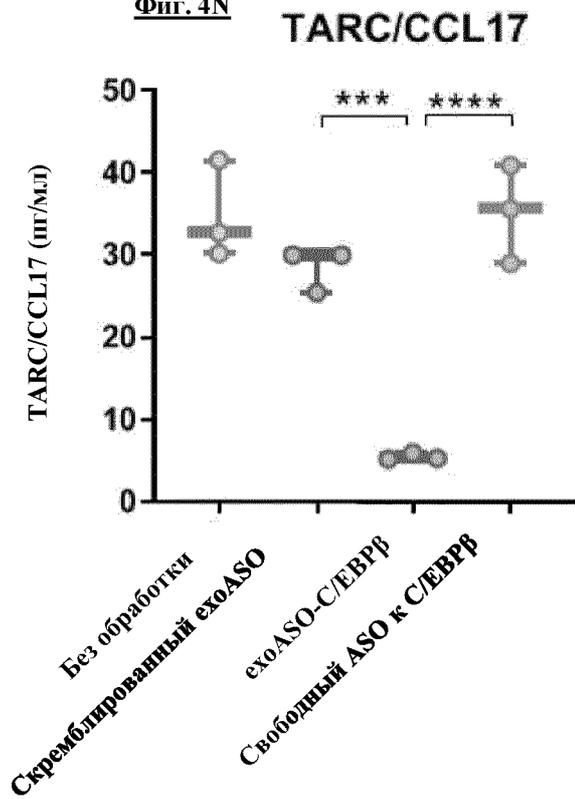
Фиг. 4L



Фиг. 4M



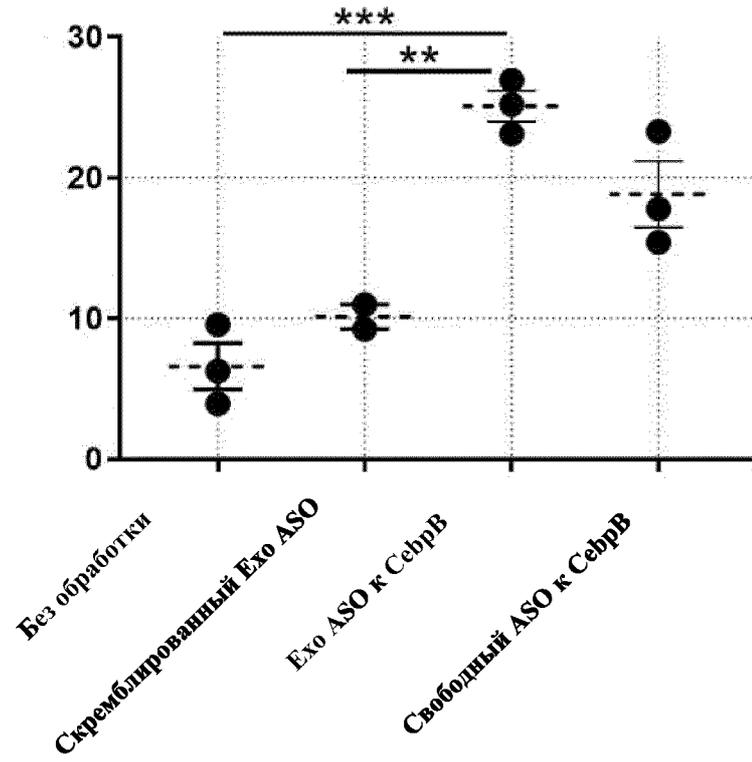
Фиг. 4N

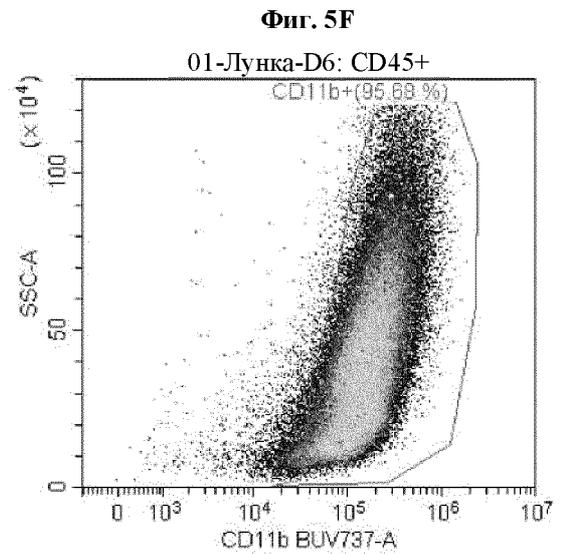
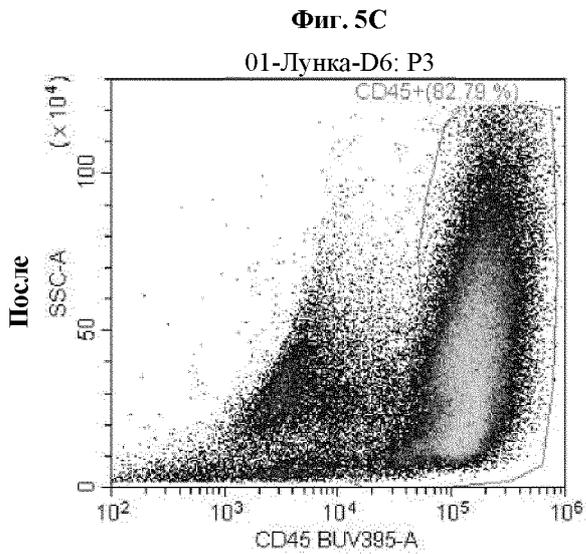
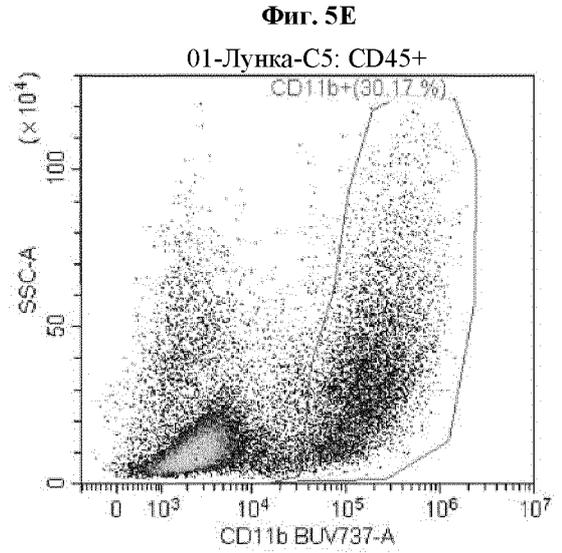
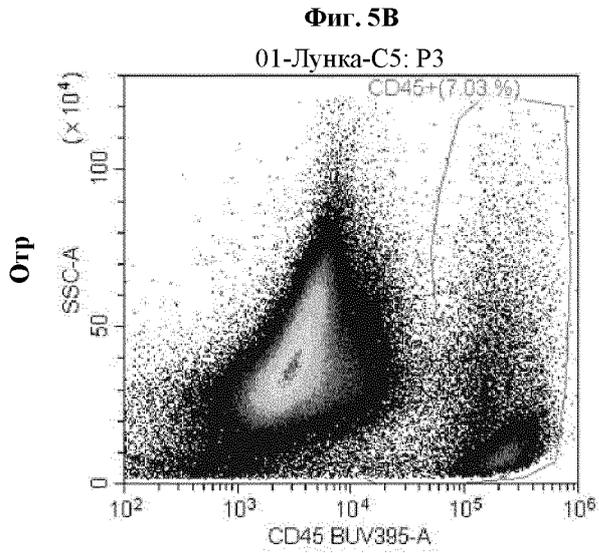
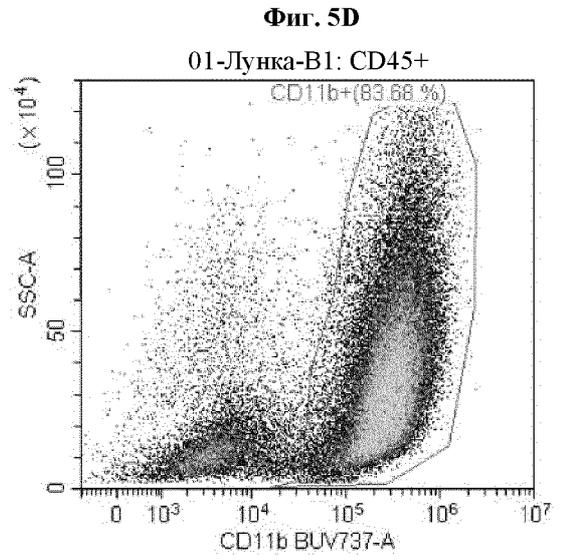
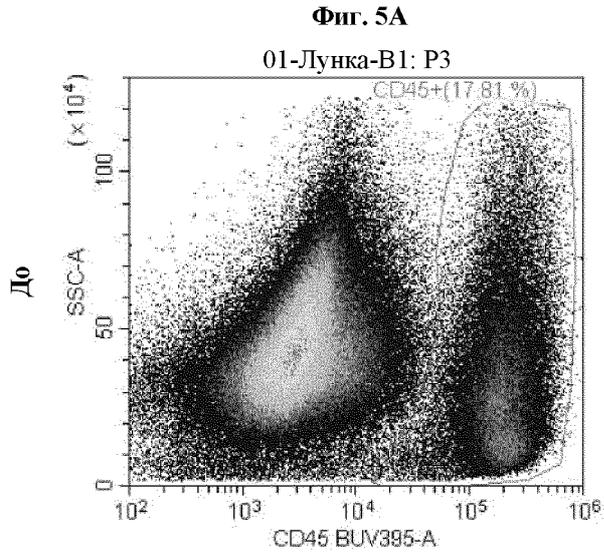


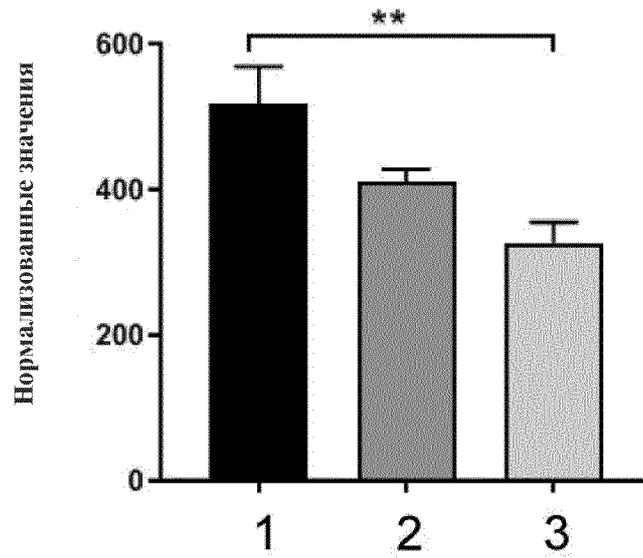
Фиг. 40

IL12b

Нормализованные линейные значения мРНК

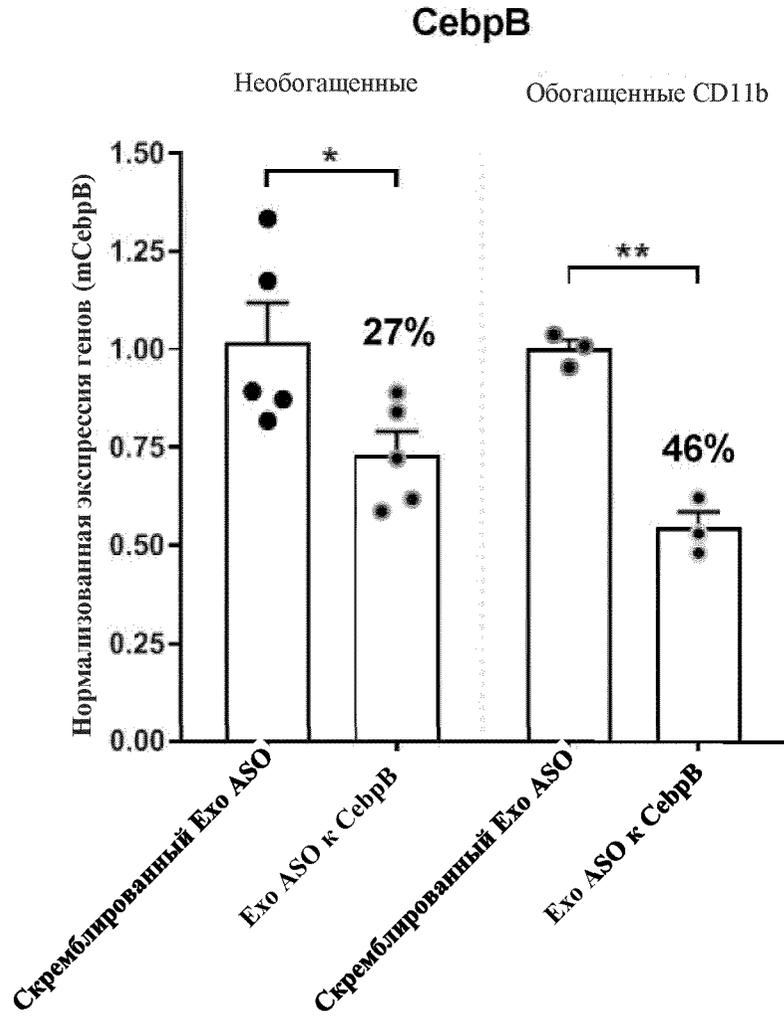




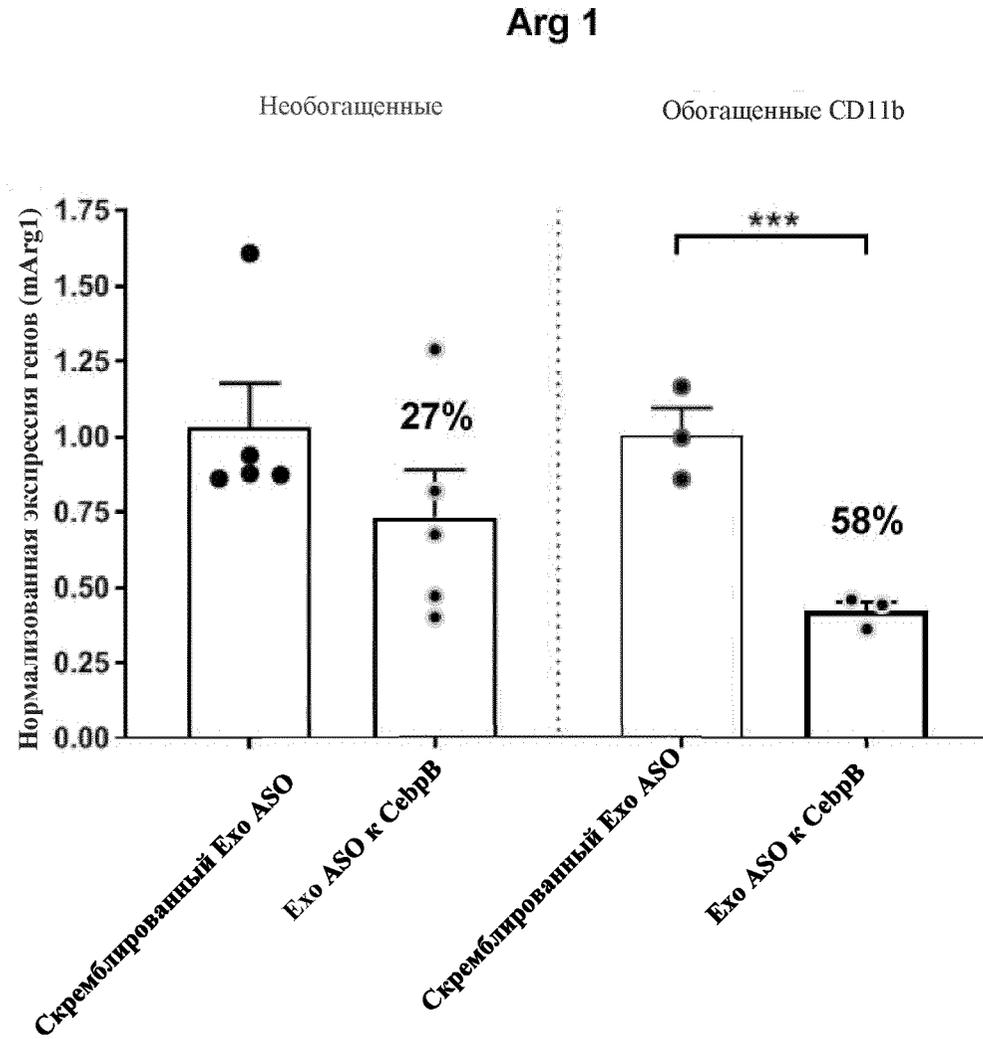
Фиг. 5G

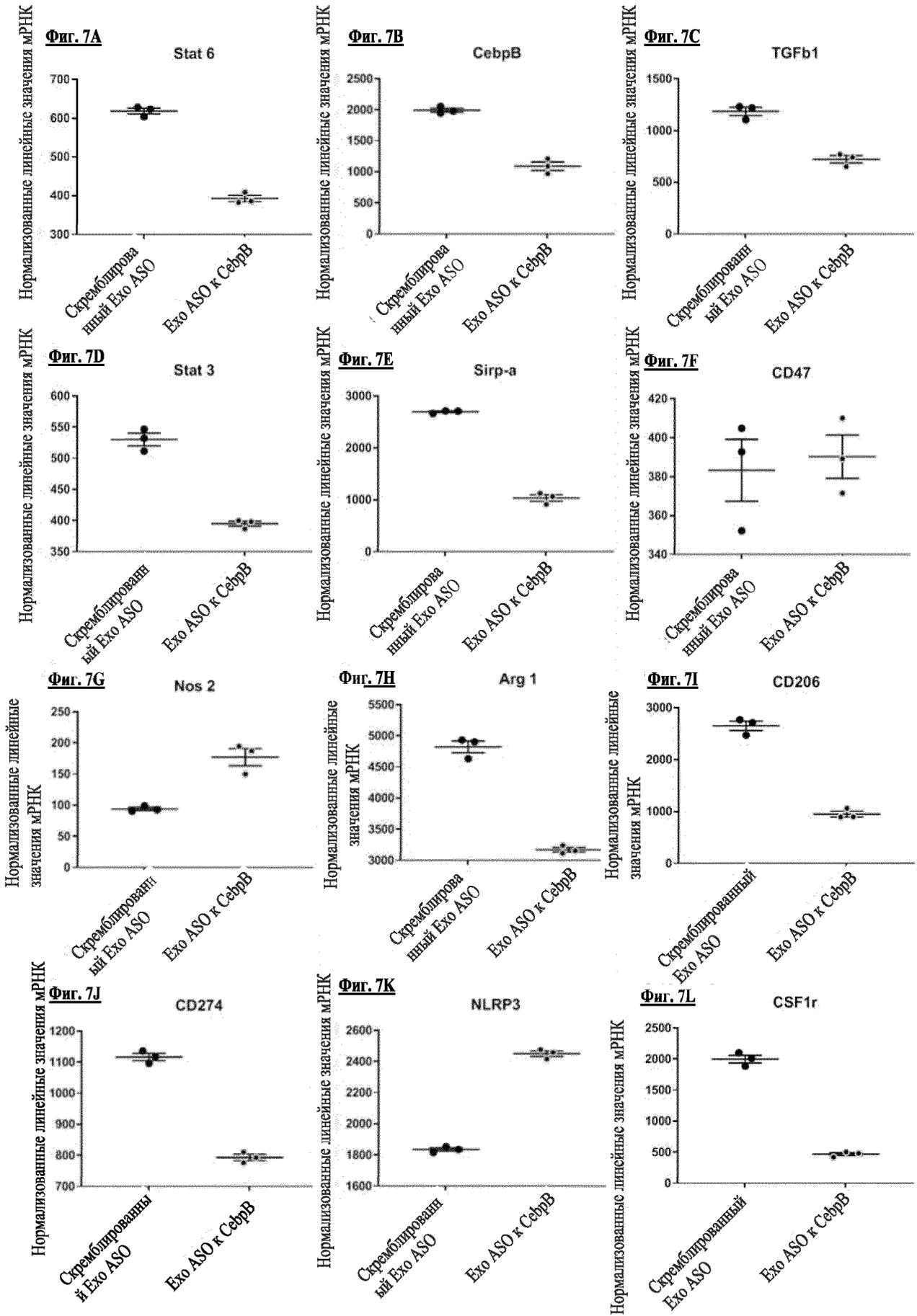
1–Ехо-скрэмблированный
2–Свободный ASO
3–Ехо-СЕВРь-ASO

Фиг. 6А

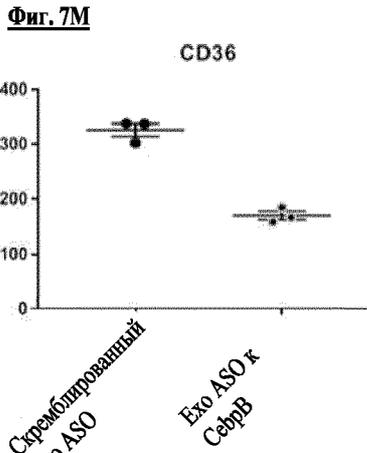


Фиг. 6В

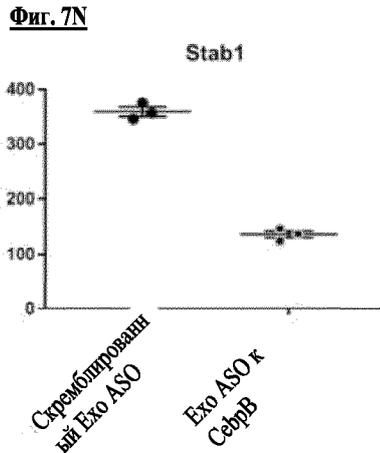




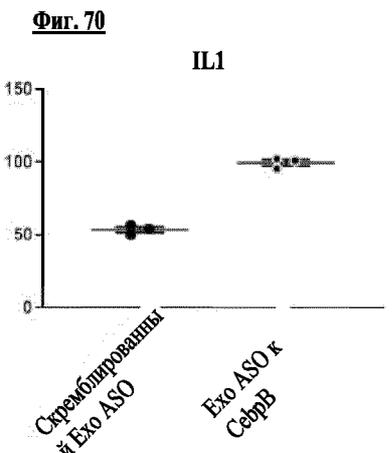
Нормализованные линейные значения мРНК



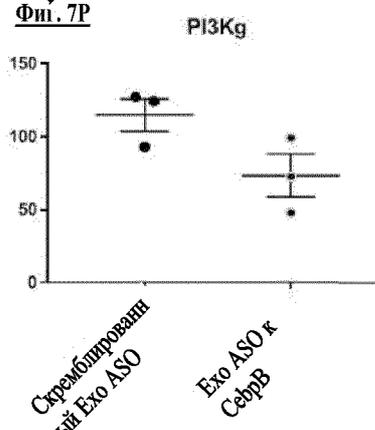
Нормализованные линейные значения мРНК



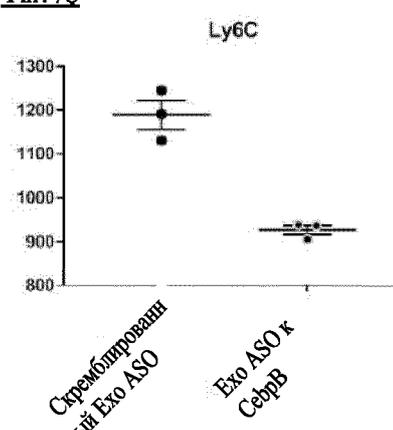
Нормализованные линейные значения мРНК



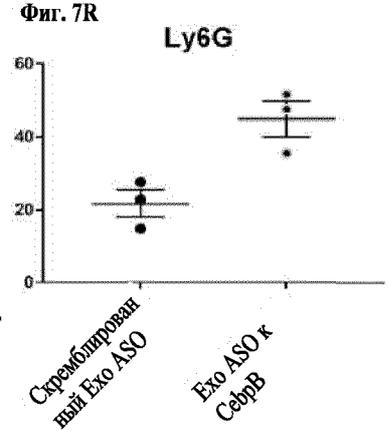
Нормализованные линейные значения мРНК



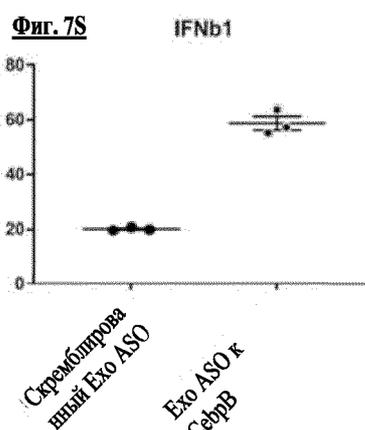
Нормализованные линейные значения мРНК



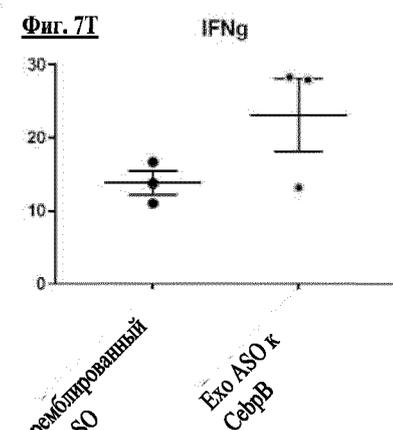
Нормализованные линейные значения мРНК



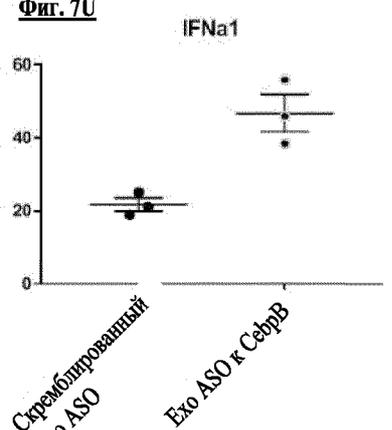
Нормализованные линейные значения мРНК



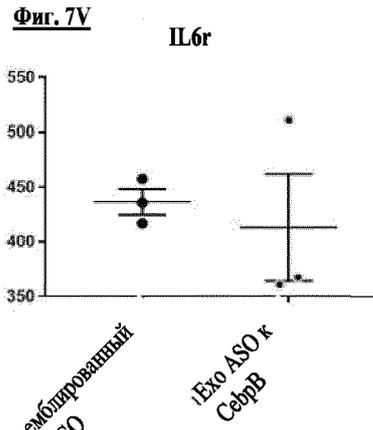
Нормализованные линейные значения мРНК



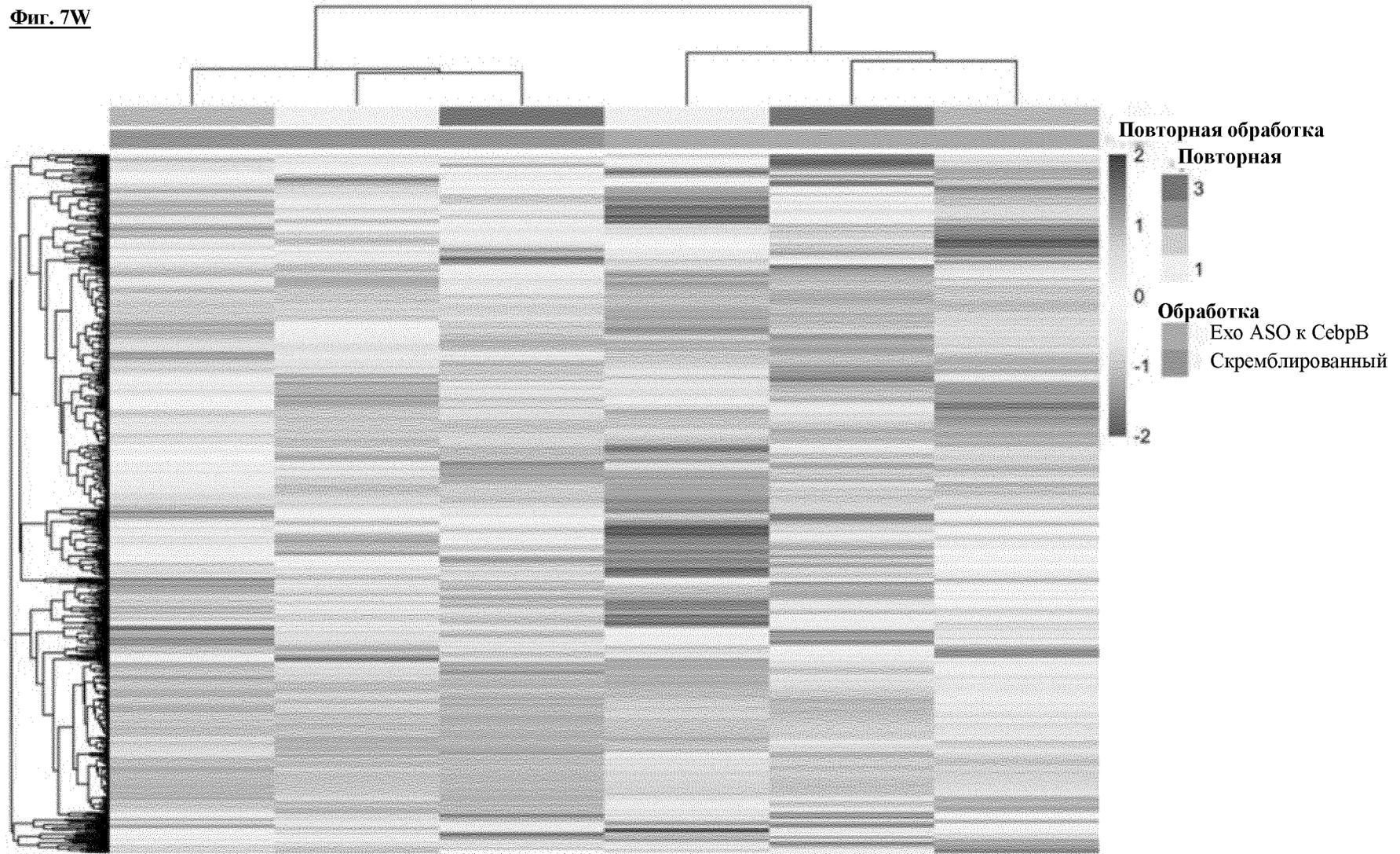
Нормализованные линейные значения мРНК



Нормализованные линейные значения мРНК



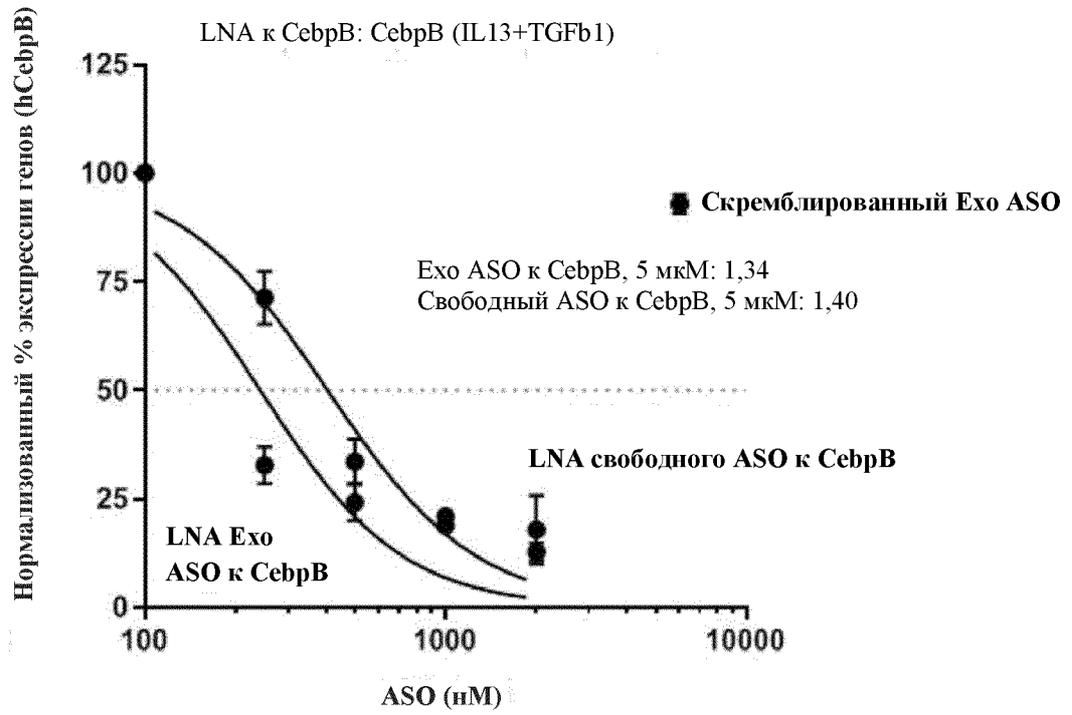
Фиг. 7W



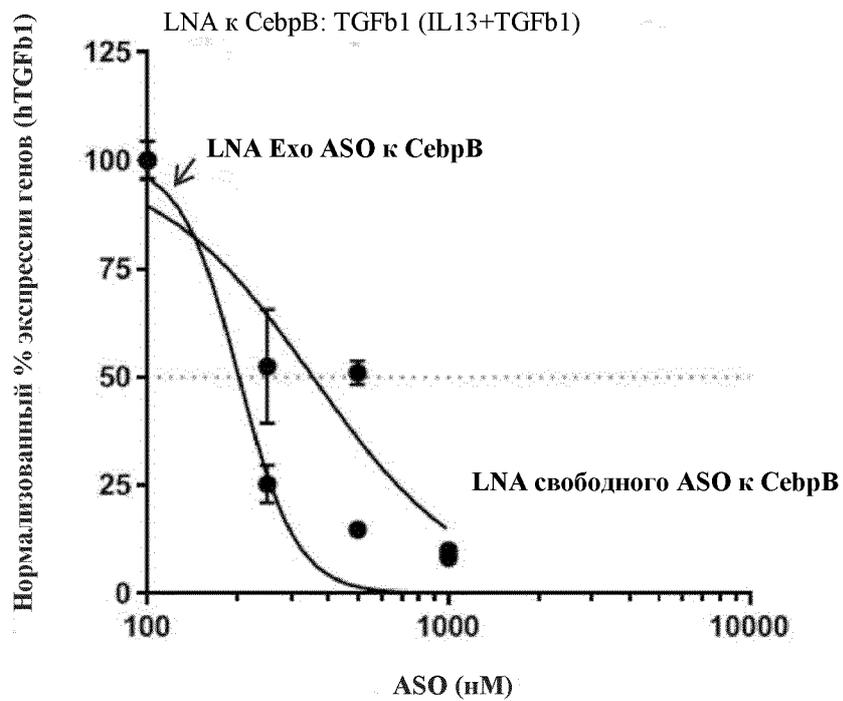
Скрембли-рованный ехо ASO

ево ASO к C/EBPβ

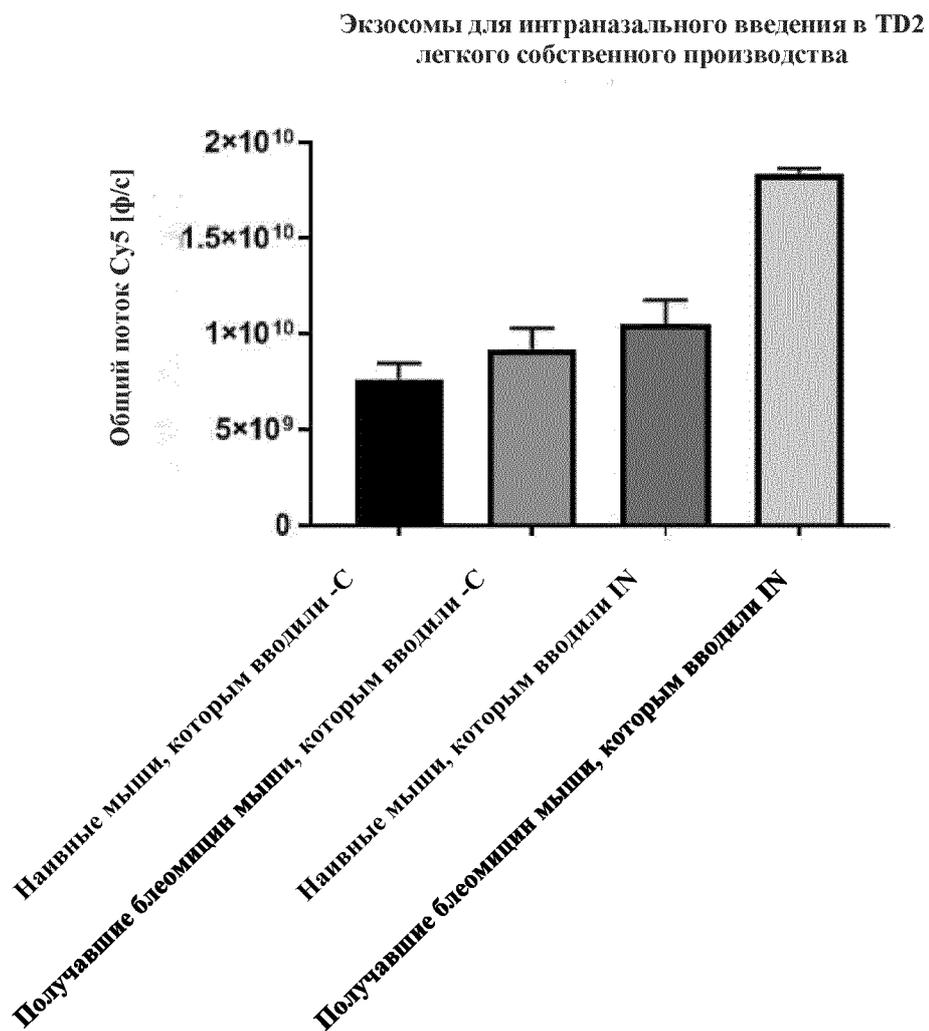
Фиг. 8А

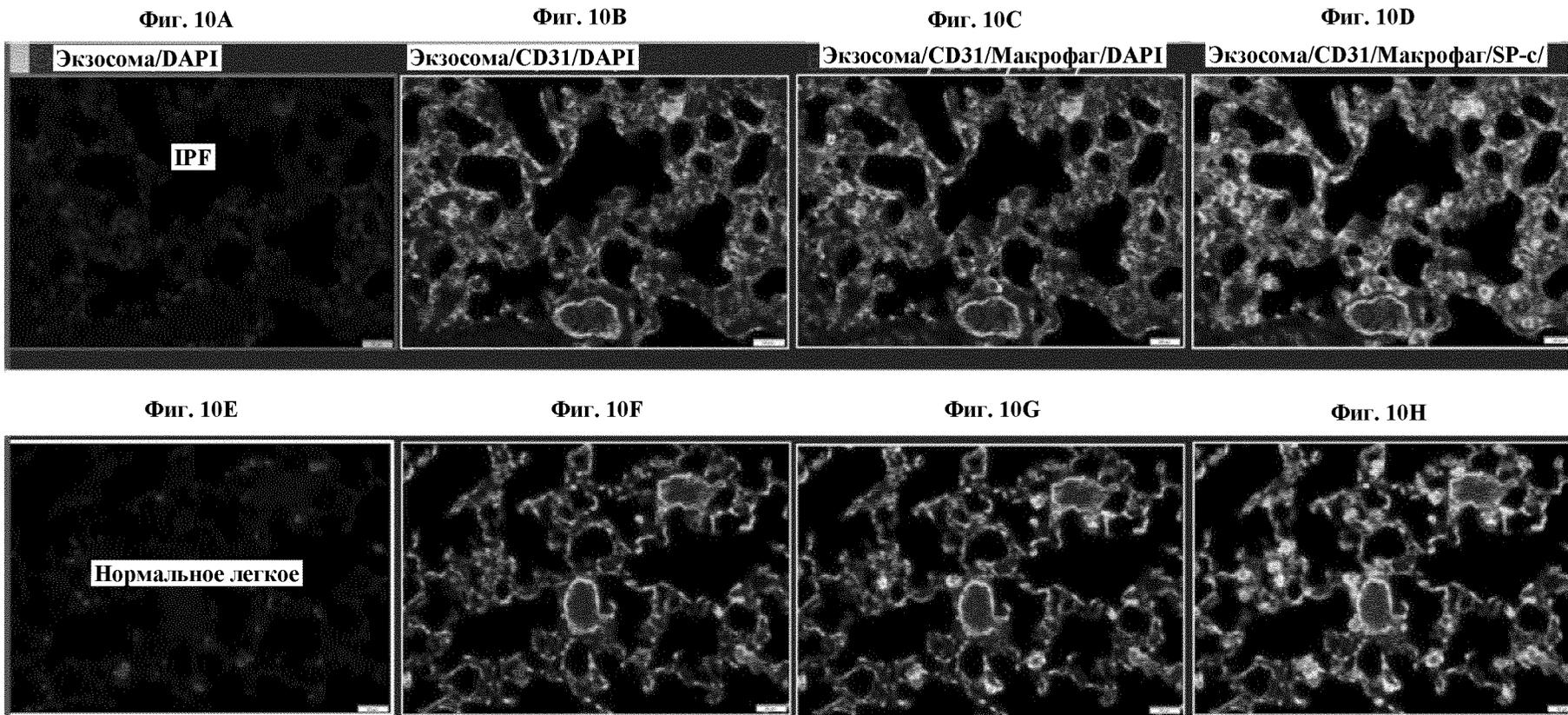


Фиг. 8В



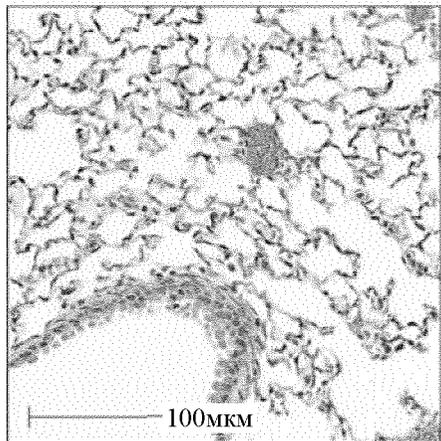
Фиг. 9



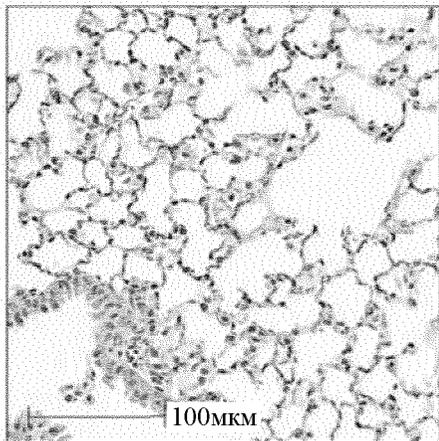


H&E

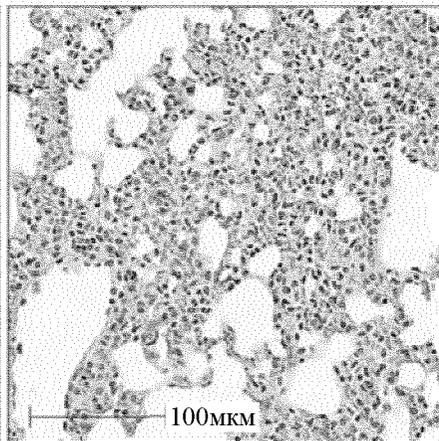
Фиг. 11А
Нормальное - 1



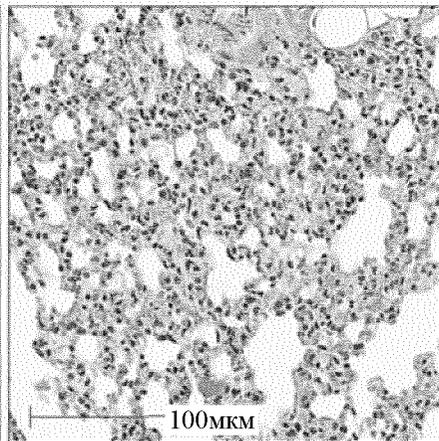
Фиг. 11В
Нормальное - 2



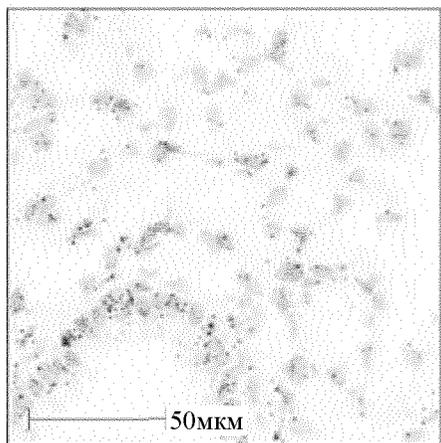
Фиг. 11С
Фиброз - 1



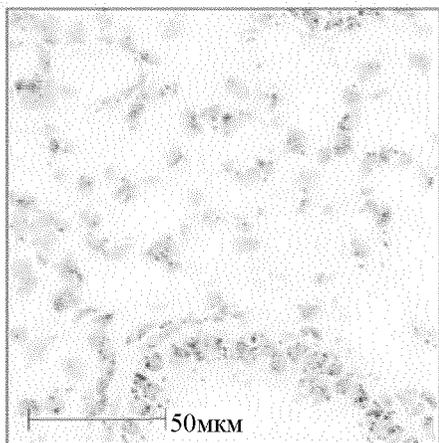
Фиг. 11D
Фиброз - 2



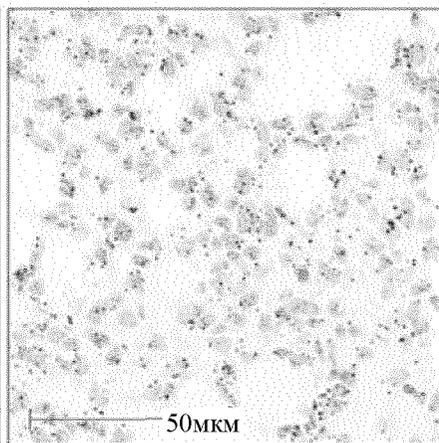
Фиг. 11Е
Нормальное - 1



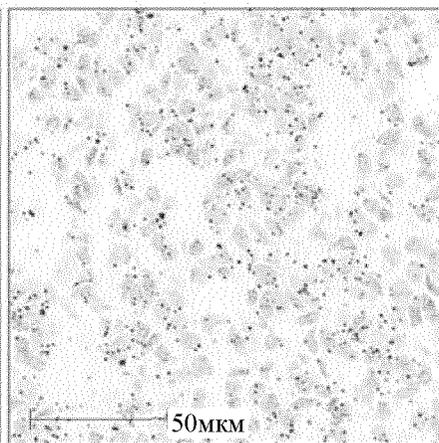
Фиг. 11F
Нормальное - 2



Фиг. 11G
Фиброз - 1

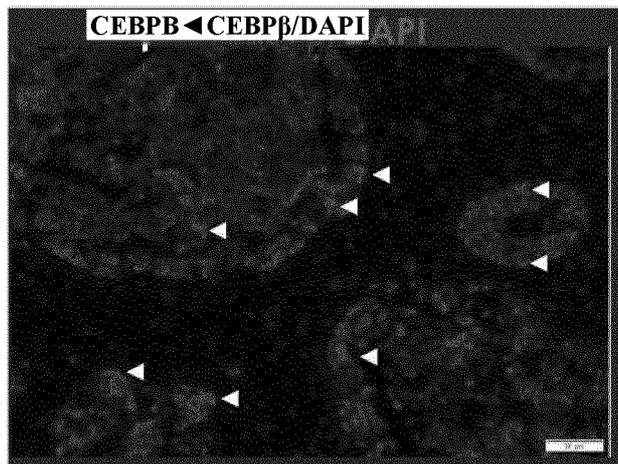


Фиг. 11H
Фиброз - 2

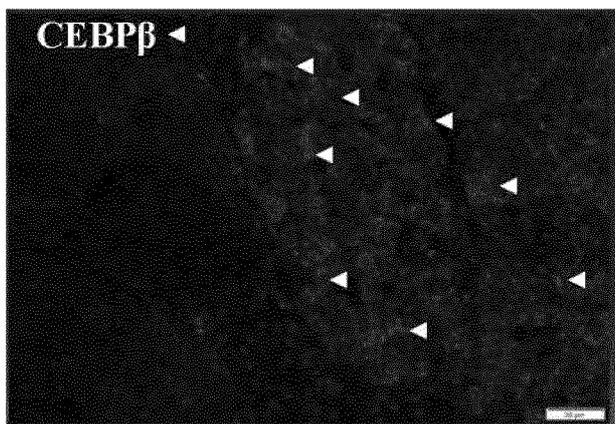


STAT6

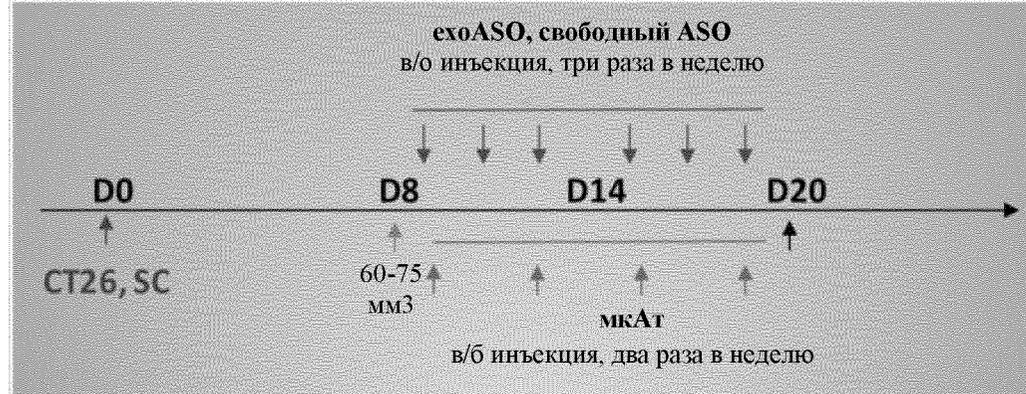
Фиг. 12А



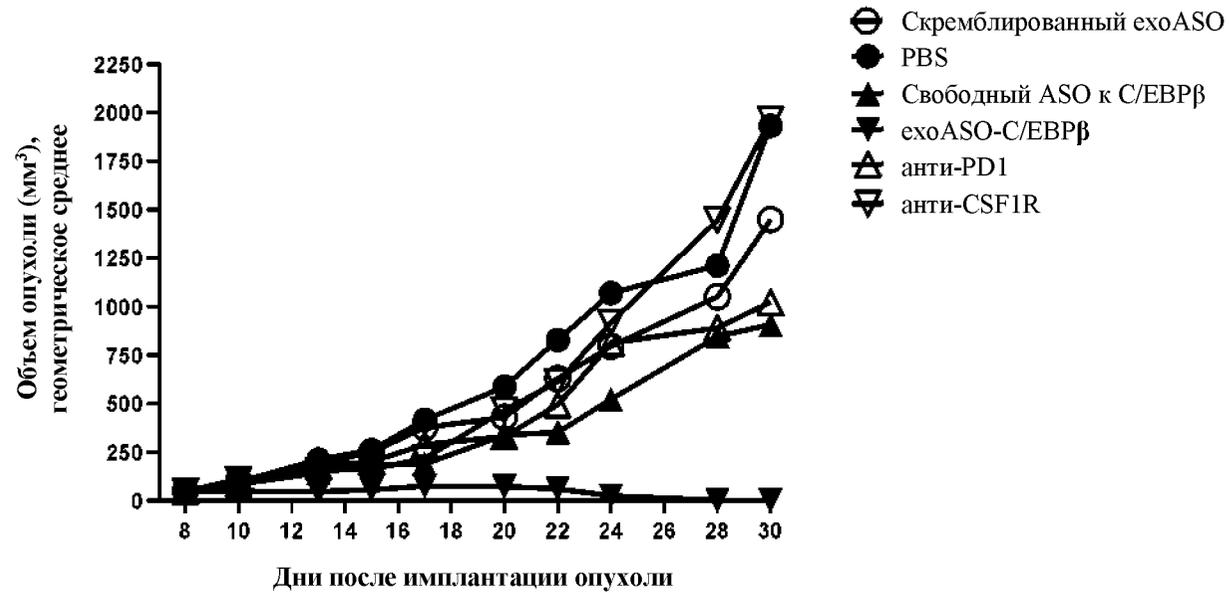
Фиг. 12В



Фиг. 13А

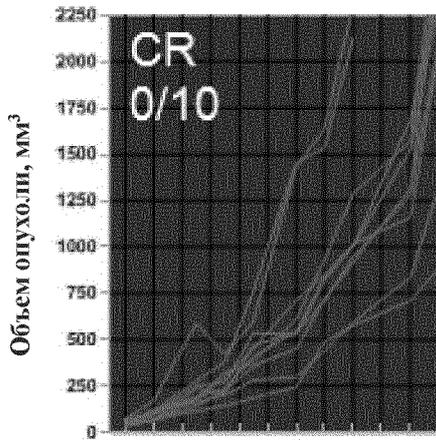


Фиг. 13В



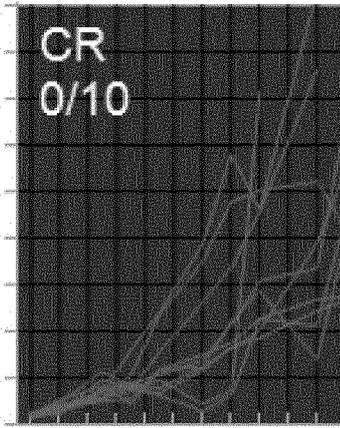
Фиг. 13С

PBS



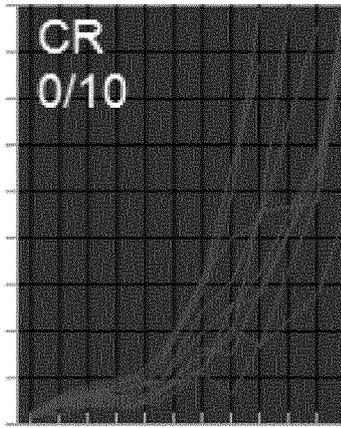
Фиг. 13D

анти-PD1



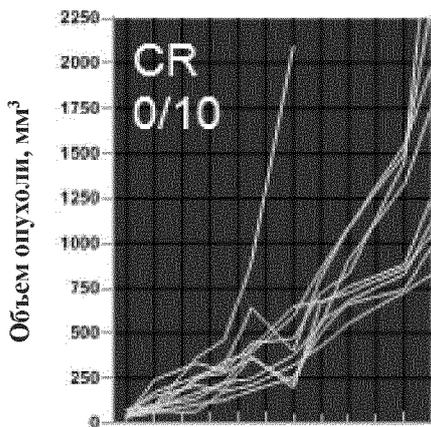
Фиг. 13E

анти-CSF1R



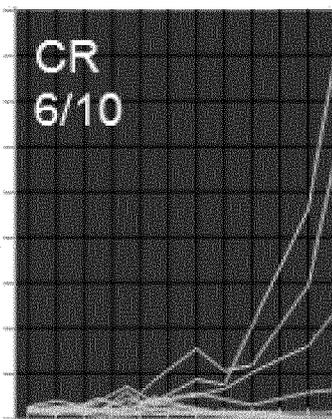
Фиг. 13F

Скремблированный эхoASO



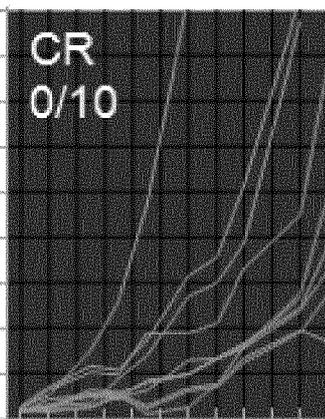
Фиг. 13G

эхoASO-C/EBPβ

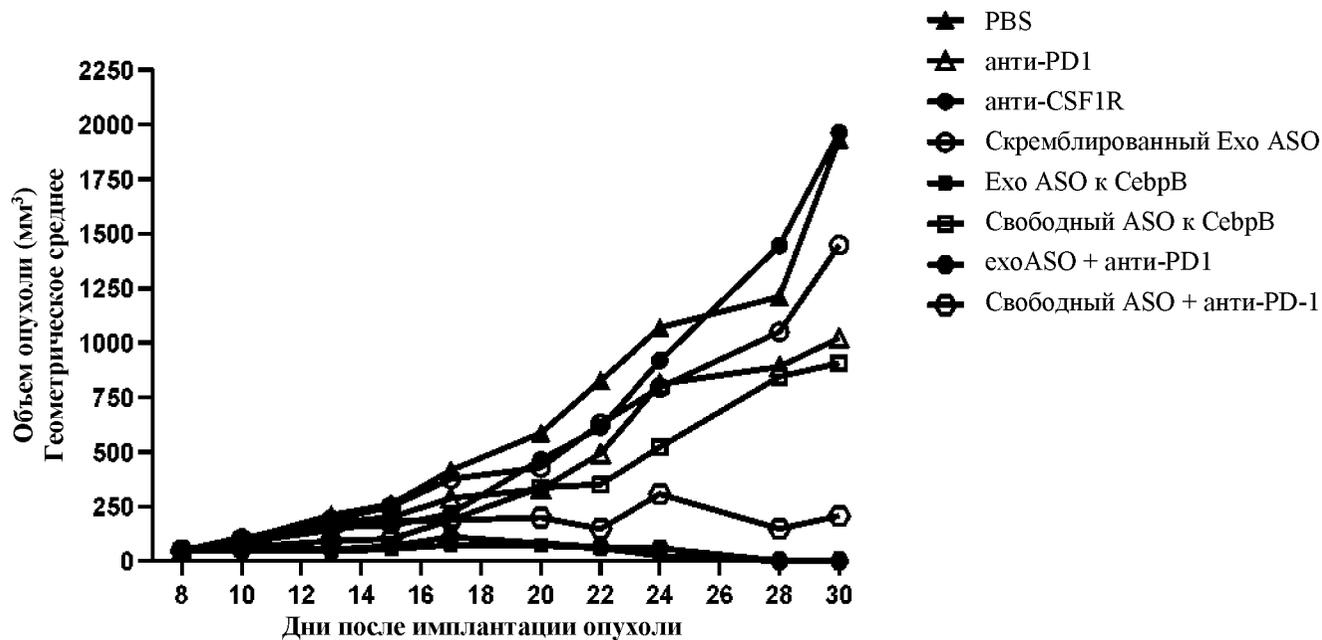


Фиг. 13H

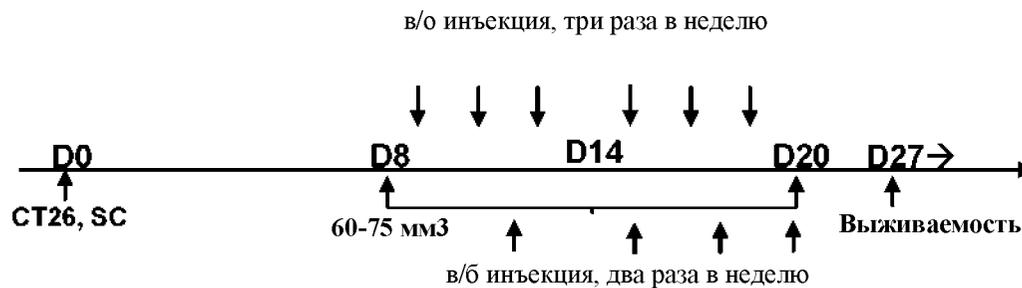
Свободный ASO к C/EBPβ

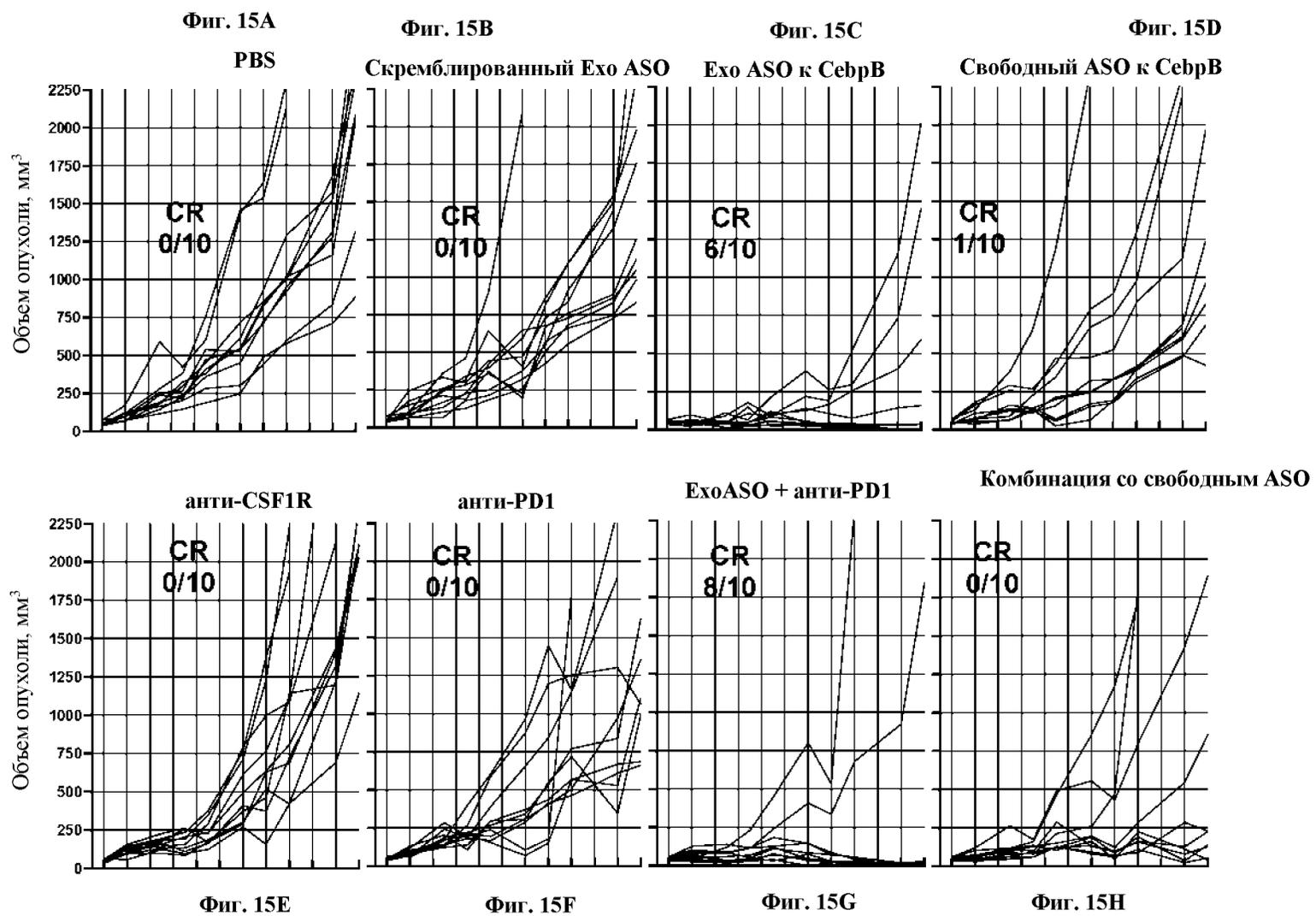


Фиг. 14А



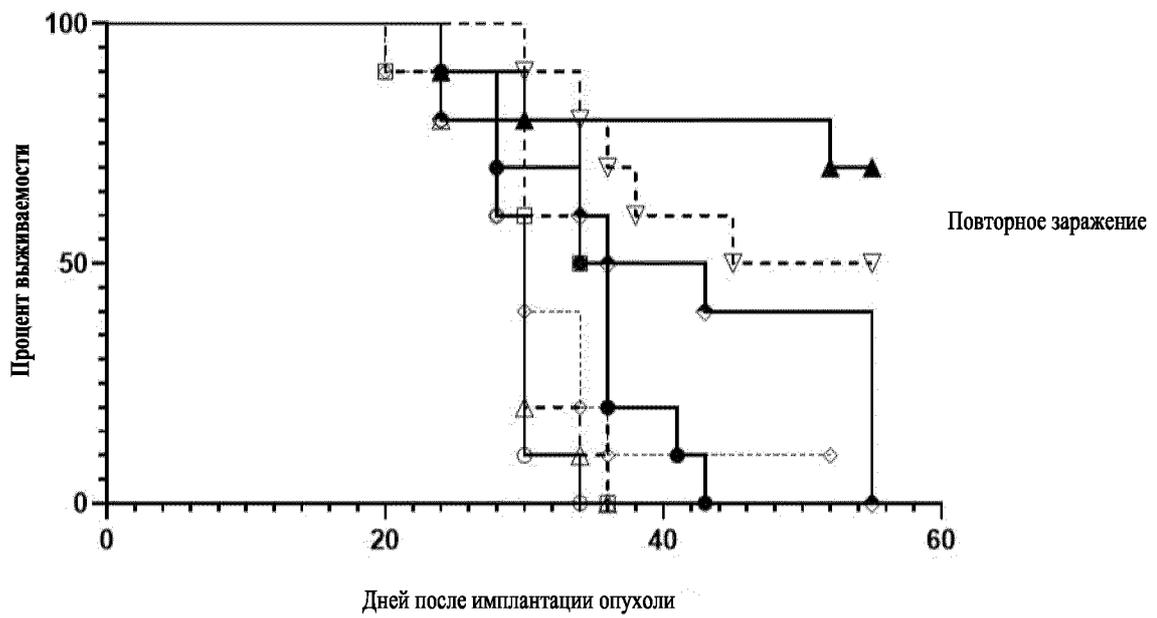
Фиг. 14В



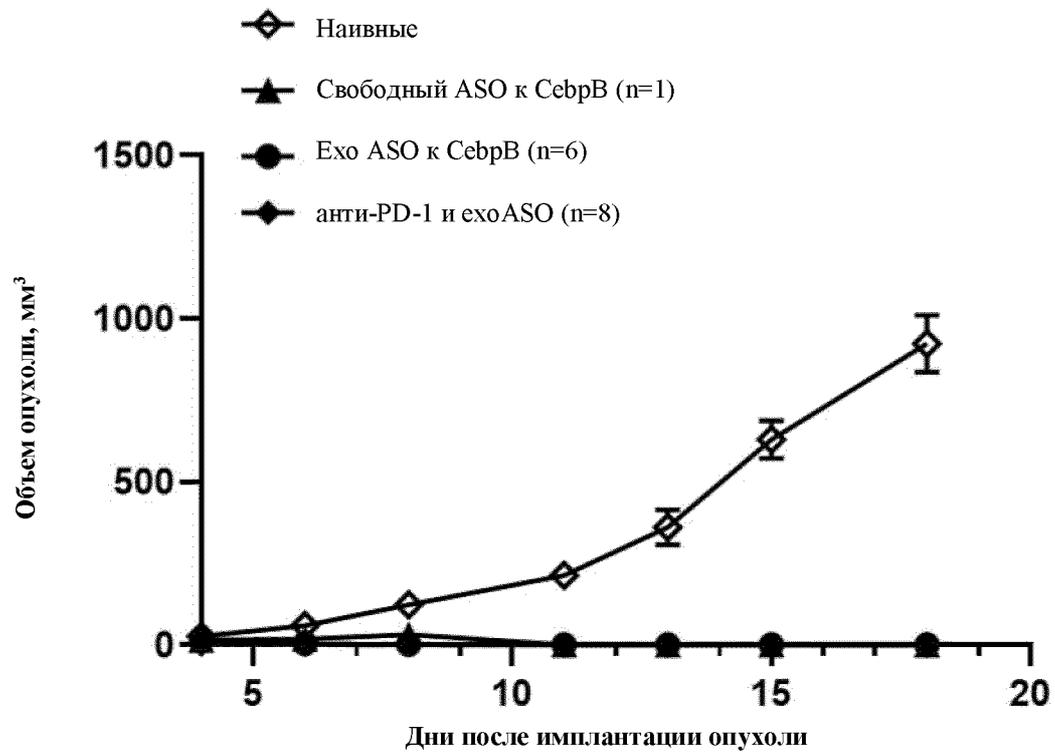


Фиг. 16

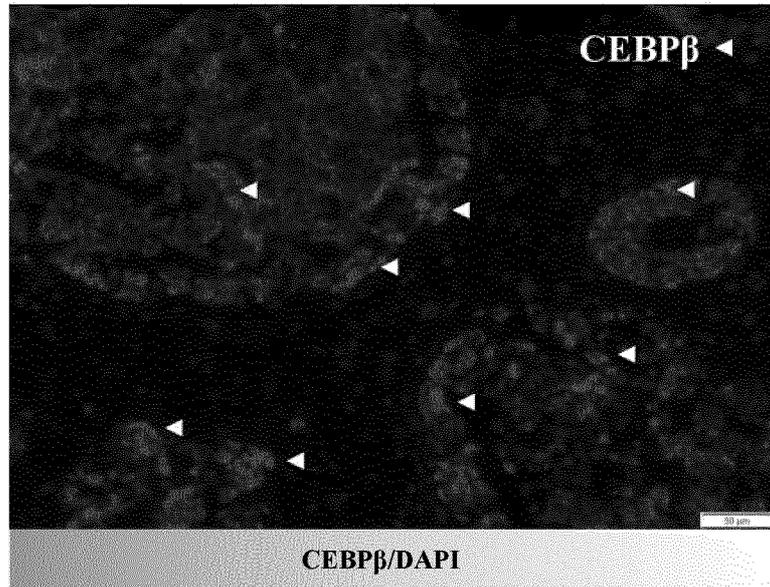
- | | | | |
|---|-------------------------------|---|-------------------------------------|
| ▣ | Скремблированный echoASO (35) | ● | анти-PD1(35) |
| △ | PBS+Изо (30) | ▲ | echoASO + анти-PD1 (неопределенный) |
| ◇ | Свободный ASO к C/EBPβ (30) | ◆ | Свободный ASO + анти-PD1 (39,5) |
| ▽ | echoASO-C/EBPβ (50) | ○ | анти-CSF1R(30) |



Фиг. 17



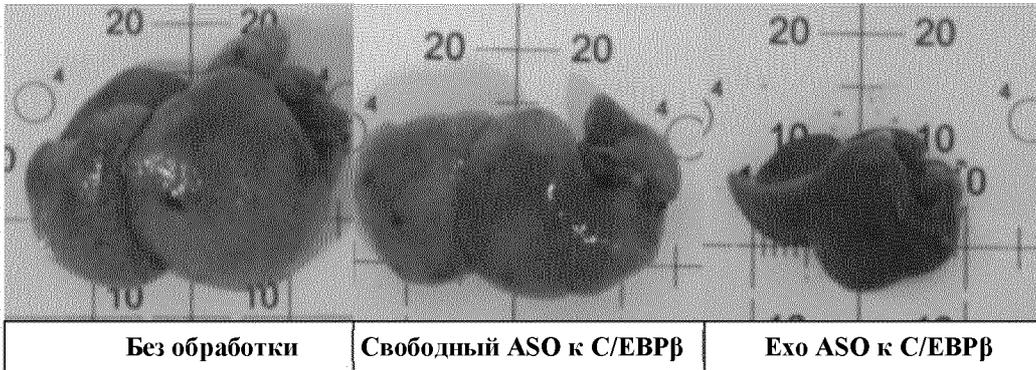
Фиг. 18А



Фиг. 18В

Фиг. 18С

Фиг. 18D

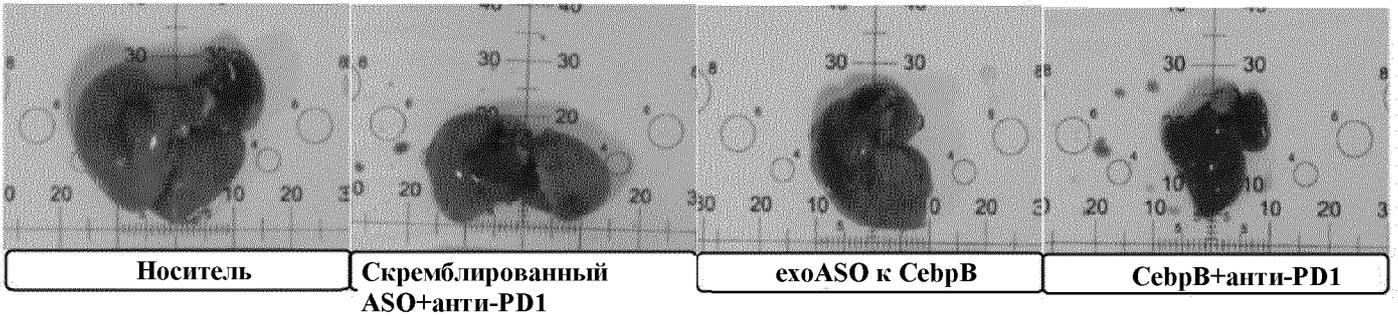


Фиг. 18Е

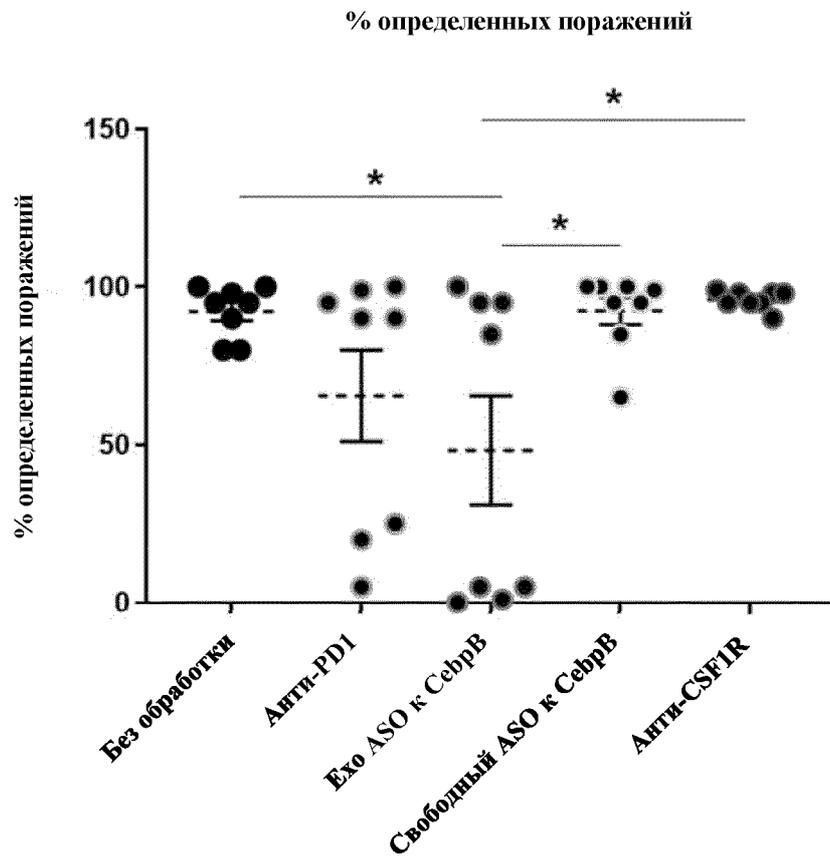
Фиг. 18F

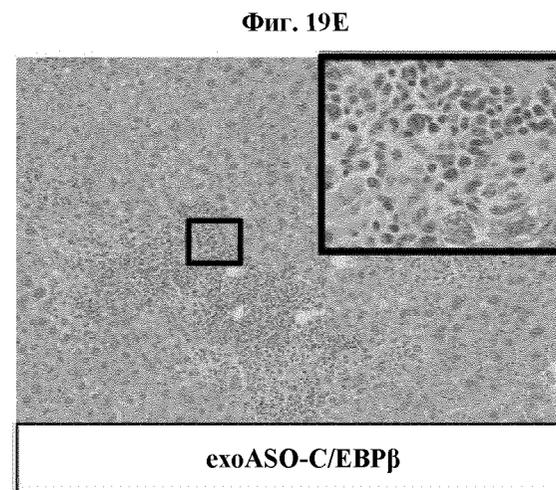
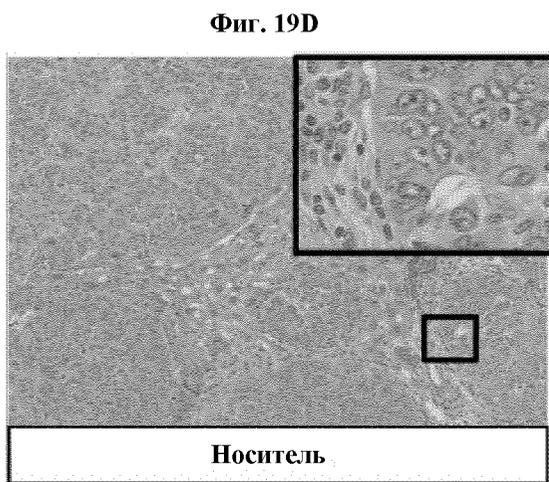
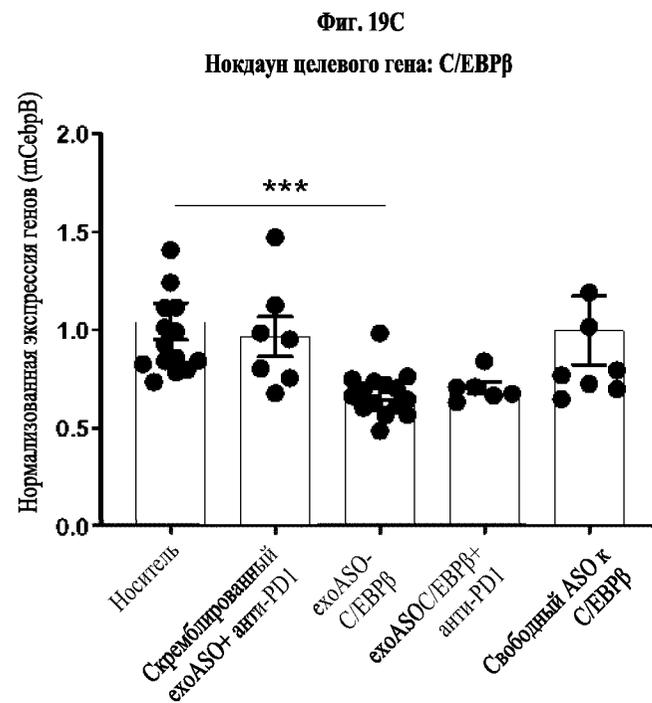
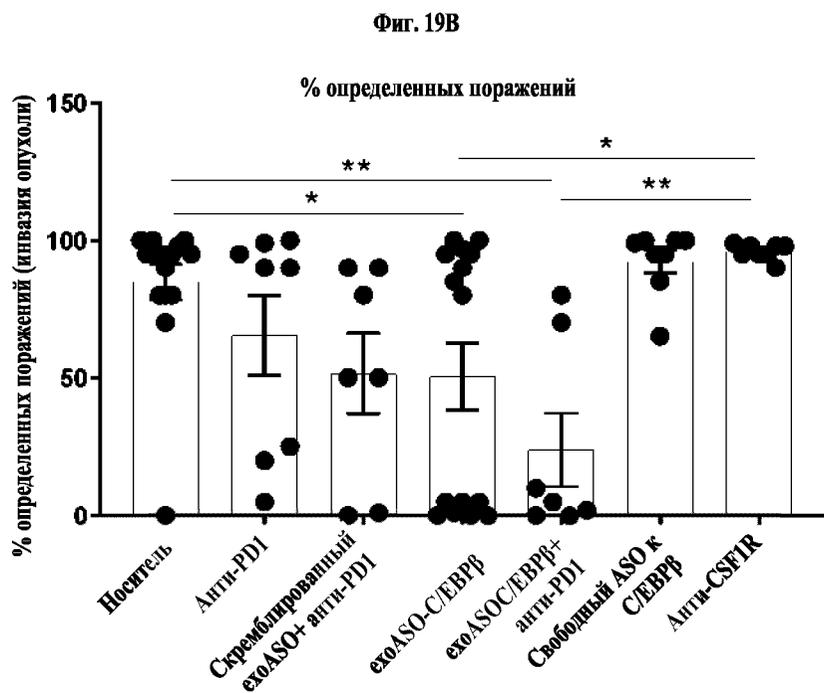
Фиг. 18G

Фиг. 18H

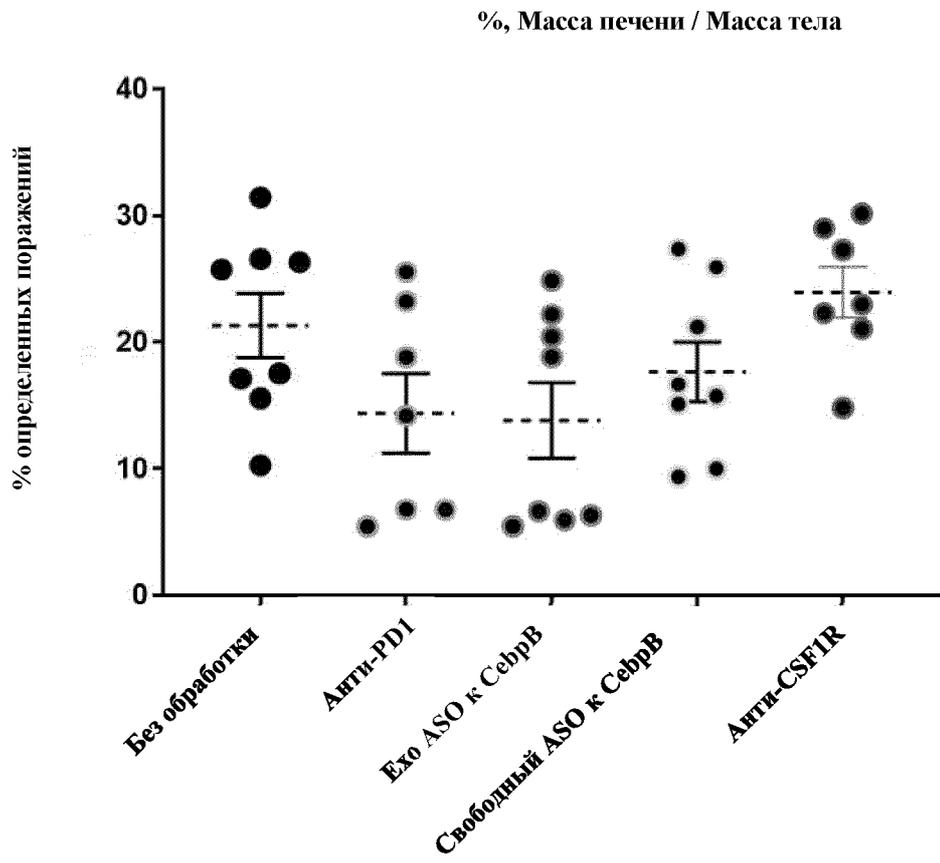


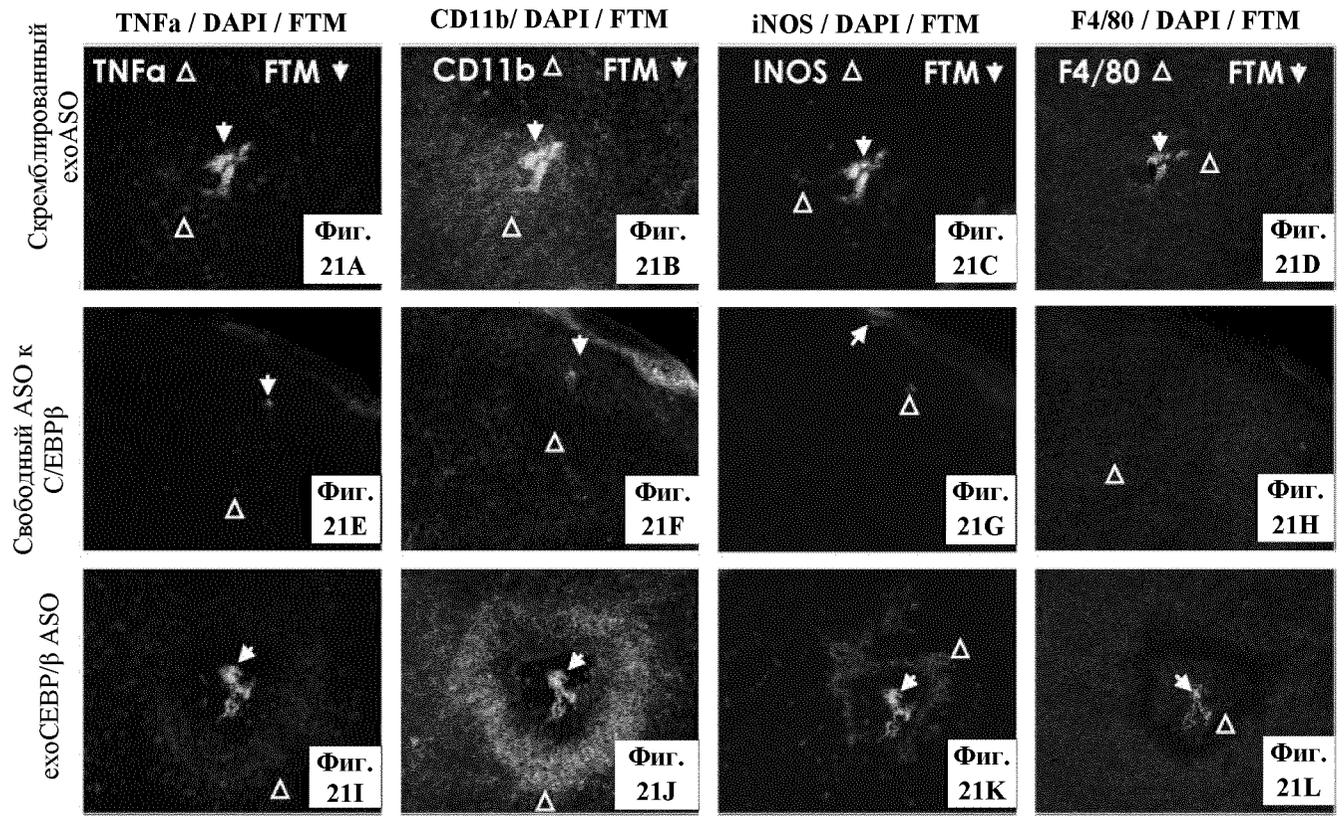
Фиг. 19А



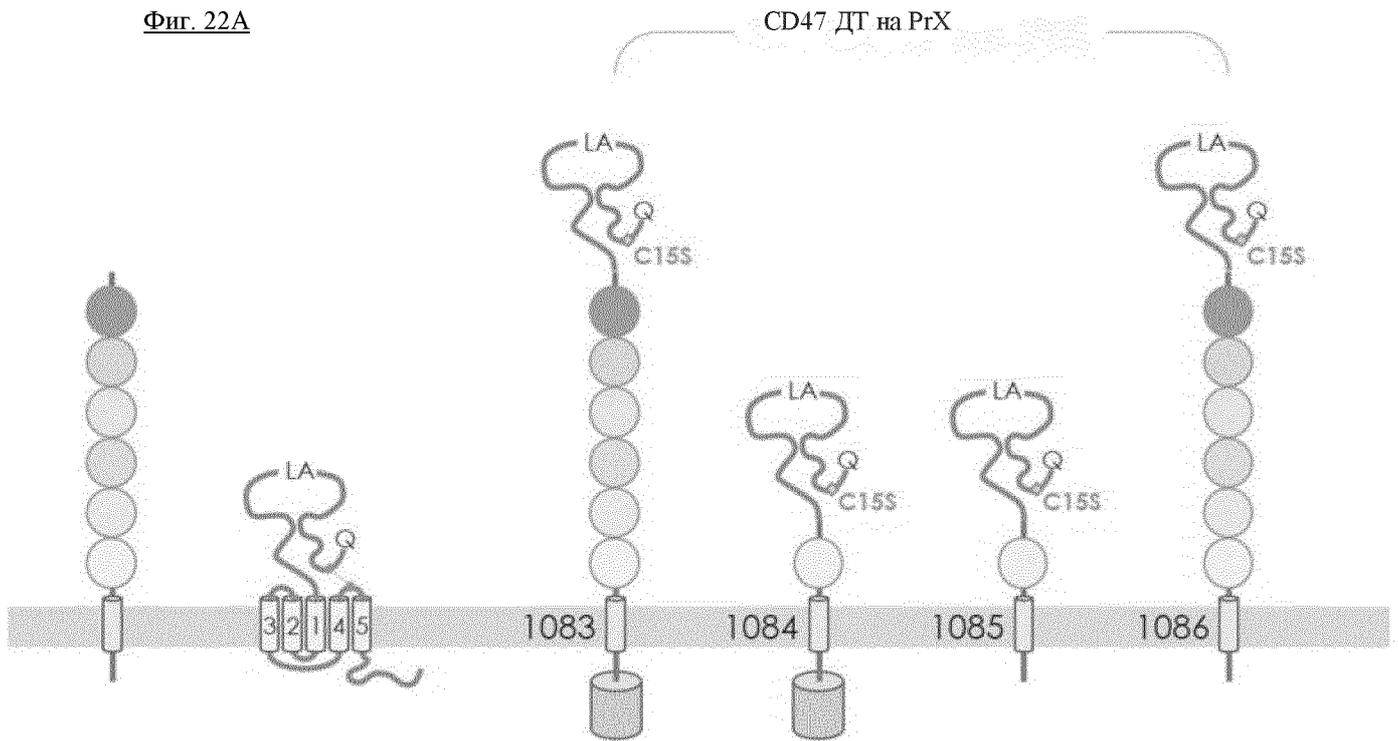


Фиг. 20

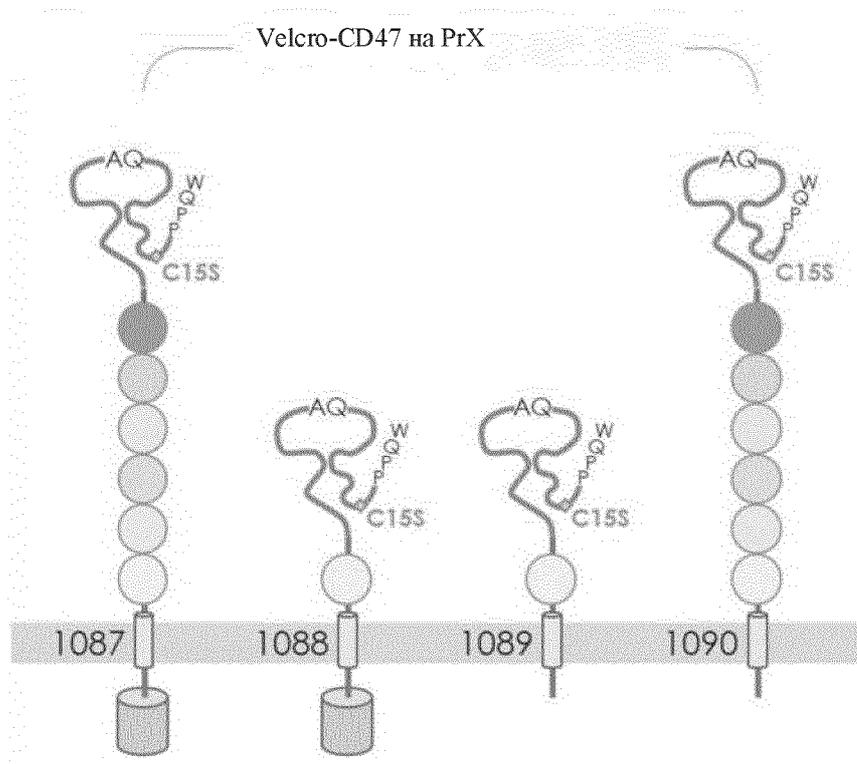




Фиг. 22А

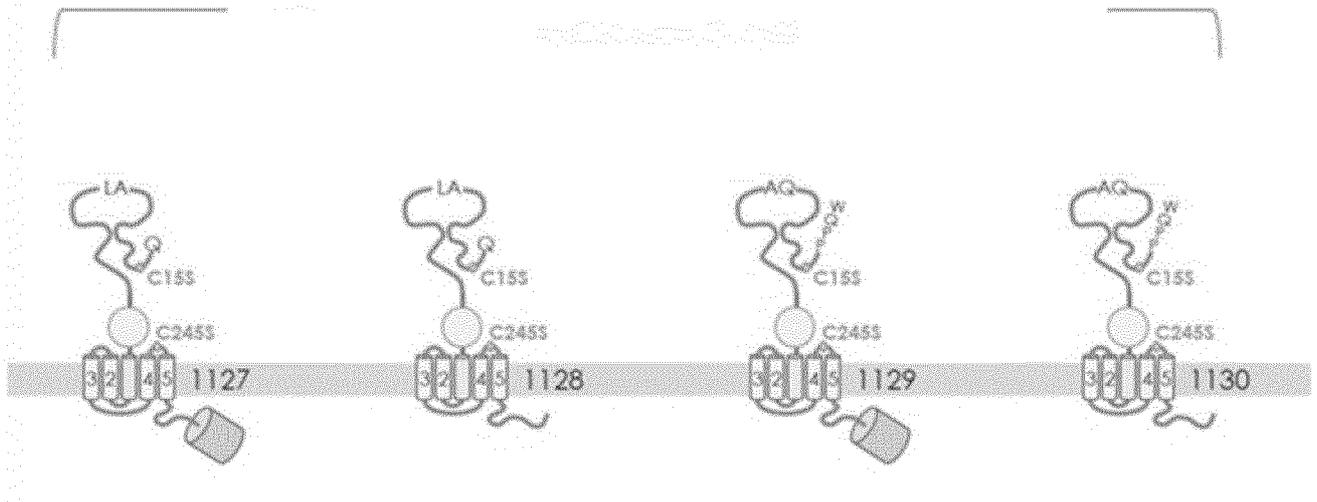


Фиг. 22В

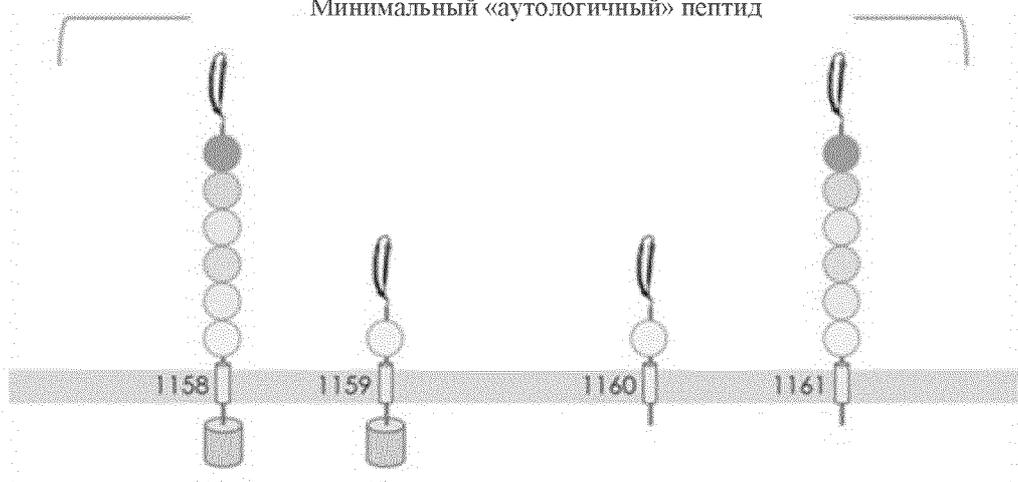


Фиг. 22С

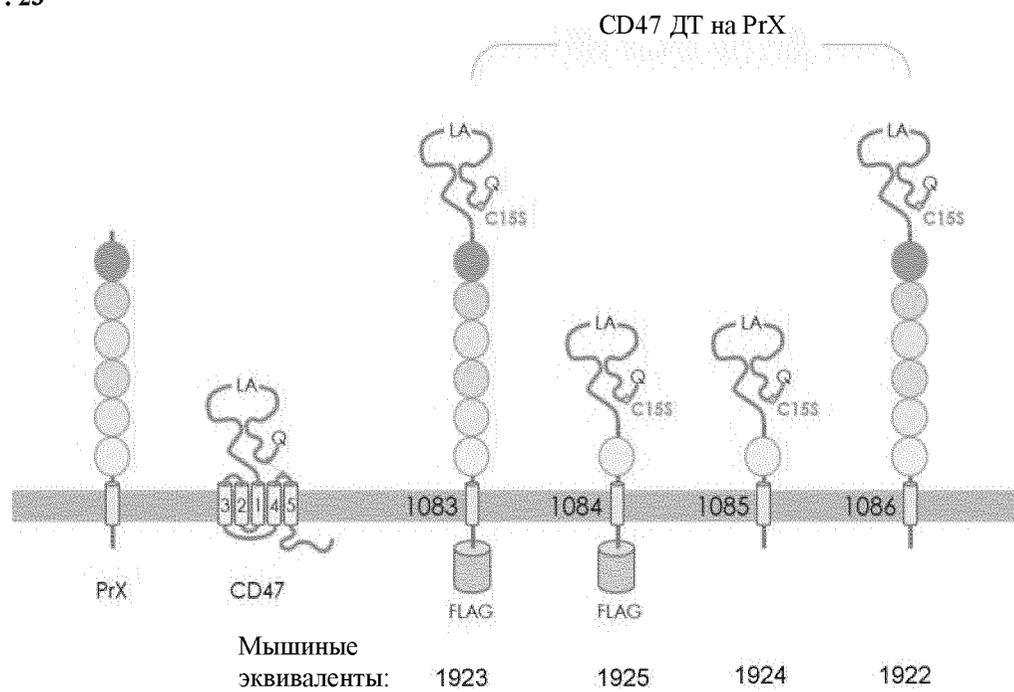
Замена первого трансмембранного домена на коротком PrX

**Фиг. 22D**

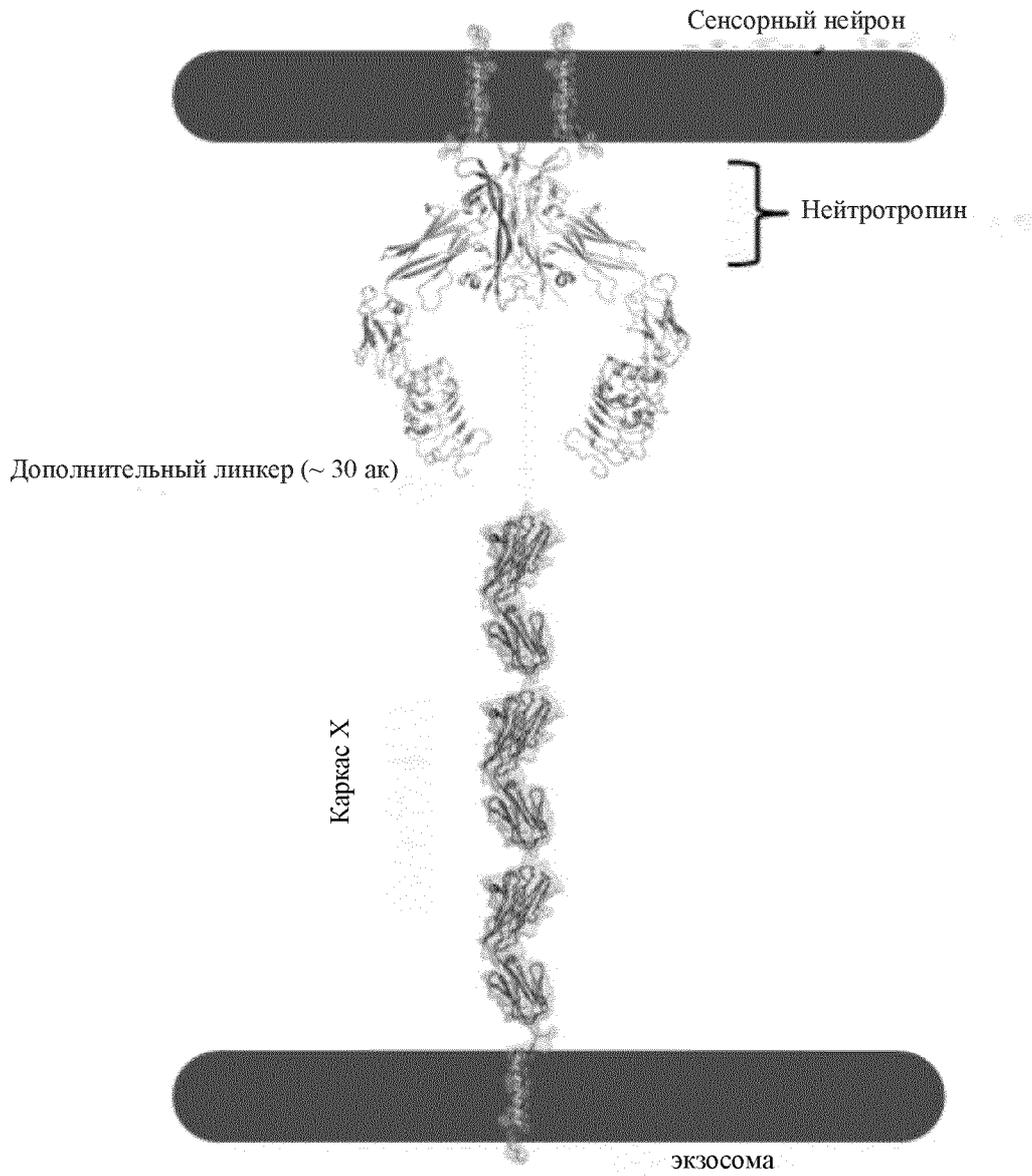
Минимальный «аутологичный» пептид



Фиг. 23



Фиг. 24А



Фиг. 24В

