

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290518 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.23

(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 11/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ВЕЗИКУЛА-АСО, НАЦЕЛЕННЫЕ НА STAT6

---

(31) 62/886,944; 62/900,138; 62/903,518;

62/936,216; 62/989,477; 63/035,392

(32) 2019.08.14; 2019.09.13; 2019.09.20;  
2019.11.15; 2020.03.13; 2020.06.05

(33) US

(86) PCT/US2020/046559

(87) WO 2021/030776 2021.02.18

(71) Заявитель:

КОДИАК БАЙОСАЙЕНСЕС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:

Бурзын Далия, Камеркар Сушрут,  
Боутин Адам Т., Брум Венди,  
Сатьянараянан 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 (АСО), где АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипт STAT6. В данном документе также предложены способы получения экзосом и способы применения экзосом для лечения и/или предотвращения заболеваний или нарушений.

---

A1

202290518

202290518

A1

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ВЕЗИКУЛА-АСО, НАЦЕЛЕННЫЕ НА STAT6

### 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\_063PC06\_ST25.txt; размер: 306,706 байта; и дата создания: 14 августа 2020 г.), поданном вместе с заявкой, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0002] Настоящая заявка РСТ испрашивает приоритет предварительных заявок США №№ 62/886 944, поданной 14 августа 2019 года; 62/900 138, поданной 13 сентября 2019 года; 62/903 518, поданной 20 сентября 2019 года; 62/936 216, поданной 15 ноября 2019 года; 62/989 477, поданной 13 марта 2020 года; и 63/035 392, поданной 5 июня 2020 года; каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к внеклеточным везикулам (ВВ), *например*, экзосомам, содержащим антисмысловой олигонуклеотид (АСО), где АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6*. В некоторых аспектах изобретения внеклеточная везикула дополнительно содержит каркасный белок.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Экзосомы представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, которые естественным образом производятся 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 другому виду животных.

[0005] Антисмысловые олигонуклеотиды стали мощным средством регуляции экспрессии целевых генов *in vitro* или *in vivo*. Тем не менее, остается необходимость в улучшении стабильности и нацеливания АСО *in vivo*. Соответственно, 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 рака), необходимы для лучшего обеспечения терапевтическое использование и другие применения технологий на основе ВВ.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена внеклеточная везикула, содержащая антисмысловой олигонуклеотид (АСО), который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6* (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах АСО не является TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 89).

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

**[0008]** В некоторых аспектах, АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2056 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидов 2059-3963 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6*. В некоторых аспектах, АСО способен снижать экспрессию белка *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок *STAT6*. В некоторых аспектах, экспрессия белка *STAT6* снижена по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или примерно на 100% по сравнению с экспрессией белка *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.

**[0009]** В некоторых аспектах, АСО способен снижать уровень мРНК *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК

*STAT6*. В некоторых аспектах, уровень мРНК *STAT6* снижен по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или примерно на 100% по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.

**[0010]** В некоторых аспектах, АСО представляет собой гэпмер, миксмер или тоталмер. В некоторых аспектах, АСО содержит один или более нуклеозидных аналогов. В некоторых аспектах, один или более из нуклеозидных аналогов 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 (АНК); 2'-фтор-АНК или бициклический нуклеозидный аналог. В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром. В некоторых аспектах, нуклеозид с модифицированным сахаром, представляет собой увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром. В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов включают нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов включают ЗНК.

**[0011]** В некоторых аспектах, один или более нуклеотидных аналогов выбран из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ),  $\alpha$ -L-ЗНК,  $\beta$ -D-ЗНК, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-ЗНК, окси-ЗНК, тио-ЗНК и любой их комбинации. В некоторых аспектах, АСО содержит одно или более нуклеотидных оснований 5'-метил-цитозина.

**[0012]** В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей (i) нуклеотиды 1–700 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотиды 1000–1500 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотиды 1500–2000 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотиды 2000–2500 из SEQ ID NO: 3; (v) 2500–3000 из SEQ ID NO: 3; (vi) 3000–3700 из SEQ ID NO: 3, (vii) нуклеотиды 413–803 из SEQ ID NO: 3; (viii) нуклеотиды 952–1688 из SEQ ID NO: 3; (ix) нуклеотиды 1726–2489 из SEQ ID NO: 3; (x) нуклеотиды 2682–2912 из SEQ ID NO: 3; (xi) 2970–3203 из SEQ ID NO: 3; (xii) 3331–3561 из SEQ ID NO: 3; (xiii) нуклеотиды 463–753 из SEQ ID NO: 3; (xiv) нуклеотиды 1002–1638 из SEQ ID NO: 3; (xv) нуклеотиды 1776–2439 из SEQ ID NO: 3; (xvi) нуклеотиды 2682–2862 из SEQ ID NO: 3; (xvii) 3020–3153 из SEQ ID NO: 3; (xviii) 3381–3511 из SEQ ID NO: 3; (xix) нуклеотиды 503–713 из SEQ ID NO: 3; (xx) нуклеотиды 1042–1598 из SEQ ID NO: 3; (xxi) нуклеотиды 1816–2399 из SEQ ID NO: 3; (xxii) нуклеотиды 2722–2822 из SEQ ID NO: 3;

(xxiii) 3060–3113 из SEQ ID NO: 3 или (xxiv) 3421–3471 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) нуклеотидов 513-703 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидов 1052-1588 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидов 1826-2389 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидов 2732-2812 из SEQ ID NO: 3; (v) 3070-3103 из SEQ ID NO: 3 или (vi) 3431-3461 из SEQ ID NO: 3.

**[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 пределах транскрипта *STAT6*. В некоторых аспектах, АСО содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91-193, с одним или двумя ошибками спаривания нуклеотидов. В некоторых аспектах, АСО имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкции на ФИГ. 1 заглавная буква обозначает нуклеозид с модифицированным сахаром, а строчная буква обозначает ДНК. В некоторых аспектах, длина АСО 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 фосфоротиоатную связь. В некоторых аспектах, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы. В некоторых аспектах, каждая из межнуклеозидных связей в АСО представляет собой фосфоротиоатную связь.

**[0016]** В некоторых аспектах, внеклеточная везикула дополнительно содержит якорный фрагмент. В некоторых аспектах, АСО связан с якорным фрагментом. В некоторых аспектах, внеклеточная везикула 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 анкириновым повтором (*darpin*), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжьей нанотела или любую их комбинацию.

**[0017]** В некоторых аспектах, экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, антитело с одним доменом, антитело, содержащее только тяжелую цепь (V<sub>H</sub>H), одноцепочечное антитело, антитело, содержащее только тяжелую цепь, полученное из акул (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 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, мочевой пузырь, поджелудочную железу, лимфатические узлы, селезенку, кровь, костный мозг или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на опухолевую клетку, дендритную клетку, Т-клетку, В-клетку, макрофаг, нейрон, гепатоцит, клетку Купфера, клетку миелоидной линии (*например*, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, гемопоэтические стволовые клетки, МКС (*например*, моноцитарные МКС или гранулоцитарные МКС)) или любую их комбинацию.

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

**[0021]** В некоторых аспектах, каркас X представляет собой каркасный белок, который способен закреплять АСО на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

**[0022]** В некоторых аспектах, каркас Y представляет собой каркасный белок, который способен закреплять АСО на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

**[0023]** В некоторых аспектах, АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ. В некоторых аспектах, АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ. В некоторых аспектах, якорный фрагмент включает стерин, GM1, липид, витамин, низкомолекулярное вещество, пептид или их комбинацию. В некоторых аспектах, якорный фрагмент включает холестерин. В некоторых аспектах, якорный фрагмент включает фосфолипид, лизофосфолипид, жирную кислоту, витамин (*например*, витамин D и/или витамин E) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом посредством линкера.

**[0024]** В некоторых аспектах, АСО связан с ВВ посредством линкера. В некоторых

аспектах, линкер представляет собой полипептид. В некоторых аспектах, линкер представляет собой неполипептидный фрагмент. В некоторых аспектах, линкер включает этиленгликоль. В некоторых аспектах, линкер включает ГЭГ, ТЭГ, ПЭГ или любую их комбинацию.

**[0025]** В некоторых аспектах, линкер включает акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (NHS-эфир), дигоксигенин (NHS-эфир), холестерин-ТЭГ, I-LINKER™, модификатор аминогруппы (например, аминомодификатор С6, аминомодификатор С12, аминомодификатор С6 dT или аминомодификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-ТЭГ, двойной биотин, РС-биотин или дестиобиотин), тиольную модификацию (тиоловый модификатор С3 S-S, дитиоловый или тиоловый модификатор С6 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-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

**[0026]** В некоторых аспектах, ВВ представляет собой экзосому.

**[0027]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен антисмысловой олигонуклеотид (АСО), содержащий непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6* (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах АСО не является TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 89). В некоторых аспектах, АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2056 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, нуклеотидов 2059-3963 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6*. В некоторых аспектах, АСО способен снижать экспрессию белка STAT6 в клетке человека (например, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок STAT6. А В некоторых аспектах, экспрессия белка STAT6 снижена по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по

меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или примерно на 100% по сравнению с экспрессией белка STAT6 в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО. В некоторых аспектах, АСО способен снижать уровень мРНК *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *STAT6*. В некоторых аспектах, уровень мРНК *STAT6* снижен по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или примерно на 100% по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.

**[0028]** В некоторых аспектах, АСО представляет собой гэпмер, миксмер или тоталмер. В некоторых аспектах, АСО содержит один или более нуклеозидных аналогов. В некоторых аспектах, один или более из нуклеозидных аналогов 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 (АНК); 2'-фтор-АНК или бициклический нуклеозидный аналог (ЗНК). В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром. В некоторых аспектах, нуклеозид с модифицированным сахаром, представляет собой увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром. В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов включают нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах, один или более нуклеозидных аналогов включают ЗНК. В некоторых аспектах, ЗНК выбрана из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ),  $\alpha$ -L-ЗНК,  $\beta$ -D-ЗНК, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-ЗНК, окси-ЗНК, тио-ЗНК и любой их комбинации. В некоторых аспектах, АСО содержит одно или более нуклеотидных оснований 5'-метил-цитозина.

**[0029]** В некоторых аспектах, АСО содержит любую из последовательностей от SEQ ID NO: 91 до SEQ ID NO: 193. В некоторых аспектах, АСО имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкции на ФИГ. 1 заглавная буква обозначает нуклеозид с модифицированным сахаром, а строчная буква обозначает ДНК. В некоторых аспектах, длина АСО 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 фосфоротиоатную связь. В некоторых аспектах, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы. В некоторых аспектах, каждая из межнуклеозидных связей в АСО представляет собой фосфоротиоатную связь.

**[0031]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен конъюгат, содержащий АСО, описанный в настоящем документе, ковалентно присоединенный по меньшей мере к одному нуклеотидному или неполинуклеотидному фрагменту. В некоторых аспектах, нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент включает белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

**[0032]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена внеклеточная везикула, содержащая АСО, описанный в настоящем документе, или конъюгат, описанный в настоящем документе.

**[0033]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу, описанную в настоящем документе, АСО, описанный в настоящем документе, или конъюгат, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.

**[0034]** В некоторых аспектах, фармацевтически приемлемая соль включает натриевую соль, калиевую соль, аммониевую соль или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

**[0035]** В некоторых аспектах, дополнительным терапевтическим агентом является антагонист STAT6. В некоторых аспектах, антагонист STAT6 представляет собой химическое соединение, миРНК, кшРНК, антисмысловый олигонуклеотид, белок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, антагонист STAT6 представляет собой антитело против STAT6 или его фрагмент. В некоторых аспектах, антагонист STAT6 включает антисмысловый олигонуклеотид (АСО).

**[0036]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен набор, содержащий описанную в настоящем документе внеклеточную везикулу, описанный в настоящем документе АСО, описанный в настоящем документе конъюгат или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и инструкции по применению.

**[0037]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен диагностический набор, содержащий описанную в настоящем документе внеклеточную везикулу, описанный

в настоящем документе АСО, описанный в настоящем документе конъюгат или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и инструкции по применению.

**[0038]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ ингибирования или снижения экспрессии белка STAT6 в клетке, включающий введение внеклеточной везикулы, описанной в данном документе, АСО, описанного в данном документе, конъюгата, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, в клетку, экспрессирующую белок STAT6, где экспрессия белка STAT6 в клетке ингибируется или снижается после введения.

**[0039]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы, описанной в настоящем документе, АСО, описанного в настоящем документе, конъюгата, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

**[0040]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено применение внеклеточной везикулы, описанной в настоящем документе, АСО, описанного в настоящем документе, конъюгата, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

**[0041]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы, описанной в настоящем документе, АСО, описанного в настоящем документе, конъюгата, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, где заболевание или расстройство выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, метаболического расстройства/CVD и любой их комбинации.

**[0042]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено применение описанной в настоящем документе внеклеточной везикулы, описанного в настоящем документе АСО, описанного в настоящем документе конъюгата или описанной в настоящем документе фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание или расстройство выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, метаболического расстройства/CVD и любой их комбинации.

**[0043]** В некоторых аспектах, АСО ингибирует или снижает экспрессию мРНК *STAT6* в клетке после введения. В некоторых аспектах, уровень мРНК *STAT6* снижается по

меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или на около 100% после введения по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке, не подвергавшейся воздействию АСО. В некоторых аспектах, экспрессия белка *STAT6* снижается по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% после введения по сравнению с экспрессией белка *STAT6* в клетке, не подвергавшейся воздействию АСО.

**[0044]** В некоторых аспектах, внеклеточную везикулу, АСО, конъюгат или фармацевтическую композицию вводят интракардиально, перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, пульморально, локально или внутрижелудочно.

**[0045]** В некоторых аспектах, рак выбран из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака простаты, плоскоклеточного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, лимфомы, лейкемии, рака печени, глиобластомы, меланомы, миеломы, базальноклеточного рака, аденокарциномы, рака потовых желез, рака сальных желез, папиллярного рака, папиллярных аденокарцином, цистаденокарциномы, медуллярного рака, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, рака желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбрионального рака, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака яичка, рака легкого, мелкоклеточного рака легких, рака мочевого пузыря, эпителиального рака, глиомы, глиобластомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы Ходжкина, В-клеточной лимфомы, аденокарциномы толстой кишки, аденокарциномы прямой кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, серозной цистаденокарциномы яичников, острого миелидного лейкоза, герминогенных опухолей яичек, аденокарциномы легких, глиомы головного мозга низшего класса, глиобластомы, увеальной меланомы, карциномы щитовидной железы, карциномы

эндометрия тела матки, карциносаркомы матки, феохромоцитомы, параганглиомы, а также любой их комбинации.

**[0046]** В некоторых аспектах, заболевание или расстройство включает фиброз. В некоторых аспектах, заболевание или расстройство включает фиброз, выбранный из группы, состоящей из фиброза печени (NASH), цирроза, легочного фиброза, муковисцидоза, хронического язвенного колита/IBD, фиброза мочевого пузыря, фиброза почек, CAPS (синдрома Макла-Уэллса), фиброза предсердий, эндомикардиального фиброза, перенесённого инфаркта миокарда, глиального рубца, артериальной ригидности, артрофиброза, болезни Крона, контрактуры Дюпюитрена, келоидного фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, болезни Пейрони, нефрогенного системного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, ретроперитонеального фиброза, склеродермии/системного склероза, адгезивного капсулита, а также любой их комбинации.

**[0047]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ активации менингеальных макрофагов, лечения рака центральной нервной системы, индуцирования М1-поляризации менингеальных макрофагов и/или индуцирования инфильтрации опухоли менингеальными макрофагами у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение внеклеточной везикулы, описанной в настоящем документе, АСО, описанного в настоящем документе, конъюгата, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0048]** На ФИГ. 1 приведена таблица, в которой перечислены различные последовательности АСО, нацеленные на транскрипт *STAT6*. Таблицы включают следующую информацию (слева направо): (i) описание АСО, (ii) последовательность АСО без определенной конструкции или химической структуры, (iii) SEQ ID номер, присвоенный только последовательности АСО, (iv) длина АСО, (v) последовательность АСО с химической структурой, и (vi) целевые начальное и конечное положения на целевой последовательности транскрипта (SEQ ID NO: 3). АСО расположены от 5' к 3'. Символы в химических структурах следующие: «Nb» означает ЗНК; «dN» означает ДНК; «5MdC» означает 5-Метил-dC; «Nm» означает МОЕ; и «s» означает фосфоротиоат.

**[0049]** На ФИГ. 2А показано схематическое изображение экзосомы, сверхэкспрессирующей PTGFRN, нагруженной АСО, которые нацелены на STAT6. На ФИГ. 2В-2Е показаны графические представления уровней Су5, определенных с помощью флуоресценции (MFI) и нормализованных к ФСБ-контролю. Су5 используют в качестве маркера поглощения экзосом, содержащих АСО («экзоАСО»; слева), или свободных АСО

(справа), как указано, в различных типах клеток, выделенных из крови (ФИГ. 2В), печени (ФИГ. 2С), селезенки (ФИГ. 2D) и опухоли (СТ26; ФИГ. 2Е-2F). Горизонтальные линии показывают среднее значение MFI. На ФИГ. 2G-2L показаны флуоресцентные изображения образцов ткани костного мозга, взятых у двух мышей, демонстрирующие поглощение экзосом, содержащих АСО (ФИГ. 2G-2H), или свободных АСО (ФИГ. 2I-2J), по сравнению с отрицательным контролем ФСБ (ФИГ. 2K-2L). На ФИГ. 2M показано графическое представление результатов проточной цитометрии для количественной оценки количества меченных Су5 опухолевых клеток и макрофагов после интратуморального введения флуоресцентно меченного экзоАСО. На ФИГ. 2N показано графическое представление результатов проточной цитометрии для количественной оценки количества меченных Су5 миелоидных клеток-супрессоров, макрофагов и дендритных клеток после внутриопухолевого введения флуоресцентно меченного экзоАСО. MDSC = миелоидные супрессорные клетки; mMDSC = моноцитарные MDSC; gMDSC = гранулоцитарные MDSC; cDC1 = обычные дендритные клетки типа 1; cDC2 = обычные дендритные клетки типа 2. На ФИГ. 2O показано графическое представление поглощения меченного АСО Су5, либо свободного, либо нагруженного на экзосомы (экзоАСО) в первичных макрофагах человека M2 или M0. На ФИГ. 2P показано графическое представление уровня экспрессии когнатных рецепторов RTGFRN в глиобластоме (GBM) в различных типах клеток с пятью мишенями.

**[0050]** На ФИГ. 3А и 3В показаны графические представления нормализованной экспрессии гена (%) *STAT6* (ФИГ. 3А) и *CD163* (ФИГ. 3В) в поляризованных макрофагах после обработки STAT6-экзоАСО, STAT6-свободным АСО или скремблированным экзоАСО (отрицательный контроль), как указано (ФИГ. 3А-3В).

**[0051]** На ФИГ. 4А-4N показаны графические изображения экспрессии *TGFβ1* (ФИГ. 4А), *CD163* (ФИГ. 4В), *STAT5b* (ФИГ. 4С), *STAT6* (ФИГ. 4D), *CEBPβ* (ФИГ. 4Е), *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) и *TARC/CCL17* (ФИГ. 4N) в необработанных первичных макрофагах человека или в первичных макрофагах человека, обработанных скремблированным экзоАСО, STAT6-экзоАСО или STAT6-свободным АСО, как указано. \*\*\* =  $p < 0,001$ ; и \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

**[0052]** На ФИГ. 5А-5F показаны графические представления результатов проточной цитометрии для выделения *CD11b<sup>+</sup>* клеток. На ФИГ. 5А-5С показана экспрессия *CD45* до обработки (ФИГ. 5А), после обработки отрицательным контролем (скремблированным экзоАСО; ФИГ. 5В), или после обработки экзоАСО (ФИГ. 5С). На ФИГ. 5D-5F показана экспрессия *CD11b* до обработки (ФИГ. 5D), после обработки отрицательным контролем

(скремблированным экзоАСО; ФИГ. 5Е), или после обработки экзоАСО (ФИГ. 5F). На ФИГ. 5G показано графическое представление объема опухоли у мышей после обработки отрицательным контролем (скремблированным экзоАСО) или после обработки экзоАСО.

**[0053]** На ФИГ. 6А и 6В показаны графические представления экспрессии *STAT6* (ФИГ. 6А) и *ARG1* (ФИГ. 6В) в CD11b-обогащенных клетках по сравнению с небогащенными клетками после воздействия скремблированного экзоАСО, STAT6-свободного АСО или STAT6-экзоАСО (ФИГ. 6А и 6В, как указано).

**[0054]** На ФИГ. 7А-7V показаны графические представления экспрессии *STAT6* (ФИГ. 7А), *CEBP $\beta$*  (ФИГ. 7В), *TGF $\beta$ 1* (ФИГ. 7С), *STAT3* (ФИГ. 7D), *SIRP- $\alpha$*  (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), *IFN $\beta$ 1* (ФИГ. 7S), *IFN $\gamma$*  (ФИГ. 7T), *IFN $\alpha$ 1* (ФИГ. 7U) и *IL6R $\alpha$*  (ФИГ. 7V) в клетках, обогащенных CD11b, обработанных скремблированным экзоАСО, STAT6-экзоАСО или STAT6-свободного АСО, как указано.

**[0055]** На ФИГ. 8А и 8В показаны графические представления нормализованной экспрессии гена (%) *STAT6* (ФИГ. 8А) и *TGF $\beta$ 1* (ФИГ. 8В) в первичных макрофагах человека M2, которые были поляризованы с помощью IL-13/TGF $\beta$ , а затем обработаны STAT6-экзоАСО, STAT6-свободным АСО или скремблированным экзоАСО (отрицательный контроль), как указано.

**[0056]** На ФИГ. 9 показано графическое изображение поглощения экзосом, о чем свидетельствует уровень Cy5, в легком TD2 после назального введения отрицательного контроля (-С) или экзоАСО-Cy5 («IN») наивным мышам или мышам, которых лечили блеомицином, чтобы вызвать фиброз легких («блео»).

**[0057]** На ФИГ. 10А-10Н показаны изображения флуоресцентной гибридизации *in situ* для выявления поглощения экзосом нормальной и индуцированной фиброзной тканью легких.

**[0058]** На ФИГ. 11А-11Н показаны изображения гибридизации *in situ* для выявления поглощения экзосом нормальной и индуцированной фиброзной тканью легких. На ФИГ. 11I показано графическое представление, показывающее уровень насыщенности изображений гибридизации *in situ*, указывающий на уровень поглощения экзосом в нормальной и фиброзной ткани.

**[0059]** На ФИГ. 12А и 12В показаны изображения флуоресцентной гибридизации *in situ* для выявления поглощения экзосом легочной тканью мышей Heral-6.

**[0060]** На ФИГ. 13А-13F показаны изображения гибридизации *in situ* для выявления поглощения экзосом легочной тканью мышей Heral-6.

**[0061]** На ФИГ. 14А и 14В показано, что STAT6-экзоАСО реполяризует макрофаги M2 и обладает противоопухолевой активностью. На ФИГ. 14А показана временная шкала введения STAT6-экзоАСО. На ФИГ. 14В показано, что введение STAT6-экзоАСО снижает экспрессию генов M2 и повышает экспрессию генов M1.

**[0062]** На ФИГ. 15 показано, что монотерапия STAT6-экзоАСО приводит к 50% полному ответу и 80% торможению роста опухоли. STAT6-свободный АСО не оказывал никакого влияния на рост опухоли. Антитело анти-CSF1R (терапия, истощающая макрофаги) не вызвало никакой противоопухолевой эффективности.

**[0063]** На ФИГ. 16А показано снижение мРНК STAT6 под действием контрольного АСО, STAT-свободного АСО и STAT6-экзоАСО.

**[0064]** На ФИГ. 16В показано снижение маркеров M2, т.е. CSF1R, под действием контрольного АСО, STAT6-свободного АСО и STAT6-экзоАСО.

**[0065]** На ФИГ. 17А-17Н показана противоопухолевая активность STAT6-экзоАСО по сравнению со STAT6-свободным АСО, антителами анти-PD1 или антителами анти-CSF1R. На ФИГ. 17А показан график введения STAT6-экзоАСО, STAT-свободного АСО, антитела анти-PD1 и антитела анти-CSF1R. На ФИГ. 17В показан средний рост опухоли у мышей, получавших либо STAT6-экзоАСО, либо STAT6-свободный АСО, антитело анти-PD1 или антитело анти-CSF1R. На ФИГ. 17С-17Н показан рост отдельных опухолей у мышей, получавших STAT6-экзоАСО (ФИГ. 17G), STAT6-свободный АСО (ФИГ. 17H), контроль ФСБ (ФИГ. 17C), антитело анти-PD1 (ФИГ. 17D), антитело анти-CSF1R (ФИГ. 17E), или отрицательный контроль скремблированный экзоАСО (ФИГ. 17F). CR = количество мышей с полным ответом.

**[0066]** На ФИГ. 18А-18D показаны схематические изображения примерных конструкций слияния CD47-каркас X, которые могут экспрессироваться на описанных в данных документах внеклеточных везикулах, вместе с АСО, нацеленным на транскрипт *STAT6*. На ФИГ. 18А показаны конструкции, содержащие внеклеточный домен CD47 дикого типа (с заменой C15S), слитый с FLAG-меченным (1083 и 1084) или неFLAG-меченным (1085 и 1086) полноразмерным каркасом X (1083 и 1086) или усеченным каркасом X (1084 и 1085). На ФИГ. 18В показаны конструкции, содержащие внеклеточный домен Velcro-CD47, слитый с FLAG-меченным (1087 и 1088) или неFLAG-меченным (1089 и 1090) полноразмерным каркасом X (1087 и 1090) или усеченным каркасом X (1088 и 1089). На ФИГ. 18С 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. 18D показаны различные конструкции, содержащие

минимальный «аутологичный» пептид (GNYTCEVTELTREGETIIEELK; SEQ ID NO: 628), слитых с FLAG-меченным (1158 и 1159) или неFLAG-меченным (1160 и 1161) полноразмерным каркасом X (1158 и 1161) или усеченным каркасом X (1159 и 1160).

**[0067]** На ФИГ. 19 показана экспрессия примерных конструкций слияния CD47-каркас X мыши, которые могут экспрессироваться на поверхности модифицированных экзосом, вместе с АСО, нацеленным на транскрипт *STAT6*. Конструкции содержат внеклеточный домен мышинового CD47 дикого типа (с заменой C15S), слитый с FLAG-меченным (1923 и 1925) или неFLAG-меченным (1924 и 1922) полноразмерным каркасом X (1923 и 1922) или усеченным каркасом X (1925 и 1924).

**[0068]** На ФИГ. 20А показана схема примерной внеклеточной везикулы (например, экзосомы), нацеленной на Trks, с использованием конструкции слияния нейротрофин-каркас X, которая может экспрессироваться вместе с АСО, нацеленным на транскрипт *STAT6*. Нейротрофины связываются с рецепторами Trk в виде гомодимера и позволяют ВВ нацеливаться на сенсорный нейрон.

**[0069]** На ФИГ. 20В показана схематичная диаграмма примерной 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) АСО, нацеленным на транскрипт *STAT6*.

**[0070]** На ФИГ. 21А-21F показаны графические изображения дозозависимого нокдауна мРНК *STAT6* человека, нормализованного по отношению к конститутивным генам, в макрофагах человека после введения возрастающих доз экзо-*STAT6*-АСО через 24 часа (ФИГ. 21А), 48 часов (ФИГ. 21В), 72 часа (ФИГ. 21С), 120 часов (ФИГ. 21D) и 168 часов (ФИГ. 21Е) после введения (ФИГ. 21F). На ФИГ. 21G показано графическое представление продолжительности действия дозы IC50 в макрофагах человека после обработки экзо-*STAT6*-АСО или *STAT6*-свободным АСО у двух доноров с течением времени.

**[0071]** На ФИГ. 22А-22В показаны графические представления, иллюстрирующие снижение уровня мРНК *STAT6* в макрофагах человека от первого донора (ФИГ. 22А) и второго донора (ФИГ. 22В) через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 120 часов и 168 часов после введения 0,15 мкМ, 0,312 мкМ, 0,624 мкМ, 1,25 мкМ или 2,5 мкМ экзо-*STAT6*-АСО.

**[0072]** На ФИГ. 23А показано графическое изображение снижения уровня белка Stat6 в необработанных образцах доноров или образцах доноров через 96 часов после введения возрастающих доз экзо-*STAT6*-АСО, *STAT6*-свободного АСО или скремблированного экзо-АСО. На ФИГ. 23В показан график рассеяния, иллюстрирующий продолжительность снижения уровня белка Stat6 через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 120 часов

и 168 часов после введения экзо-STAT6-АСО, STAT6-свободного АСО или скремблированного экзо-АСО.

**[0073]** На ФИГ. 24А-24L представлены изображения иммуногистохимии, показывающие экспрессию TNF $\alpha$  (ФИГ. 23А-23С), CD11b (ФИГ. 23D-23F), iNOS (ФИГ. 23G-23H), и F4/80 (ФИГ. 23J-23L), после интратуморального введения (с помощью CIVO®) скремблированного экзоАСО (ФИГ. 23А, 23D, 23G и 23J); STAT6-свободного АСО (ФИГ. 23В, 23Е, 23H и 23К) или экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 23С, 23F, 23I и 23L). Закрашенные стрелки обозначают окрашивание FTM. Незакрашенные треугольники обозначают окрашивание TNF $\alpha$  (ФИГ. 23А-23С), CD11b (ФИГ. 23D-23F), iNOS (ФИГ. 23G-23H), и F4/80 (ФИГ. 23J-23L).

**[0074]** На ФИГ. 25А-25D показаны графические представления, показывающие начальный размер опухоли (ФИГ. 25А) и объем опухоли (ФИГ. 25В), размер опухоли (ФИГ. 25С) и вес опухоли (ФИГ. 25D) в мышинной модели рака простаты на 22 день после внутрибрюшинного введения ФСБ, скремблированного экзоАСО («Скр»), STAT6-экзоАСО или гемцитабина («Гем»).

**[0075]** На ФИГ. 26А-26D показан ответ выживаемости в мышинной модели рака предстательной железы после введения ФСБ, скремблированного экзоАСО («Скр»; ФИГ. 26В), экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 26В-26D, гемцитабина («Гем»; ФИГ. 26В-26С), или ФСБ (ФИГ. 26В и 26D), как указано, в соответствии с временной шкалой, представленной на ФИГ. 26А.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0076]** Некоторые аспекты настоящего изобретения направлены на внеклеточную везикулу (ВВ), *например*, экзосому, содержащую антисмысловый олигонуклеотид (АСО), где АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипт *STAT6*. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы, описанные в настоящем документе, нагружены одним или более АСО, которые нацелены на целевые макрофаги и снижают уровень экспрессии STAT6 в них. Не будучи связанным каким-либо конкретным механизмом или теорией, снижение уровня STAT6 в макрофагах М2 способствует реполяризации макрофагов М2 к фенотипу макрофагов М1. Путем реполяризации макрофагов до иммуностимулирующего фенотипа М1, ВВ, описанные в настоящем документе, способствуют притоку Т-клеток и иммунных эффекторных клеток для контроля роста опухоли.

## I. Определения

**[0077]** Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

**[0078]** 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.

**[0079]** 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).

**[0080]** 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».

**[0081]** 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.

**[0082]** 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 амино-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.

**[0083]** В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения около, примерно, около или в области. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «около» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значение с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже). Например, если указано, что «АСО снижает экспрессию белка STAT6 в клетке после введения АСО по меньшей мере на около 60%», подразумевается, что уровень STAT6 снижается в диапазоне от 50% до 70%.

**[0084]** Термин «антисмысловой олигонуклеотид» (АСО) относится к олигомеру или полимеру нуклеозидов, таких как природные нуклеозиды или их модифицированные формы, которые ковалентно связаны друг с другом посредством межнуклеотидных связей. АСО, применимый для изобретения, включает по меньшей мере один нуклеозид неприродного происхождения. АСО по меньшей мере частично комплементарен целевой нуклеиновой кислоте, так что АСО гибридизуется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты.

**[0085]** Термин «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» предназначен для охвата множества 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 термин относится к нуклеиновым кислотам или нуклеотидам в целевой последовательности, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть встречающимися в природе последовательностями в клетке. В других аспектах «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относятся к последовательности в АСО по изобретению. Когда термин относится к последовательности в АСО, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть неприродного происхождения, *т.е.* химически синтезированными, ферментативно полученными, рекомбинантно полученными или любой их комбинацией. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в АСО получены синтетически или рекомбинантно, но не являются встречающейся в природе последовательностью или ее фрагментом. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в АСО не встречаются в природе, поскольку они содержат по меньшей мере один аналог нуклеозида, который не встречается в природе.

**[0086]** Термин «нуклеотид» как используется в настоящем документе, относится к гликозиду, содержащему сахарный фрагмент, фрагмент основания и ковалентно связанную группу (группу сцепления), такую как фосфатная или фосфоротиоатная межнуклеотидная группа сцепления, и охватывает оба встречающихся в природе нуклеотида, таких как ДНК

или РНК, и не встречающиеся в природе нуклеотиды, содержащие модифицированные фрагменты сахара и/или основания, которые также упоминаются в данном документе как «нуклеотидные аналоги». В данном случае один нуклеотид может быть назван мономером или единицей. В определенных аспектах термин «нуклеотидные аналоги» относится к нуклеотидам с модифицированными сахарными фрагментами. Неограничивающие примеры нуклеотидов с модифицированными сахарными фрагментами (*например*, ЗНК) описаны в настоящем документе. В других аспектах термин «нуклеотидные аналоги» относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные фрагменты нуклеотидных оснований. Нуклеотиды с модифицированными фрагментами нуклеотидных оснований включают, помимо прочего, 5-метил-цитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропинилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин. В некоторых аспектах термины «нуклеотид», «единица» и «мономер» используются взаимозаменяемо. Следует понимать, что при ссылке на последовательность нуклеотидов или мономеров имеется в виду последовательность оснований, таких как А, Т, G, С или U, и их аналоги.

**[0087]** Термин «нуклеозид» в настоящем документе используется для обозначения гликозида, содержащего сахарный фрагмент и фрагмент основания, и поэтому может использоваться при обозначении нуклеотидных единиц, которые ковалентно связаны межнуклеотидными связями между нуклеотидами АСО. В области биотехнологии термин «нуклеотид» часто используется для обозначения мономера или единицы нуклеиновой кислоты. В контексте АСО термин «нуклеотид» может относиться только к основанию, *т.е.* к последовательности нуклеотидного основания, содержащего цитозин (ДНК и РНК), гуанин (ДНК и РНК), аденин (ДНК и РНК), тимин (ДНК) и урацил (РНК), в котором подразумевается наличие сахарного остова и межнуклеотидных связей. Аналогично, особенно в случае олигонуклеотидов, в которых одна или более межнуклеотидных групп сцепления модифицированы, термин «нуклеотид» может относиться к «нуклеозиду». Например, термин «нуклеотид» можно использовать даже при указании наличия или природы связей между нуклеозидами.

**[0088]** Термин «длина нуклеотида» в данном случае означает общее количество нуклеотидов (мономеров) в данной последовательности. Например, последовательность АСО-STAT6-1053 (SEQ ID NO: 91) содержит 15 нуклеотидов; таким образом, длина нуклеотидной последовательности равна 15. Поэтому, термин «длина нуклеотида» в данном документе используется взаимозаменяемо с «количеством нуклеотидов».

**[0089]** Как известно специалистам в данной области, 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида не содержит 5'-межнуклеотидную группу сцепления, хотя он может

содержать 5'-концевую группу.

**[0090]** Описанные в данном документе соединения могут содержать несколько асимметрических центров и могут присутствовать в виде оптически чистых энантиомеров, смесей энантиомеров, таких как, например, рацематы, смеси диастереоизомеров, диастереоизомерные рацематы или смеси диастереоизомерных рацематов. В некоторых аспектах асимметрический центр может быть асимметрическим атомом углерода. Термин «асимметричный атом углерода» обозначает атом углерода с четырьмя различными заместителями. Согласно Конвенции Кана-Ингольда-Прелога, асимметричный атом углерода может иметь конфигурацию «R» или «S».

**[0091]** Как используется в настоящем документе, термин «бициклический сахар» обозначает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий 4-7-членное кольцо, содержащее мостик, соединяющий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, в результате чего образуется бициклическая структура. В некоторых аспектах мостик соединяет C2'- и C4'-рибозу сахарного кольца нуклеозида (*m.e.* 2'-4' мостик), как это наблюдается в нуклеозидах ЗНК.

**[0092]** Как используется в настоящем документе, «кодирующая область» или «кодирующая последовательность» это часть полинуклеотида, состоящая из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA или TAA), как правило, не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области («UTR») и тому подобное, не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконцевую часть образующегося полипептида, и стоп-кодом трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильную часть образующегося полипептида.

**[0093]** Термин «некодирующая область» как используется в настоящем документе, означает нуклеотидную последовательность, которая не является кодирующей областью. Примеры некодирующих областей включают, помимо прочего, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области («UTR»), некодирующие экзоны и тому подобное. Некоторые экзоны могут полностью или частично входить в 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) или 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) каждого транскрипта. Нетранслируемые области важны для эффективной трансляции транскрипта и для контроля скорости трансляции и периода полужизни транскрипта.

**[0094]** Термин «область» при использовании в контексте нуклеотидной

последовательности относится к участку этой последовательности. Например, фраза «область в пределах нуклеотидной последовательности» или «область в пределах комплемента нуклеотидной последовательности» относится к последовательности короче, чем нуклеотидная последовательность, но длиннее, чем по меньшей мере 10 нуклеотидов, расположенных в пределах конкретной нуклеотидной последовательности или комплементарной ей последовательности нуклеотидов, соответственно. Термин «подпоследовательность» или «подпоследовательность» может также относиться к области нуклеотидной последовательности.

**[0095]** Термин «ниже по рамке считывания» при ссылке на нуклеотидную последовательность означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположена 3' к эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах нуклеотидные последовательности, расположенные ниже по рамке считывания, относятся к последовательностям, которые следуют за сайта начала транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже по рамке считывания от сайта начала транскрипции.

**[0096]** Термин «выше по рамке считывания» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной 5' от эталонной нуклеотидной последовательности.

**[0097]** Как используется в настоящем документе, термин «регуляторная область» относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше по рамке считывания (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже по рамке считывания (3'-некодирующие последовательности) кодирующей области и влияющим 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 типа «петля-стебель». Если а область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут расположены в положении 3' от кодирующей последовательности.

**[0098]** Термин «транскрипт», как используется в настоящем документе, может относиться к первичному транскрипту, который синтезируется при транскрипции ДНК и превращается в матричную РНК (мРНК) после обработки, *т.е.* к предшественнику матричной РНК (пре-мРНК), и к самой обработанной мРНК. Термин «транскрипт» может использоваться взаимозаменяемо с «пре-мРНК» и «мРНК». После транскрипции цепей ДНК в первичные транскрипты, вновь синтезированные первичные транскрипты

модифицируются несколькими способами для преобразования в их зрелые, функциональные формы для получения различных белков и РНК, таких как мРНК, тРНК, рРНК, днкРНК, микроРНК и другие. Таким образом, термин «транскрипт» может включать экзоны, интроны, 5'-UTR и 3'-UTR.

**[0099]** Термин «экспрессия» как используется в настоящем документе, относится к процессу, в результате которого полинуклеотид производит генный продукт, например, РНК или полипептид. Она включает, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. В результате экспрессии образуется «генный продукт». Как используется в настоящем документе, генный продукт может быть либо нуклеиновой кислотой, *например*, матричной РНК, полученной путем транскрипции гена, либо полипептидом, транслированным из транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящем документе, также включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, *например*, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, *например*, метилированием, гликозилированием, присоединением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

**[0100]** 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 известны в данной области техники, которые могут быть использованы для получения выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей.

**[0101]** Одним из таких неограничивающих примеров алгоритма выравнивания последовательностей является алгоритм, описанный в Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, измененный 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, 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 программном пакете GCG (например, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа, равного 40, 50, 60, 70 или 90, и штрафа за продолжение гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых альтернативных аспектах осуществления программа GAP в программный пакет 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, равного 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продолжение гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, в некоторых аспектах осуществления процент идентичности между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Например, процент идентичности может быть определен с помощью программы ALIGN (версия 2.0) и с использованием PAM120 с таблицей остатков, штрафом за удлинение гэпа, равного 12, и штрафом за гэп, равного 4. Специалист в данной области может определить соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретного программного обеспечения для выравнивания. В некоторых аспектах используются параметры по умолчанию программного обеспечения для выравнивания.

**[0102]** В некоторых аспектах процентная идентичность «X» первой нуклеотидной последовательности ко второй нуклеотидной последовательности 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.

**[0103]** Каждая из различных областей в пределах одной целевой полинуклеотидной последовательности, совпадающая с эталонной последовательностью полинуклеотида, может иметь собственный процент идентичности последовательности. 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.

**[0104]** Как используется в настоящем документе, термины «гомологичный» и «гомология» взаимозаменяемы с терминами «идентичность» и «идентичны».

**[0105]** Термин «его встречающийся в природе вариант» относится к вариантам последовательности полипептида STAT6 или последовательности нуклеиновой кислоты STAT6 (*например*, транскрипта), которые существуют в природе в пределах определенной таксономической группы, например, млекопитающих, таких как мышь, обезьяна и человек. Как правило, при упоминании «встречающихся в природе вариантов» полинуклеотида термин также может охватывать любой аллельный вариант STAT6-кодирующей геномной ДНК, которая находится в хромосомном положении 1q44 на 247416156-247449108 (*т.е.* нуклеотиды 247416156-247449108 GenBank, номер доступа № NC\_000001.11) путем хромосомной транслокации или дупликации, и РНК, например, мРНК, полученная из них. «Встречающийся в природе варианты» могут также включать варианты, полученные в результате альтернативного сплайсинга мРНК STAT6. При ссылке на конкретную полипептидную последовательность, *например*, термин также включает встречающиеся в природе формы белка, которые могут быть процессированны, *например*, путем ко- или посттрансляционных модификаций, таких как расщепление сигнального пептида, протеолитическое расщепление, гликозилирование и *т.д.*

**[0106]** При определении степени «комплементарности» между АСО по изобретению (или их областями) и целевой областью нуклеиновой кислоты, которая кодирует STAT6 млекопитающего (*например*, ген STAT6), такой как описанные в настоящем документе, степень «комплементарности» (также «гомология» или «идентичность») выражается как процентная идентичность (или процентная гомология) между последовательностью АСО (или ее областью) и последовательностью целевой области (или обратным комплементом целевой области), которая наилучшим образом соответствует ей. Процент рассчитывается путем подсчета количества выровненных оснований, которые идентичны у двух последовательностей, деления на общее количество непрерывных мономеров в АСО и умножения на 100. При таком сравнении, если существуют гэпы, предпочтительно, чтобы такие гэпы были просто несоответствиями, а не областями, где количество мономеров в пределах гэпа отличается между АСО по изобретению и целевой областью.

**[0107]** Термин «комплемент» в настоящем документе означает последовательность, которая комплементарна эталонной последовательности. Хорошо известно, что комплементарность является базовым принципом репликации и транскрипции ДНК, поскольку это свойство разделяется между двумя последовательностями ДНК или РНК, так

что когда они выровнены антипараллельно друг другу, нуклеотидные основания в каждом положении последовательностей будут комплементарны, подобно тому, как если бы вы смотрели в зеркало и видели обратную сторону вещей. Поэтому, например, комплемент последовательности 5' ATGC 3' может быть записан как 3' TACG 5' или 5' GCAT 3'. Термины «обратный комплемент», «обратнокомплементарный» и «обратная комплементарность» используемые в настоящем документе, взаимозаменяемы с терминами «комплемент», «комплементарный» и «комплементарность». В некоторых аспектах термин «комплементарный» относится к 100% совпадению или комплементарности (*m.e.* полностью комплементарному) с непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты в транскрипте *STAT6*. В некоторых аспектах термин «комплементарный» 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% совпадения или комплементарности с непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты в транскрипте *STAT6*.

**[0108]** Термины «соответствующий» и «соответствует» при ссылке на две отдельные последовательности нуклеиновых кислот или нуклеотидов может использоваться для уточнения областей последовательностей, которые соответствуют или сходны друг с другом на основе гомологии и/или функциональности, хотя нуклеотиды конкретных последовательностей могут быть пронумерованы по-разному. Например, различные изоформы транскрипта гена могут иметь сходные или консервативные участки нуклеотидных последовательностей, нумерация которых может отличаться в соответствующих изоформах на основе альтернативного сплайсинга и/или других модификаций. Кроме того, признано, что при характеристике нуклеиновой кислоты или последовательности нуклеотидов (*например*, транскрипта гена и того, начинать ли нумерацию последовательности с кодона начала трансляции или включать 5'UTR) могут применяться различные системы нумерации. Кроме того, известно, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность различных вариантов гена или транскрипта гена может варьироваться. Однако, как используется в настоящем документе, области вариантов, которые имеют общую гомологию нуклеиновой кислоты или последовательности нуклеотидов и/или функциональность, считаются «соответствующими» друг к другу. Например, нуклеотидная последовательность транскрипта *STAT6*, соответствующая нуклеотидам X-Y из SEQ ID NO: 1 («эталонная последовательность»), относится к последовательности транскрипта *STAT6* (например, пре-

мРНК или мРНК *STAT6*), которая имеет идентичную последовательность или сходную последовательность с нуклеотидами X-Y из SEQ ID NO: 1, где X - начальный участок, а Y - конечный участок (как показано на ФИГ. 1). Специалист в данной области может определить соответствующие остатки X и Y в последовательности транскрипта *STAT6* путем выравнивания последовательности транскрипта *STAT6* с SEQ ID NO: 1.

**[0109]** Термины «соответствующий нуклеотидный аналог» и «соответствующий нуклеотид» предназначены для указания того, что нуклеотидное основание в нуклеотидном аналоге и встречающийся в природе нуклеотид обладают одинаковой способностью к спариванию или гибридизации. Например, когда 2-дезоксирибозная единица нуклеотида связана с аденином, «соответствующий нуклеотидный аналог» содержит пентозную единицу (отличную от 2-дезоксирибозы), связанную с аденином.

**[0110]** Краткое описание химических свойств АСО выглядит следующим образом бета-D-окси нуклеотиды ЗНК обозначаются оксиО, где «О» обозначает нуклеотидное основание, такое как тимин (Т), уридин (U), цитозин (С), 5-метилцитозин (МС), аденин (А) или гуанин (G), и таким образом включает оксиА, оксиТ, оксиМС, оксиС и оксиG. Нуклеотиды ДНК обозначаются ДНКо, где строчная «о» обозначает нуклеотидное основание, такое как тимин (Т), уридин (U), цитозин (С), 5-метилцитозин (Мс), аденин (А) или гуанин (G), и таким образом включают ДНКа, ДНКт, ДНК и ДНКг. Буква «М» перед «С» или «с» означает 5-метилцитозин. Буква «s» указывает на фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.

**[0111]** Термин «номер АСО» или «№ АСО» как используется в настоящем документе, означает уникальный номер, присвоенный нуклеотидной последовательности, имеющей подробную химическую структуру компонентов, *например*, нуклеозидов (*например*, ДНК), нуклеозидных аналогов (*например*, бета-D-окси-ЗНК), нуклеотидного основания (*например*, А, Т, G, С, U или МС) и структуры основной цепи (*например*, фосфоротиоат или фосфородиэфир). Например, АСО-STAT6-1053 может относиться к STAT6-1053 (SEQ ID NO: 91).

**[0112]** «Активность» обычно выражается как значение IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub>, в мкМ, нМ или пМ, если не указано иное. Активность также может быть выражена в процентах ингибирования. IC<sub>50</sub> - средняя ингибирующая концентрация терапевтической молекулы. EC<sub>50</sub> - это средняя эффективная концентрация терапевтической молекулы по отношению к носителю или контролю (*например*, физраствору). В функциональных анализах IC<sub>50</sub> - это концентрация терапевтической молекулы, которая снижает биологический ответ, *например*, транскрипцию мРНК или экспрессию белка, на 50% от биологического ответа, который достигается терапевтической молекулой. В функциональных анализах EC<sub>50</sub> - это

концентрация терапевтической молекулы, которая вызывает 50% биологического ответа, *например*, транскрипцию мРНК или экспрессию белка.  $IC_{50}$  или  $EC_{50}$  могут быть рассчитаны любым способом, известным в данной области.

**[0113]** Как используется в настоящем документе, термин «ингибирование», *например*, экспрессия транскрипта гена *STAT6* и/или белка *STAT6* относится к АСО, снижающему экспрессию транскрипта гена *STAT6* и/или белка *STAT6* в клетке или ткани. В некоторых аспектах термин «ингибирование» относится к полному ингибированию (100% ингибирование или необнаруживаемый уровень) транскрипта гена *STAT6* или белка *STAT6*. 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% ингибированию транскрипта гена *STAT6* и/или экспрессии белка *STAT6* в клетке или ткани.

**[0114]** 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.

[0115] 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.

[0116] 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 содержат 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.

[0117] В контексте данного документа термин «сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы» (*например*, ВВ, сконструированные с помощью каркаса X, *например*, экзосомы), относится к ВВ, *например*, экзосоме, с мембраной или поверхностью ВВ, *например*, экзосомы, модифицированными по своему составу таким образом, что поверхность сконструированной ВВ, *например*, экзосомы, отличается от поверхности ВВ, *например*, экзосомы, до модификации или встречающейся в природе 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, в состав мембраны входит белок, липид, малая молекула, углевод 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.

**[0118]** 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 встречающейся в природе ВВ, *например*, экзосомы. Конструирование может происходить непосредственно в просвете или в мембране ВВ, *например*, экзосомы, так что просвет ВВ, *например*, экзосомы изменяется. Например, в состав мембраны входит белок, липид, малая молекула, углевод и *т. д.*, так что просвет ВВ, *например*, экзосомы изменяется. 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 ВВ, *например*, 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.

**[0119]** 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 встречающейся в природе 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*, АСО). 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).

**[0120]** В контексте данного документа термин «каркасный фрагмент» относится к молекуле, которую можно использовать для прикрепления полезной нагрузки или любого другого представляющего интерес соединения (*например* АСО) 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 раскрытия, включают аминопептидазу N (CD13); неприлизин, также называемый мембранная металлоэндопептидаза (MME); представителя 1 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP1); нейропиплин-1 (NRP1); CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадгерин (MFGE8), LAMP2 и LAMP2B.

**[0121]** 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 каркасных белков X включают: отрицательный регулятор рецептора простагландина F2 («белок PTGFRN»); базигин («белок BSG»); член суперсемейства иммуноглобулинов 2 («белок IGSF2»); член суперсемейства иммуноглобулинов 3 («белок IGSF3»); член суперсемейства иммуноглобулинов 8 («белок IGSF8»); интегрин бета-1 («белок ITGB1»); интегрин альфа-4 («белок ITGA4»); тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 («белок SLC3A2»); класс белков-переносчиков АТФ («белок ATP1A1», «белок ATP1A2», «белок ATP1A3», «белок ATP1A4», «белок ATP1B3», «белок ATP2B1», «белок ATP2B2», «белок ATP2B3», «белок ATP2B») и их функциональный фрагмент. В некоторых аспектах каркасный белок 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*, АСО) на внешней поверхности или поверхности просвета экзосомы.

**[0122]** 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, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающие примеры каркасных белков Y включают: миристоилированный, богатый аланином субстрат киназы C («белок MARCKS»); белок 1, подобный миристоилированному, богатому аланином субстрату киназы C («белок MARCKSL1»); и кислоторастворимый белок 1 головного мозга («белок BASP1»). В некоторых аспектах 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*, АСО) к поверхности просвета ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах каркас Y может прикреплять фрагмент (*например*, АСО) к внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы.

**[0123]** Используемый в данном документе термин «фрагмент» белка (*например*, терапевтического белка, каркаса X или каркаса Y) относится к аминокислотной последовательности белка, которая короче встречающейся в природе последовательности, с удалением на N- и/или C-конце или с удалением любой части белка по сравнению со встречающимся в природе белком. Используемый в данном документе термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту белка, который сохраняет функцию белка. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент каркаса 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 к поверхности просвета или на 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 встречающегося в природе 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 встречающегося в природе каркасного белка Y.

**[0124]** 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 из уровня техники. Например, вариант белка может содержать замену, вставку, делецию, сдвиг рамки или перестановку в другом белке.

**[0125]** В некоторых аспектах вариант каркаса 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 белка 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 белком PTGFRN согласно SEQ ID NO: 301 или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка BSG имеют по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по





меньшей мере около 99% идентичности последовательности с белком ATP2B2 согласно SEQ ID NO: 316 или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка ATP2B3 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 белком ATP2B3 согласно SEQ ID NO: 317 или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка ATP2B4 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 белком ATP2B4 согласно SEQ ID NO: 318 или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах вариант или вариант фрагмента каркасного белка X, раскрытого в данном документе, сохраняет способность специфически нацеливаться на ВВ, например, экзосомы. В аспектах каркаса X включает одну или более мутаций, например, консервативные аминокислотные замены.

**[0126]** В некоторых аспектах вариант каркаса Y включает вариант, имеющий по меньшей мере 70% идентичности с белками MARCKS, MARCKSL1, BASP1 или фрагментом белков MARCKS, MARCKSL1 или BASP1. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка MARCKS 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 белком MARCKS согласно SEQ ID NO: 401 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка 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 белком MARCKSL1 согласно SEQ ID NO: 402 или с его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах варианты или варианты фрагментов белка 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 белком BASP1 согласно SEQ ID NO: 403 или 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 включает одну или более мутаций, *например*, консервативные аминокислотные замены.

**[0127]** «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.

**[0128]** 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.

**[0129]** 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](http://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](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa).

**[0130]** 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.

**[0131]** 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](http://www.clustal.org). Другой подходящей программой является *MUSCLE*, доступная на веб-сайте [www.drive5.com/muscle/](http://www.drive5.com/muscle/). Программы *ClustalW2* и *MUSCLE* альтернативно доступны, *например*, от EBI.

**[0132]** 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](http://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.

**[0133]** 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*).

**[0134]** 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.

**[0135]** 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.)

**[0136]** 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.

**[0137]** 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, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (публикация Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых аспектах каркас X и/или каркас Y модифицируются в любом удобном месте.

**[0138]** 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*, каркас X и

АСО, соответственно, *например*, каркасным фрагментом, экспрессированным во внеклеточной везикуле или на ней, и АСО, *например*, каркас X (*например*, белком PTGFRN), соответственно, на поверхности просвета или на внешней поверхности внеклеточной везикулы.

**[0139]** Термин «инкапсулированный» или другие грамматические формы этого термина (*например*, инкапсуляция или инкапсулирование) относится к состоянию или процессу пребывания первого фрагмента (*например*, АСО) 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*, АСО) во второй фрагмент (*например*, ВВ, *например*, экзосомы) описаны в другом месте в данном документе.

**[0140]** Используемый в данном документе 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 (СНО), мезенхимальные стволовые клетки (МСК), клетки фибробластов крайней плоти человека ВJ, клетки фибробластов fHDF, клетки-предшественники нейронов AGE.HN<sup>®</sup>, клетки амниоцитов CAP<sup>®</sup>, жировые мезенхимальные стволовые клетки, клетки RPTEC/TERT1. В определенных аспектах клетка-производитель не является антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых аспектах клетка-производитель 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 данном описании, 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.

**[0141]** 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 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.

**[0142]** Используемый в данном документе термин «полезная нагрузка» относится к терапевтическому агенту, который действует на мишень (*например*, клетку-мишень), которая вступает в контакт с ВВ. Неограничивающими примерами нагрузки, которая может быть включена во ВВ, *например*, экзосому, является АСО. Полезные нагрузки, которые могут быть введены во ВВ, *например*, экзосомы, 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, днкРНК 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 АСО. 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)<sub>2</sub>, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, F(ab1)<sub>2</sub>, 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.

**[0143]** 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 настоящем 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.).

**[0144]** Термин «фармацевтический 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.

**[0145]** 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.

**[0146]** Используемый в данном документе термин «макромолекула» означает нуклеиновые кислоты, загрязняющие белки, липиды, углеводы, метаболиты или их комбинации.

**[0147]** В контексте данного документа термин «обычный экзосомный белок» означает белок, ранее известный как обогащенный экзосомами, включая, но не ограничиваясь ими, CD9, CD63, CD81, PDGFR, якорные белки GPI, лактадхерин (MFGE8), LAMP2 и LAMP2B, их фрагмент, или пептид, который связывается с ними.

**[0148]** 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.

**[0149]** «Эффективное количество», *например*, АСО 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.

**[0150]** «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 состояния или его симптомов. В одном аспекте, «обработка» или «лечение» включает индуцирование гемопоза у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах заболевание или состояние связано с гемопозом или его недостатком. В определенных аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой рак. В некоторых аспектах лечение усиливает гемопоз у субъекта, имеющего рак, при этом усиление гемопоза включает усиление пролиферации и/или дифференцировки одной или более иммунных

клеток у субъекта.

**[0151]** 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*, экзосома, содержащая АСО, описанная в настоящем документе, вводится субъекту профилактически. В некоторых аспектах субъект подвержен риску развития рака. В некоторых аспектах субъект подвержен риску развития гемопоэтического расстройства.

## **II. Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО)**

**[0152]** В настоящем изобретении используют антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) для применения в модуляции функции молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих STAT6 млекопитающих, таких как нуклеиновая кислота *STAT6*, *например*, транскрипт *STAT6*, включая пре-мРНК *STAT6* и мРНК *STAT6*, или встречающиеся в природе варианты таких молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих STAT6 млекопитающих. Термин «АСО» в контексте настоящего изобретения относится к молекуле, образованной ковалентной связью двух или более нуклеотидов (*т.е.* олигонуклеотид).

**[0153]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит по меньшей мере один АСО. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит по меньшей мере два АСО, *например*, первый АСО, содержащий первую нуклеотидную последовательность, и второй АСО, содержащий вторую нуклеотидную последовательность. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержащий по меньшей мере три АСО, по меньшей мере четыре АСО, по меньшей мере пять АСО, по меньшей мере шесть АСО или более шести АСО. В некоторых аспектах каждый из первого АСО, второго АСО, третьего АСО, четвертого АСО, пятого АСО, шестого АСО и/или девятого АСО отличается друг от друга.

**[0154]** В некоторых аспектах, ВВ, *например*, экзосома, содержит первый АСО и второй АСО, где первый АСО содержит первую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна первой целевой последовательности в первом транскрипте, и где второй АСО содержит вторую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна 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 5'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность не содержит нуклеотид, который находится в 5'UTR. В некоторых аспектах первая целевая последовательность содержит по меньшей мере один

нуклеотид, который находится в 3'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность не содержит нуклеотид, который находится в 3'UTR. В некоторых аспектах первая целевая последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в 5'UTR транскрипта, а вторая целевая последовательность не содержит по меньшей мере один нуклеотид, который находится в 3'UTR.

**[0155]** В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах соединения экзон-интрон, и второй АСО нацелен на последовательность в пределах соединения экзон-интрон. В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах соединения экзон-интрон, а второй АСО нацелен на последовательность в пределах экзона. В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах соединения экзон-интрон, а второй АСО нацелен на последовательность в пределах интрона. В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах экзона, а второй АСО нацелен на последовательность в пределах экзона. В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах интрона, а второй АСО нацелен на последовательность в пределах экзона. В некоторых аспектах первый АСО нацелен на последовательность в пределах интрона, и второй АСО нацелен на последовательность в пределах интрона.

**[0156]** В некоторых аспектах, ВВ, *например*, экзосома, содержит первый АСО и второй АСО, где первый АСО содержит первую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна первой целевой последовательности в первом транскрипте, и где второй АСО содержит вторую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна второй целевой последовательности во втором транскрипте, где первый транскрипт не является продуктом того же гена, что и второй транскрипт.

**[0157]** АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от примерно 10 до примерно 30, например, 10-20, 14-20, 16-20 или 15-25 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 20 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 18 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 19 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 17 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 16 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 15 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 14 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 13 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 12 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 11 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 10 нуклеотидов.

**[0158]** В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от около 10 до около 50 нуклеотидов, например, от около 10 до

около 45, от около 10 до около 40, от около 10 или около 35, или от около 10 до около 30. В некоторых аспектах длина АСО составляет 21 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 22 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 23 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 24 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 25 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 26 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 27 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 28 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 29 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 30 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 31 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 32 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 33 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 34 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 35 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 36 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 37 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 38 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 39 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 40 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 41 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 42 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 43 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 44 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 45 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 46 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 47 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 48 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 49 нуклеотидов. В некоторых аспектах длина АСО составляет 50 нуклеотидов.

**[0159]** Термины «антисмысловой АСО», «антисмысловой олигонуклеотид» и «олигомер» используемые в настоящем документе, взаимозаменяемы с термином «АСО».

**[0160]** Ссылка на идентификационный номер SEQ ID включает конкретную последовательность нуклеотидного основания, но не включает конструкцию или полную химическую структуру. Кроме того, АСО, описанные на приведенных в данном документе фигурах, показывают репрезентативную конструкцию, но не ограничиваются конкретной конструкцией, показанной на фигурах, если не указано иное. Например, когда пункт формулы (или данное описание) относится к SEQ ID NO: 101, он включает только нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 101. Конструкция любого описанного в настоящем документе АСО 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 является модифицированным

нуклеотидом, *например*, ЗНК, и каждый из других нуклеотидов является немодифицированным нуклеотидом (*например*, ДНК).

**[0161]** В различных аспектах АСО по изобретению не содержит РНК (единицы). В некоторых аспектах, АСО содержит одну или более единиц ДНК. В одном аспекте АСО по изобретению представляет собой линейную молекулу или синтезируется в виде линейной молекулы. В некоторых аспектах АСО представляет собой одноцепочечную молекулу и не содержит короткие области с, например, по меньшей мере 3, 4 или 5 непрерывными нуклеотидами, которые комплементарны эквивалентным областям в той же АСО (*т.е.* дуплексы) - в этом отношении АСО не является (по существу) двухцепочечным. В некоторых аспектах АСО по существу не является двухцепочечным. В некоторых аспектах АСО не является миРНК. В различных аспектах АСО по изобретению может полностью состоять из непрерывной нуклеотидной области. Таким образом, в некоторых аспектах АСО не является по существу самокомплементарным.

**[0162]** В других аспектах настоящее изобретение включает фрагменты АСО. Например, изобретение включает по меньшей мере один нуклеотид, по меньшей мере два непрерывных нуклеотида, по меньшей мере три непрерывных нуклеотида, по меньшей мере четыре непрерывных нуклеотида, по меньшей мере пять непрерывных нуклеотидов, по меньшей мере шесть непрерывных нуклеотидов, по меньшей мере семь непрерывных нуклеотидов, по меньшей мере восемь непрерывных нуклеотидов или по меньшей мере девять непрерывных нуклеотидов АСО, описанных в данном документе. Фрагменты любой из последовательностей, описанных в данном документе, рассматриваются как часть изобретения.

**[0163]** В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению включают фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РМО, англ.: phosphorodiamidate Morpholino oligomer) или конъюгированный с пептидами фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (РРМО, англ.: peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer).

## **II.A. Мишень**

**[0164]** Предпочтительно, АСО по изобретению способен снижать (*например*, снижать или устранять) экспрессию мРНК *STAT6* или белка *STAT6*. В этом отношении АСО по изобретению могут способствовать дифференциации макрофагов М2 и/или снижать дифференциацию макрофагов М1. В частности, настоящее изобретение направлено на АСО, которые нацелены на одну или более областей пре-мРНК *STAT6* (*например*, интронные области, экзонные области и/или области соединения экзон-интрон).

[0165] Если не указано иное, термин «STAT6» в контексте данного документа может относиться к STAT6 одного или более видов (*например*, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота и медведей).

[0166] STAT6 (*STAT6*) также известен как передатчик сигнала и активатор транскрипции  $\beta$ . Синонимы STAT6/*STAT6* известны и включают IL-4 STAT; STAT, индуцированный интерлейкином-4; фактор транскрипции IL-4 STAT; STAT6B; STAT6C; и D12S1644. Последовательность гена *STAT6* человека можно найти под общедоступным номером доступа в GenBank NC\_000012.12: c57111413-57095404. Ген *STAT6* человека находится в хромосоме 12q13.3 в положении 57111413-57095404, комплемент.

[0167] Последовательность транскрипта пре-мРНК *STAT6* человека (SEQ ID NO: 1) соответствует обратному комплементу остатков 57111413-57095404, хромосома 12q13.3. Последовательность мРНК *STAT6* (номер доступа в Genbank NM\_001178078.1) представлена в SEQ ID NO: 3 (Таблица 1), за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 3 показан как «u» в мРНК. Последовательность белка STAT6 человека можно найти под общедоступными номерами доступа: P42226-1 (каноническая последовательность, SEQ ID NO: 2; таблица 1), P42226-2 (SEQ ID NO: 4) и P42226-3 (SEQ ID NO: 5), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**Таблица 1.** Последовательности белка и мРНК STAT6

<b>Последовательность мРНК <i>STAT6</i></b>
GGGGCAGCCACTGCTTACACTGAAGAGGGAGGACGGGAGAGGAGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGCTTTATCTTATTTTTCTTTTTGGTG GTGGTGGTGGAAAGGGGGAGGTGCTAGCAGGGCCAGCCTTGAACCTCGCTGGACA GAGCTACAGACCTATGGGGCCTGGAAGTGCCCGCTGAGAAAGGGAGAAGACAGC AGAGGGGTTGCCGAGGCAACCTCCAAGTCCCAGATCATGTCTCTGTGGGGTCTGG TCTCCAAGATGCCCCAGAAAAAGTGCAGCGGCTCTATGTGCGACTTTCCCAACA CCTGCGGCATCTTCTGGGTGACTGGCTGGAGAGCCAGCCCTGGGAGTTCCTGGTC GGCTCCGACGCCTTCTGCTGCAACTTGGCTAGTGCCCTACTTTCAGACACTGTCCA GCACCTTCAGGCCTCGGTGGGAGAGCAGGGGGAGGGGAGCACCATCTTGCAACA CATCAGCACCCCTTGAGAGCATATATCAGAGGGACCCCTGAAGCTGGTGGCCACT TTCAGACAAATACTTCAAGGAGAGAAAAAGCTGTTATGGAACAGTTCCGCCACT TGCCAATGCCTTTCCACTGGAAGCAGGAAGAACTCAAGTTTAAGACAGGCTTGCG GAGGCTGCAGCACCGAGTAGGGGAGATCCACCTTCTCCGAGAAGCCCTGCAGAA GGGGGCTGAGGCTGGCCAAGTGTCTCTGCACAGCTTGATAGAACTCCTGCTAAT GGGACTGGGCCAAGTGAGGCCCTGGCCATGCTACTGCAGGAGACCACTGGAGAG

CTAGAGGCAGCCAAAGCCCTAGTGCTGAAGAGGATCCAGATTTGGAAACGGCAG  
CAGCAGCTGGCAGGGAATGGCGCACCGTTTGAGGAGAGCCTGGCCCCACTCCAGG  
AGAGGTGTGAAAGCCTGGTGGACATTTATTCCCAGCTACAGCAGGAGGTAGGGGC  
GGCTGGTGGGGAGCTTGAGCCCAAGACCCGGGCATCGCTGACTGGCCGGCTGGAT  
GAAGTCCTGAGAACCCTCGTCACCAGTTGCTTCCTGGTGGAGAAGCAGCCCCCCC  
AGGTAAGACTCAGACCAAGTTCCAGGCTGGAGTTCGATTCTGTTGGGCTT  
GAGGTTCTGGGGGCCCCAGCCAAGCCTCCGCTGGTCAGGGCCGACATGGTGACA  
GAGAAGCAGGCGCGGGAGCTGAGTGTGCCTCAGGGTCCTGGGGCTGGAGCAGAA  
AGCACTGGAGAAATCATCAACAACACTGTGCCCTTGGAGAACAGCATTCTGGGA  
ACTGCTGCTCTGCCCTGTTCAAGAACCTGCTTCTCAAGAAGATCAAGCGGTGTGA  
GCGGAAGGGCACTGAGTCTGTCACAGAGGAGAAGTGCCTGTGCTCTTCTCTGCC  
AGCTTCACACTTGGCCCCGGCAAACCTCCCATCCAGCTCCAGGCCCTGTCTCTGCC  
CCTGGTGGTCATCGTCCATGGCAACCAAGACAACAATGCCAAAGCCACTATCCTG  
TGGGACAATGCCTTCTCTGAGATGGACCGCGTGCCCTTTGTGGTGGCTGAGCGGG  
TGCCCTGGGAGAAGATGTGTGAAACTCTGAACCTGAAGTTCATGGCTGAGGTGGG  
GACCAACCGGGGGCTGCTCCAGAGCACTTCCTCTTCTGGCCCAGAAGATCTTC  
AATGACAACAGCCTCAGTATGGAGGCCTTCCAGCACCGTTCTGTGTCTGGTCGC  
AGTTCAACAAGGAGATCCTGCTGGGCCGTGGCTTCACCTTTTGGCAGTGGTTTGTG  
GGTGTCTGGACCTCACCAAACGCTGTCTCCGGAGCTACTGGTCTGACCGGCTGAT  
CATTGGCTTCATCAGCAAACAGTACGTTACTAGCCTTCTTCTCAATGAGCCCGACG  
GAACCTTTCTCCTCCGCTTCAGCGACTCAGAGATTGGGGGCATCACCATTGCCCAT  
GTCATCCGGGGCCAGGATGGCTCTCCACAGATAGAGAACATCCAGCCATTCTCTG  
CCAAAGACCTGTCCATTCGCTCACTGGGGGACCGAATCCGGGATCTTGCTCAGCT  
CAAAAATCTCTATCCCAAGAAGCCCAAGGATGAGGCTTTCGGAGCCACTACAAG  
CCTGAACAGATGGGTAAGGATGGCAGGGGTTATGTCCCAGCTACCATCAAGATGA  
CCGTGGAAAGGGACCAACCACTTCCCTACCCAGAGCTCCAGATGCCTACCATGGT  
GCCTTCTTATGACCTTGAATGGCCCCTGATTCTCCATGAGCATGCAGCTTGGCC  
CAGATATGGTGCCCCAGGTGTACCCACCACACTCTCACTCCATCCCCCGTATCAA  
GGCTCTCCCCAGAAGAATCAGTCAACGTGTTGTCAGCCTTCCAGGAGCCTCACCT  
GCAGATGCCCCCAGCCTGGGCCAGATGAGCCTGCCCTTTGACCAGCCTCACCCC  
CAGGGCCTGCTGCCGTGCCAGCCTCAGGAGCATGCTGTGTCCAGCCCTGACCCCC  
TGCTCTGCTCAGATGTGACCATGGTGGAAAGACAGCTGCCTGAGCCAGCCAGTGAC  
AGCGTTTCTCAGGGCACTTGGATTGGTGAAGACATATTCCCTCCTCTGCTGCCTC  
CCACTGAACAGGACCTCACTAAGCTTCTCCTGGAGGGGCAAGGGGAGTCGGGGG  
GAGGGTCCTTGGGGGCACAGCCCCTCCTGCAGCCCTCCCACTATGGGCAATCTGG

GATCTCAATGTCCCACATGGACCTAAGGGCCAACCCCAGTTGGTGATCCCAGCTG  
GAGGGAGAACCCAAAGAGACAGCTCTTCTACTACCCCCACAGACCTGCTCTGGAC  
ACTTGCTCATGCCCTGCCAAGCAGCAGATGGGGAGGGTGCCCTCCTATCCCCACC  
TACTCCTGGGTCAGGAGGAAAAGACTAACAGGAGAATGCACAGTGGGTGGAGCC  
AATCCACTCCTTCTTTCTATCATTCCCCTGCCACCTCCTTCCAGCACTGACTGGA  
AGGGAAGTTCAGGCTCTGAGACACACCCCAACATGCCTGCACCTGCAGCGCGCAC  
ACGCACGCACACACACATACAGAGCTCTCTGAGGGTGATGGGGCTGAGCAGGAG  
GGGGGCTGGGTAAGAGCACAGGTTAGGGCATGGAAGGCTTCTCCGCCATTCTGA  
CCCAGGGCCTAGGACGGATAGGCAGGAACATACAGACACATTTACTAGAGGC  
CAGGGATAGAGGATATTGGGTCTCAGCCCTAGGGGAATGGGAAGCAGCTCAAGG  
GACCCTGGGTGGGAGCATAGGAGGGGTCTGGACATGTGGTTACTAGTACAGGTTT  
TGCCCTGATTAAAAATCTCCCAAAGCCCCAAATTCCTGTTAGCCAGGTGGAGGC  
TTCTGATACGTGTATGAGACTATGCAAAAGTACAAGGGCTGAGATTCTTCGTGTAT  
AGCTGTGTGAACGTGTATGTACCTAGGATATGTTAAATGTATAGCTGGCACCTTAG  
TTGCATGACCACATAGAACATGTGTCTATCTGCTTTTGCCTACGTGACAACACAAA  
TTTGGGAGGGTGAGACACTGCACAGAAGACAGCAGCAAGTGTGCTGGCCTCTCTG  
ACATATGCTAACCCCCAAATACTCTGAATTTGGAGTCTGACTGTGCCCAAGTGGGT  
CCAAGTGGCTGTGACATCTACGTATGGCTCCACACCTCCAATGCTGCCTGGGAGC  
CAGGGTGAGAGTCTGGGTCCAGGCCTGGCCATGTGGCCCTCCAGTGTATGAGAGG  
GCCCTGCCTGCTGCATCTTTTCTGTTGCCCATCCACCGCCAGCTTCCCTTCACTCC  
CCTATCCCATTCTCCCTCTCAAGGCAGGGGTCATAGATCCTAAGCCATAAAATAA  
ATTTTATTCCAAAATAACAAAATAAATAATCTACTGTACACAATCTGAAAA (SEQ  
ID NO: 3)

**Последовательность белка STAT6**

MSLWGLVSKMPPEKVQRLYVDFPQHRLRHLLDGWLESQPWEFLVGSDAFCCNLASAL  
LSDTVQHLQASVGEQEGESTILQHISTLESIYQRDPLKLVATFRQILQGEKKAVMEQFR  
HLPMPFHWKQEELKFKTGLRRLQHRVGEIHLREALQKGAEAGQVSLHSLIETPANG  
TGPSEALAMLLQETTGELEAAKALVLKRIQIWKRQQQLAGNGAPFEESLAPLQERCES  
LVDIYSQLQQEVGAAGGELEPKTRASLTGRLDEVLRTLVTSCFLVEKQPPQVLKTQTK  
FQAGVRFLGLRFLGAPAKPPLVRADMVTEKQARELSVPQPGAGAESTGEIINNTVP  
LENSIPGNCCSALFKNLLKKIKRCERKGTESVTEEKCAVLFSASF TLGPGKLP IQLQAL  
SLPLVVIVHGNQDNNAKATILWDNAFSEMDRVPFVVAERVPWEKMCETLNLKFMAE  
VGTNRGLLPEHFLFLAQKIFNDNSLSMEAFQHRSVSWSQFNKEILLGRGFTFWQWFD  
GVLDLTKRCLRSYWSDRLIIGFISKQYVTSLLLNEPDGTFLLRFS DSEIGGITIAHVIRGQ  
DGSPQIENIQPFS AKDLSIRSLGDRIRD LAQLKNLYPKPKDEAFRSHYKPEQMKGKD G

RGYVPATIKMTVERDQPLPTPELQMPTMVPSYDLGMAPDSSMSMQLGPDMPVQVYP  
PHSHSIPPYQGLSPEESVNVLSAFQEPHLQMPPSLGQMSLQFDQPHQGLLPCQPQEHNA  
VSSPDLLCSDVTMVEDSCLSQPVTAFQGTWIGEDIFPPLLPPTEQDLTKLLLEGQGE  
SGGGSLGAQPLLQPSHYGQSGISMSHMDLRANPSW (SEQ ID NO: 2)

**[0168]** Известны природные варианты продукта гена *STAT6* человека. Например, природные варианты белка *STAT6* человека могут содержать одну или более аминокислотных замен, выбранных из: M118R, D419N и любые их комбинации. Дополнительные варианты белка *STAT6* человека, полученные в результате альтернативного сплайсинга, также известны в данной области. Изоформа 2 *STAT6* (идентификатор: P42226-2 в UniProt) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим: делеция остатков 1-174 и замена  $_{175}PSE_{177}$  на  $_{175}MEQ_{177}$  относительно SEQ ID NO: 3. Последовательность изоформы 3 *STAT6* (идентификатор: P42226-3) отличается от канонической последовательности (SEQ ID NO: 3) следующим: делеции остатков 1-110 относительно SEQ ID NO: 3. Поэтому, АСО по настоящему изобретению могут быть сконструированы для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка *STAT6*.

**[0169]** Примером целевой последовательности нуклеиновой кислоты АСО является пре-мРНК *STAT6*. SEQ ID NO: 1 представляет собой геномную последовательность *STAT6* человека (*m.e.* обратный комплемент нуклеотидов 57111413-57095404, хромосома 12q13.3). SEQ ID NO: 1 идентична последовательности пре-мРНК *STAT6*, за исключением того, что нуклеотид «t» в SEQ ID NO: 1 показан как «u» в мРНК. В некоторых аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит интрон нуклеиновых кислот, кодирующих белок *STAT6*, или их встречающиеся в природе варианты, и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит область экзона нуклеиновых кислот, кодирующих белок *STAT6*, или их встречающихся в природе вариантов, и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *например*, пре-мРНК. В других аспектах «целевая нуклеиновая кислота» содержит соединение экзон-интрон нуклеиновых кислот, кодирующих белок *STAT6*, или их встречающихся в природе вариантов, и полученные из них нуклеиновые кислоты РНК, *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 вышеуказанных целевых нуклеиновых кислот ДНК или РНК. Последовательность белка *STAT6* человека, кодируемая пре-мРНК *STAT6*, представлена как SEQ ID NO: 3. В других аспектах целевая нуклеиновая кислота содержит

нетранслируемую область нуклеиновых кислот, кодирующих белок STAT6, или их встречающихся в природе вариантов, *например*, 5' UTR, 3' UTR или и то, и другое.

**[0170]** В некоторых аспектах АСО по изобретению гибридизуется с областью в интронах транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах АСО по изобретению гибридизуется с областью в экзонах транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 1. В других аспектах АСО по изобретению гибридизуется с областью в пределах соединения экзон-интрон транскрипта *STAT6*, *например*, SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах, АСО по изобретению гибридизуется с областью в транскрипте *STAT6* (*например*, интрон, экзон или соединение экзон-интрон), *например*, SEQ ID NO: 1, где АСО имеет конструкцию в соответствии с формулой: 5' А-В-С 3', как описано в данном документе.

**[0171]** В некоторых аспектах АСО нацелен на мРНК, кодирующую определенную изоформу белка STAT6 (*например*, изоформу 1). В некоторых аспектах АСО нацелен на все изоформы белка STAT6. В других аспектах АСО нацелен на две изоформы (*например*, изоформу 1 и изоформу 2, изоформу 1 и изоформу 3, или изоформу 2 и изоформу 3) белка STAT6.

**[0172]** В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность (*например*, длиной от 10 до 30 нуклеотидов, *например*, длиной 20 нуклеотидов), которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в транскрипте *STAT6*, *например*, области, соответствующей SEQ ID NO : 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в пределах последовательности транскрипта *STAT6* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 1-700 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидам 1000-1500 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидам 1500-2000 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидам 2000-2500 из SEQ ID NO: 3; (v) 2500-3000 из SEQ ID NO: 3; или (vi) 3000-3700 из SEQ ID NO: 3, и где, необязательно, АСО имеет одну из конструкций, описанных в настоящем документе, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа.

**[0173]** В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в пределах последовательности транскрипта *STAT6* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 413-803 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидам 952-1688 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидам 1726-2489 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидам 2682-2912 из SEQ ID NO: 3; (v) 2970-3203 из SEQ ID NO: 3; или (vi) 3331-3561 из SEQ ID NO: 3, и где, необязательно, АСО имеет одну из конструкций,

описанных в настоящем документе, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа.

**[0174]** В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью в пределах последовательности транскрипта *STAT6* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 463-753 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидам 1002-1638 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидам 1776-2439 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидам 2682-2862 из SEQ ID NO: 3; (v) 3020-3153 из SEQ ID NO: 3; или (vi) 3381-3511 из SEQ ID NO: 3, и где, необязательно, АСО имеет одну из конструкций, описанных в настоящем документе, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа.

**[0175]** В некоторых аспектах АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты или областью внутри последовательности транскрипта *STAT6* («целевая область»), где последовательность нуклеиновой кислоты соответствует (i) нуклеотидам 503-713 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидам 1042-1598 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидам 1816-2399 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидам 2722-2822 из SEQ ID NO: 3; (v) 3060-3113 из SEQ ID NO: 3; или (vi) 3421-3471 из SEQ ID NO: 3, и где, необязательно, АСО имеет одну из конструкций, описанных в настоящем документе, или химическую структуру, показанную в другом месте настоящего документа.

**[0176]** В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1053-1067 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1053; SEQ ID NO: 91). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1359-1373 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1359; SEQ ID NO: 92). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1890-1904 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1890; SEQ ID NO: 93). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1892-1906 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1892; SEQ ID NO: 94). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1915-1929 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1915; SEQ ID NO: 95). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1916-1930 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1916; SEQ ID NO: 96). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1917-1931 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1917; SEQ ID NO: 97). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1918-1932 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1918; SEQ ID NO: 98). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1919-1933 из SEQ ID NO: 3 (например, АСО-STAT6-1919; SEQ ID NO: 99). В некоторых аспектах целевая область



1893; SEQ ID NO: 121). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1917-1932 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1917; SEQ ID NO: 122). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1919-1934 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1919; SEQ ID NO: 123). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2056-2071 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2056; SEQ ID NO: 124). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2060-2075 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2060; SEQ ID NO: 125). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2066-2081 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2066; SEQ ID NO: 126). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2070-2085 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2070; SEQ ID NO: 127). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2351-2366 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2351; SEQ ID NO: 128). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2352-2367 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2352; SEQ ID NO: 129). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2359-2374 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2359; SEQ ID NO: 130). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3633-3648 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3633; SEQ ID NO: 131). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 673-689 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-673; SEQ ID NO: 132). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1052-1068 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1052; SEQ ID NO: 133). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1356-1372 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1356; SEQ ID NO: 134). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1357-1373 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1357; SEQ ID NO: 135). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1359-1375 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1359; SEQ ID NO: 136). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1360-1376 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1360; SEQ ID NO: 137). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1839-1855 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1839; SEQ ID NO: 138). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1848-1864 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1848; SEQ ID NO: 139). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1849-1865 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1849; SEQ ID NO: 140). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1891-1907 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1891; SEQ ID NO: 141). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1915-1931 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1915; SEQ ID NO: 142). В некоторых аспектах целевая область соответствует

нуклеотидам 1916-1932 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1916; SEQ ID NO: 143). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1917-1933 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1917; SEQ ID NO: 144). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1938-1954 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1938; SEQ ID NO: 145). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1939-1955 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1939; SEQ ID NO: 146). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2063-2079 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2063; SEQ ID NO: 147). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2064-2080 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2064; SEQ ID NO: 148). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2065-2081 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2065; SEQ ID NO: 149). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2066-2082 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2066; SEQ ID NO: 150). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2068-2084 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2068; SEQ ID NO: 151). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2187-2203 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2187; SEQ ID NO: 152). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2350-2366 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2350; SEQ ID NO: 153). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2351-2367 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2351; SEQ ID NO: 154). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2352-2368 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2352; SEQ ID NO: 155). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2357-2373 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2357; SEQ ID NO: 156). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 513-532 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-513; SEQ ID NO: 157). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 671-690 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-671; SEQ ID NO: 158). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1131-1150 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1131; SEQ ID NO: 159). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1354-1373 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1354; SEQ ID NO: 160). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1355-1374 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1355; SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1356-1375 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1356; SEQ ID NO: 162). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1432-1451 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1432; SEQ ID NO: 163). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1555-1574 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1555; SEQ ID NO: 164).



из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2068; SEQ ID NO: 186). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2347-2366 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2347; SEQ ID NO: 187). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2348-2367 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2348; SEQ ID NO: 188). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2358-2377 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2358; SEQ ID NO: 189). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 2782-2801 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-2782; SEQ ID NO: 190). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3070-3089 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3070; SEQ ID NO: 191). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3071-3090 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3071; SEQ ID NO: 192). В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3431-3450 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3431; SEQ ID NO: 193).

**[0177]** В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1053-1067 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1053; SEQ ID NO: 91)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1359-1373 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1359; SEQ ID NO: 92)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1890-1904 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1890; SEQ ID NO: 93)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1892-1906 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1892; SEQ ID NO: 94)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1915-1929 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1915; SEQ ID NO: 95)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1916-1930 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1916; SEQ ID NO: 96)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1917-1931 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1917; SEQ ID NO: 97)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1918-1932 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-1918; SEQ ID NO: 98)  $\pm 10, \pm 20, \pm 30, \pm 40, \pm 50, \pm 60, \pm 70, \pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 1919-1933 из SEQ ID NO:















ID NO: 191)  $\pm 10$ ,  $\pm 20$ ,  $\pm 30$ ,  $\pm 40$ ,  $\pm 50$ ,  $\pm 60$ ,  $\pm 70$ ,  $\pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3071-3090 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3071; SEQ ID NO: 192)  $\pm 10$ ,  $\pm 20$ ,  $\pm 30$ ,  $\pm 40$ ,  $\pm 50$ ,  $\pm 60$ ,  $\pm 70$ ,  $\pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых аспектах целевая область соответствует нуклеотидам 3431-3450 из SEQ ID NO: 3 (например, ACO-STAT6-3431; SEQ ID NO: 193)  $\pm 10$ ,  $\pm 20$ ,  $\pm 30$ ,  $\pm 40$ ,  $\pm 50$ ,  $\pm 60$ ,  $\pm 70$ ,  $\pm 80$  или  $\pm 90$  нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце).

**[0178]** В некоторых аспектах ACO не является TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 89). В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2056 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2055 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2054 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2053 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2052 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2051 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2050 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2049 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2048





3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2054-3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2055-3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2056-3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2057-3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2058-3963 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах целевая область соответствует непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 2059-3963 из SEQ ID NO: 3.

**[0180]** В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению гибридизуется с несколькими целевыми областями в транскрипте *STAT6* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно). В некоторых аспектах АСО гибридизуется с двумя различными целевыми областями в транскрипте *STAT6*. В некоторых аспектах АСО гибридизуется с тремя различными целевыми областями в транскрипте *STAT6*. Последовательности примерных АСО, которые гибридизуются с несколькими целевыми областями, и стартовыми/концевыми участками различных целевых областей, представлены на ФИГ. 1. В некоторых аспектах АСО, гибридизующиеся с несколькими областями в транскрипте *STAT6* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно) являются более активными (например, имеют более низкую EC<sub>50</sub>) в снижении экспрессии *STAT6* по сравнению с АСО, гибридизующимися с одной областью в транскрипте *STAT6* (например, геномная последовательность, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, соответственно).

**[0181]** В некоторых аспектах АСО по изобретению способен гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (например, транскриптом *STAT6*) в физиологических

условиях, *т.е.* в условиях *in vivo*. В некоторых аспектах АСО по изобретению способен гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (*например*, транскриптом *STAT6*) *in vitro*. В некоторых аспектах АСО по изобретению способен гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой (*например*, транскриптом *STAT6*) *in vitro* в жестких условиях. Условия гибридизации *in vitro* зависят, *inter alia*, от продуктивного поглощения клеток, доступности РНК, температуры, свободной энергии ассоциации, концентрации соли и времени (*см. например*, Stanley T Crooke, Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press (2007)). Как правило, для гибридизации *in vitro* используются условия высокой или умеренной жесткости, что позволяет проводить гибридизацию между по существу сходными нуклеиновыми кислотами, но не между несходными нуклеиновыми кислотами. Пример жестких условий гибридизации включает гибридизацию в 5X солевом цитратно-натриевом (SSC, англ.: saline-sodium citrate) буфере (0,75 М хлорид натрия/0,075 М цитрат натрия) в течение 1 часа при 40°C, с последующей промывкой образца 10 раз в 1X SSC при 40°C и 5 раз в 1X SSC буфере при комнатной температуре. Условия гибридизации *in vivo* состоят из внутриклеточных условий (*например*, физиологический рН и внутриклеточные ионные условия), которые регулируют гибридизацию антисмысловых олигонуклеотидов с целевыми последовательностями. Условия *in vivo* могут имитировать *in vitro* с помощью относительно низких условий жесткости. Например, гибридизация может быть проведена *in vitro* в 2X SSC (0,3 М хлорид натрия/0,03 М цитрат натрия), 0,1% SDS при 37°C. Можно использовать промывочный раствор, содержащий 4X SSC, 0,1% SDS при 37°C, с окончательной промывкой в 1X SSC при 45°C.

**[0182]** В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению способен нацеливаться на транскрипт *STAT6* 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 описанные в настоящем документе АСО способны нацеливаться на транскрипт *STAT6* как человека, так и грызунов (*например*, мышей или крыс). Соответственно, в некоторых аспектах АСО способен снижать (*например*, снижать или устранять) экспрессию белка или мРНК *STAT6* как у людей, так и у грызунов (*например*, мышей или крыс). В некоторых аспектах любой АСО, описанный в настоящем документе, является частью конъюгата, содержащего АСО, ковалентно связанного по меньшей мере с одним нуклеотидом или неполинуклеотидом.

**[0183]** Некоторые аспекты настоящего изобретения направлены на конъюгат, содержащий АСО, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах конъюгат содержит АСО, ковалентно присоединенный по меньшей мере к одному нуклеотиду. В

некоторых аспектах конъюгат содержит АСО, ковалентно присоединенный по меньшей мере к одному неполинуклеотидному фрагменту. В некоторых аспектах, нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент включает белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

## **II.B. Последовательности АСО**

**[0184]** АСО по изобретению содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая соответствует комплементу области транскрипта *STAT6*, например, нуклеотидной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

**[0185]** В некоторых аспектах в изобретении предложен АСО длиной от 10 до 30, например, 10-15 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов или около 20 нуклеотидов, 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 с областью в комплементе транскрипта *STAT6*, например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 или их встречающимся в природе вариантом. Так, например, АСО гибридизуется с одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 или его часть.

**[0186]** АСО может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая полностью комплементарна (идеально комплементарна) эквивалентной области нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок STAT6 млекопитающих (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3). АСО может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая полностью комплементарна (идеально комплементарна) последовательности нуклеиновой кислоты или области внутри последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, где X и Y - стартовый участок и концевой участок, соответственно, как показано на ФИГ. 1А.

**[0187]** АСО может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая полностью комплементарна (идеально комплементарна) эквивалентной области мРНК, которая кодирует белок STAT6 млекопитающих (например, или SEQ ID NO: 3). АСО может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая полностью комплементарна (идеально комплементарна) последовательности мРНК или области внутри последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y из SEQ ID NO: 3, где X и Y - стартовый участок и концевой участок, соответственно.

**[0188]** В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность АСО по изобретению или непрерывная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 91-193 (*т.е.* последовательностями на ФИГ. 1А), 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 (гомологичности). В некоторых аспектах АСО имеет конструкцию, описанную в других разделах настоящего документа, или химическую структуру, показанную в других разделах настоящего документа (*например*, на ФИГ. 1А).

**[0189]** В некоторых аспектах АСО (или его непрерывная нуклеотидная часть) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91-193, или область из по меньшей мере 10 непрерывных нуклеотидов, где АСО (или его непрерывная нуклеотидная часть) может необязательно содержать одну, две, три или четыре ошибки спаривания по сравнению с соответствующим транскриптом *STAT6*.

**[0190]** В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из 91 (например, АСО-STAT6-1053), 92 (например, АСО-STAT6-1359), 93 (например, АСО-STAT6-1890), 94 (например, АСО-STAT6-1892), 95 (например, АСО-STAT6-1915), 96 (например, АСО-STAT6-1916), 97 (например, АСО-STAT6-1917), 98 (например, АСО-STAT6-1918), 99 (например, АСО-STAT6-1919), 100 (например, АСО-STAT6-1920), 101 (например, АСО-STAT6-1937), 102 (например, АСО-STAT6-1938), 103 (например, АСО-STAT6-2061), 104 (например, АСО-STAT6-2062), 105 (например, АСО-STAT6-2063), 106 (например, АСО-STAT6-2064), 107 (например, АСО-STAT6-2066), 108 (например, АСО-STAT6-2067), 109 (например, АСО-STAT6-2068), 110 (например, АСО-STAT6-2352), 111 (например, АСО-STAT6-3073), 112 (например, АСО-STAT6-1053), 113 (например, АСО-STAT6-1054), 114 (например, АСО-STAT6-1356), 115 (например, АСО-STAT6-1847), 116 (например, АСО-STAT6-1886), 117 (например, АСО-STAT6-1887), 118 (например, АСО-STAT6-1888), 119 (например, АСО-STAT6-1889), 120 (например, АСО-STAT6-1890), 121 (например, АСО-STAT6-1893), 122 (например, АСО-STAT6-1917), 123 (например, АСО-STAT6-1919), 124 (например, АСО-STAT6-2056), 125 (например, АСО-STAT6-2060), 126 (например, АСО-STAT6-2066), 127 (например, АСО-STAT6-2070), 128

(например, АСО-СТАТ6-2351), 129 (например, АСО-СТАТ6-2352), 130 (например, АСО-СТАТ6-2359), 131 (например, АСО-СТАТ6-3633), 132 (например, АСО-СТАТ6-673), 133 (например, АСО-СТАТ6-1052), 134 (например, АСО-СТАТ6-1356), 135 (например, АСО-СТАТ6-1357), 136 (например, АСО-СТАТ6-1359), 137 (например, АСО-СТАТ6-1360), 138 (например, АСО-СТАТ6-1839), 139 (например, АСО-СТАТ6-1848), 140 (например, АСО-СТАТ6-1849), 141 (например, АСО-СТАТ6-1891), 142 (например, АСО-СТАТ6-1915), 143 (например, АСО-СТАТ6-1916), 144 (например, АСО-СТАТ6-1917), 145 (например, АСО-СТАТ6-1938), 146 (например, АСО-СТАТ6-1939), 147 (например, АСО-СТАТ6-2063), 148 (например, АСО-СТАТ6-2064), 149 (например, АСО-СТАТ6-2065), 150 (например, АСО-СТАТ6-2066), 151 (например, АСО-СТАТ6-2068), 152 (например, АСО-СТАТ6-2187), 153 (например, АСО-СТАТ6-2350), 154 (например, АСО-СТАТ6-2351), 155 (например, АСО-СТАТ6-2352), 156 (например, АСО-СТАТ6-2357), 157 (например, АСО-СТАТ6-513), 158 (например, АСО-СТАТ6-671), 159 (например, АСО-СТАТ6-1131), 160 (например, АСО-СТАТ6-1354), 161 (например, АСО-СТАТ6-1355), 162 (например, АСО-СТАТ6-1356), 163 (например, АСО-СТАТ6-1432), 164 (например, АСО-СТАТ6-1555), 165 (например, АСО-СТАТ6-1556), 166 (например, АСО-СТАТ6-1557), 167 (например, АСО-СТАТ6-1558), 168 (например, АСО-СТАТ6-1826), 169 (например, АСО-СТАТ6-1827), 170 (например, АСО-СТАТ6-1833), 171 (например, АСО-СТАТ6-1843), 172 (например, АСО-СТАТ6-1846), 173 (например, АСО-СТАТ6-1847), 174 (например, АСО-СТАТ6-1883), 175 (например, АСО-СТАТ6-1889), 176 (например, АСО-СТАТ6-1890), 177 (например, АСО-СТАТ6-1891), 178 (например, АСО-СТАТ6-1916), 179 (например, АСО-СТАТ6-1917), 180 (например, АСО-СТАТ6-2056), 181 (например, АСО-СТАТ6-2057), 182 (например, АСО-СТАТ6-2060), 183 (например, АСО-СТАТ6-2062), 184 (например, АСО-СТАТ6-2063), 185 (например, АСО-СТАТ6-2065), 186 (например, АСО-СТАТ6-2068), 187 (например, АСО-СТАТ6-2347), 188 (например, АСО-СТАТ6-2348), 189 (например, АСО-СТАТ6-2358), 190 (например, АСО-СТАТ6-2782), 191 (например, АСО-СТАТ6-3070), 192 (например, АСО-СТАТ6-3071) и 193 (например, АСО-СТАТ6-3431).

**[0191]** В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91 (например, АСО-СТАТ6-1053). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92 (например, АСО-СТАТ6-1359). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93 (например, АСО-СТАТ6-1890). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94 (например, АСО-СТАТ6-1892). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95 (например, АСО-СТАТ6-1915). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную







в SEQ ID NO: 171 (например, ACO-STAT6-1843). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172 (например, ACO-STAT6-1846). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173 (например, ACO-STAT6-1847). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174 (например, ACO-STAT6-1883). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175 (например, ACO-STAT6-1889). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 176 (например, ACO-STAT6-1890). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177 (например, ACO-STAT6-1891). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178 (например, ACO-STAT6-1916). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179 (например, ACO-STAT6-1917). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 180 (например, ACO-STAT6-2056). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181 (например, ACO-STAT6-2057). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 182 (например, ACO-STAT6-2060). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 183 (например, ACO-STAT6-2062). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 184 (например, ACO-STAT6-2063). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 185 (например, ACO-STAT6-2065). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186 (например, ACO-STAT6-2068). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 187 (например, ACO-STAT6-2347). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 188 (например, ACO-STAT6-2348). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189 (например, ACO-STAT6-2358). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190 (например, ACO-STAT6-2782). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191 (например, ACO-STAT6-3070). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192 (например, ACO-STAT6-3071). В некоторых аспектах АСО содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193 (например, ACO-STAT6-3431).

**[0192]** В некоторых аспектах АСО по изобретению связываются с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (например, транскриптом *STAT6*) и способны ингибировать или снижать экспрессию транскрипта *STAT6* по меньшей мере на 10% или

20% по сравнению с нормальным (*т.е.* контрольным) уровнем экспрессии в клетке, *например*, 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 около 100% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии (*например*, уровнем экспрессии в клетках, не подвергавшихся воздействию АСО).

**[0193]** В некоторых аспектах АСО по изобретению способны снижать экспрессию мРНК *STAT6 in vitro* по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на около 100% в целевых клетках, когда клетки находятся в контакте с АСО, по сравнению с клетками, которые не находятся в контакте с АСО (*например*, в контакте с физиологическим раствором).

**[0194]** В некоторых аспектах АСО может допускать 1, 2, 3 или 4 (или более) ошибок спаривания при гибридизации с целевой последовательностью и при этом в достаточной степени связываться с мишенью для проявления желаемого эффекта, *т.е.* подавления целевой мРНК и/или белка. Ошибки спаривания могут, например, компенсироваться увеличением длины нуклеотидной последовательности АСО и/или увеличением числа нуклеотидных аналогов, которые описаны в настоящем документе.

**[0195]** В некоторых аспектах АСО по изобретению содержит не более трех ошибок спаривания при гибридизации с целевой последовательностью. В других аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более двух ошибок спаривания при гибридизации с целевой последовательностью. В других аспектах непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более одной ошибки спаривания при гибридизации с целевой последовательностью.

## **II.C. Длина АСО**

**[0196]** АСО могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность общей длиной 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 непрерывных нуклеотидов. Следует понимать, что когда указан диапазон для АСО или длины непрерывной нуклеотидной последовательности, диапазон включает нижний и верхний предел длины, представленные в диапазоне, например, от (или между) 10-30, включает как 10, так и 30.

[0197] В некоторых аспектах АСО содержат непрерывную нуклеотидную последовательность общей длиной около 14-20, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 непрерывных нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО содержат непрерывную нуклеотидную последовательность общей длиной около 20 непрерывных нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 14 нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 15 нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 16 нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 17 нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 18 нуклеотидов. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеют длину 19 нуклеотидов.

#### **II.D. Нуклеозиды и нуклеозидные аналоги**

[0198] В одном из аспектов изобретения, АСО включают один или более не встречающихся в природе нуклеозидных аналогов. "Нуклеозидные аналоги" как используется в настоящем документе, являются вариантами природных нуклеозидов, таких как нуклеозиды ДНК или РНК, в силу модификаций во фрагментах сахара и/или основания. Аналоги в принципе могут быть просто «молчащими» или «эквивалентными» по отношению к природным нуклеозидам в контексте олигонуклеотида, *то есть* не оказывать функционального влияния на то, как олигонуклеотид работает для ингибирования экспрессии целевого гена. Такие «эквивалентные» аналоги тем не менее могут быть применимы, если, например, они проще или дешевле в производстве, или более устойчивы к условиям хранения или изготовления, или представляют собой тэг или метку. В некоторых аспектах, однако, аналоги будут оказывать функциональное влияние на способ, которым АСО ингибирует экспрессию; например, путем повышения аффинности связывания с мишенью и/или повышения устойчивости к внутриклеточным нуклеазам и/или облегчения транспорта в клетку. Конкретные примеры нуклеозидных аналогов описаны, *например*, в Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 и Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, и на схеме 1. АСО 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 нуклеозидных аналогов. В некоторых аспектах нуклеозидные аналоги в АСО одинаковы. В других аспектах нуклеозидные аналоги в АСО отличаются. Нуклеотидные аналоги в АСО могут быть любым из следующих нуклеозидных аналогов или их комбинацией.

[0199] В некоторых аспектах, нуклеозидный аналог 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 (АНК); 2'-фтор-АНК; бициклический нуклеозидный аналог или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, нуклеозидный аналог включает нуклеозид с модифицированным сахаром. В некоторых аспектах, нуклеозидный аналог включает нуклеозид, содержащий бициклический сахар. В некоторых аспектах, нуклеозидный аналог включает ЗНК.

**[0200]** В некоторых аспектах, нуклеозидный аналог выбран из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ),  $\alpha$ -L-ЗНК,  $\beta$ -D-ЗНК, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-ЗНК, окси-ЗНК, тио-ЗНК и любой их комбинации. В некоторых аспектах, АСО содержит одно или более нуклеотидных оснований 5'-метил-цитозина.

### ***II.D.1. Нуклеотидное основание***

**[0201]** Термин «нуклеотидное 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 «нуклеотидное основание» также включает модифицированные нуклеотидные основания, которые могут отличаться от встречающихся в природе нуклеотидных оснований, но являются функциональными при гибридизации нуклеиновых кислот. В некоторых аспектах фрагмент нуклеотидного основания модифицируется путем модификации или замены нуклеотидного основания. В данном контексте «нуклеотидное основание» относится как к встречающимся в природе нуклеотидным основаниям, таким как аденин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин и гипоксантин, так и к не встречающимся в природе вариантам. Такие варианты описаны, например, в Hirao *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.

**[0202]** В некоторых аспектах фрагмент нуклеотидного основания модифицируется путем замены пурина или пиримидина на модифицированный пурин или пиримидин, такой как замещенный пурин или замещенный пиримидин, например, нуклеотидное основание, выбранное из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-метилцитозина, 5-тиозолоцитозина, 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.

**[0203]** Фрагменты нуклеотидных оснований могут быть обозначены буквенным кодом для каждой соответствующего нуклеотидного основания, *например*, А, Т, G, С или

U, где каждая буква может дополнительно включать модифицированные нуклеотидные основания с эквивалентной функцией. Например, в приведенных в качестве примера олигонуклеотидах фрагменты нуклеотидных оснований выбраны из А, Т, G, С и 5-метил-цитозина. Как вариант, для гэтмеров ЗНК можно использовать 5-метил-цитозиновые нуклеозиды ЗНК.

### *II.D.2. Модификация сахара*

**[0204]** АСО по настоящему 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.

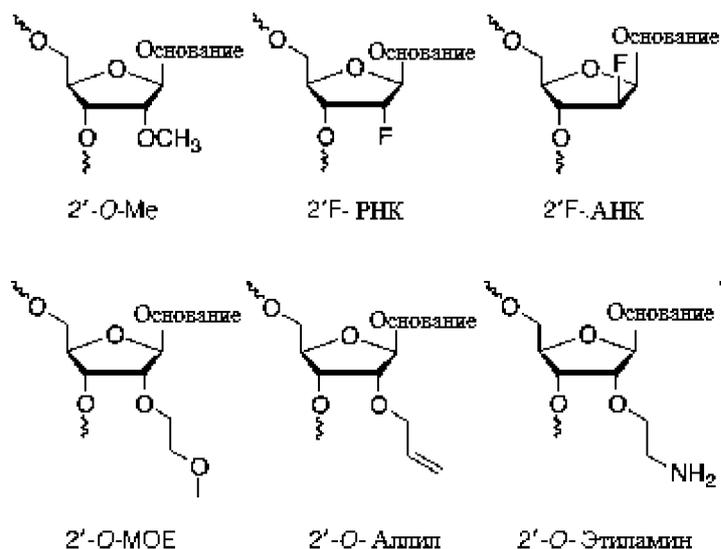
**[0205]** Такие модификации включают те, в которых модифицируется структура кольца рибозы, *например*, путем замены на гексозное кольцо (HNA) или бициклическое кольцо, которое обычно имеет бирадикальный мостик между атомами углерода C2' и C4' на рибозном кольце (ЗНК), или несвязанное кольцо рибозы, в котором обычно отсутствует связь между атомы углерода C2' и C3' (*например*, UNA). Другие нуклеозиды, модифицированные сахаром, включают, например, нуклеиновые кислоты бициклогексозы (WO2011/017521) или трициклические нуклеиновые кислоты (WO2013/154798). Модифицированные нуклеозиды также включают нуклеозиды, в которых сахарный фрагмент заменен несхарным фрагментом, например, в случае пептидных нуклеиновых кислот (PNA) или морфолинуклеиновых кислот.

**[0206]** 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*

**[0207]** Нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром представляет собой нуклеозид,

который имеет заместитель, отличный от Н или –ОН, в положении 2' (2'-замещенный нуклеозид) или содержит 2'-связанный бирадикал, и включает 2'-замещенные нуклеозиды и ЗНК (2'-4'-бисрадикальные мостиковые) нуклеозиды. Например, 2'-модифицированный сахар может обеспечивать повышенную аффинность связывания (*например*, увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром) и/или повышенную устойчивость олигонуклеотида к нуклеазам. Примерами 2'-замещенных модифицированных нуклеозидов являются 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино- ДНК, 2'-фтор-РНК, 2'-флуоро-ДНК, арабинуклеиновые кислоты (АНА) и 2'-фтор-АНА-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.

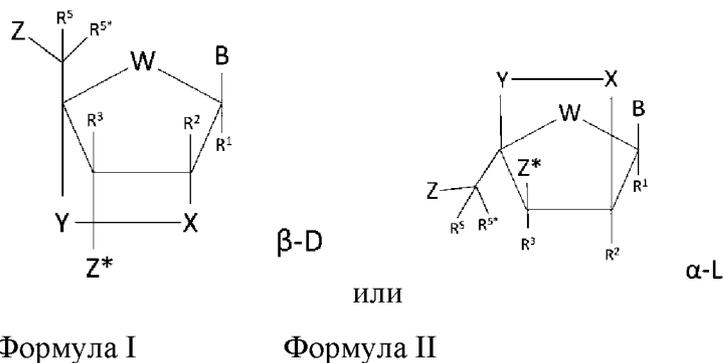


### *И.Д.2.в      Нуклеозиды заблокированной нуклеиновой кислоты (ЗНК).*

[0208]      Нуклеозиды ЗНК 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 (ВНА). Блокирование конформации рибозы ассоциировано с повышенной аффинностью гибридизации (стабилизацией дуплекса), когда ЗНК включается в олигонуклеотид для комплементарной молекулы РНК или ДНК. Это можно определить обычным образом путем измерения температуры плавления дуплекса олигонуклеотид/комплемент.

[0209] Неограничивающие примеры нуклеозидов ЗНК 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.

[0210] В некоторых аспектах модифицированный нуклеозид или нуклеозиды ЗНК согласно АСО по настоящему изобретению имеют общую структуру формулы I или II:



где

W выбран из -O-, -S-, -N(R<sup>a</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, в частности, -O-;

B представляет собой нуклеотидное основание или модифицированный фрагмент нуклеотидного основания;

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

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

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> независимо выбраны из водорода, галогена, алкила, алкенила, алкинила, гидроксигруппы, алкокси, алкоксиалкила, алкенилокси, карбоксила, алкоксикарбонила, алкилкарбонила, формила, азиды, гетероцикла и арила; и

X, Y, R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены в данном документе.

[0211] В некоторых аспектах, -X-Y-, R<sup>a</sup> представляют собой водород или алкил, в частности водород или метил. В некоторых аспектах, -X-Y-, R<sup>b</sup> представляют собой водород или алкил, в частности водород или метил. В других аспектах -X-Y-, один или оба из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляют собой водород. В других аспектах -X-Y-, только один из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляет собой водород. В некоторых аспектах -X-Y-, один из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляет собой метил, а другой - водород. В некоторых аспектах -X-Y-, R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> одновременно являются метилами.

[0212] В некоторых аспектах, -X-, R<sup>a</sup> представляют собой водород или алкил, в

частности водород или метил. В некоторых аспектах,  $-X-$ ,  $R^b$  представляют 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 конкретных аспектах  $-X-$ , только один из  $R^a$  и  $R^b$  представляет собой водород. В конкретных аспектах  $-X-$ , один из  $R^a$  и  $R^b$  представляет собой метил, а другой - водород. В других аспектах  $-X-$ ,  $R^a$  и  $R^b$  одновременно являются метилами.

**[0213]** В некоторых аспектах,  $-Y-$ ,  $R^a$  представляют собой водород или алкил, в частности водород или метил. В конкретных аспектах,  $-Y-$ ,  $R^b$  представляют 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 - водород. В некоторых аспектах  $-Y-$ ,  $R^a$  и  $R^b$  одновременно являются метилами.

**[0214]** В некоторых аспектах  $R^1, R^2, R^3, R^5$  и  $R^{5*}$  независимо выбраны из водорода и алкила, в частности водорода и метила.

**[0215]** В некоторых аспектах  $R^1, R^2, R^3, R^5$  и  $R^{5*}$  одновременно являются водородом.

**[0216]** В некоторых аспектах  $R^1, R^2, R^3$ , все одновременно являются водородом, один из  $R^5$  и  $R^{5*}$  является водородом, а другой - как определено выше, в частности алкилом, более конкретно метилом.

**[0217]** В некоторых аспектах  $R^1, R^2, R^3$ , все одновременно являются водородом, один из  $R^5$  и  $R^{5*}$  является водородом, а другой - азидом.

**[0218]** В некоторых аспектах,  $-X-Y-$  представляет собой  $-O-CH_2-$ ,  $W$  представляет собой кислород, а  $R^1, R^2, R^3, R^5$  и  $R^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие нуклеозиды ЗНК описаны в WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352 и WO 2004/046160, которые включены в настоящий документ посредством ссылки, и включают известные в данной области техники нуклеозиды бета-D-окси ЗНК и альфа-L-окси ЗНК.

**[0219]** В некоторых аспектах,  $-X-Y-$  представляет собой  $-S-CH_2-$ ,  $W$  представляет собой кислород, а  $R^1, R^2, R^3, R^5$  и  $R^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие тионуклеозиды ЗНК описаны в WO 99/014226 и WO 2004/046160, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0220]** В некоторых аспектах,  $-X-Y-$  представляет собой  $-NH-CH_2-$ ,  $W$  представляет собой кислород, а  $R^1, R^2, R^3, R^5$  и  $R^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие аминонуклеозиды ЗНК описаны в WO 99/014226 и WO 2004/046160, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0221]** В некоторых аспектах,  $-X-Y-$  представляет собой  $-O-CH_2CH_2-$  или -

$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , W представляет собой кислород, а  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие нуклеозиды ЗНК описаны в WO 00/047599 и в Morita *et al.*, *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12, 73-76, которые включены в настоящий документ посредством ссылки, и включают известные в данной области техники нуклеиновые кислоты с 2'-О-4'С-этиленовым мостиком (ЭНК).

[0222] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой кислород,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  одновременно являются водородом, один из  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  представляет собой водород, а другой не является водородом, например, алкил, например, метил. Такие 5'-замещенные нуклеозиды ЗНК описаны в WO 2007/134181, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0223] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, где один из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup>, или оба не являются водородом, в частности алкилом, таким как метил, W представляет собой кислород,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  одновременно являются водородом, один из  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  представляет собой водород, а другой не является водородом, в частности алкил, например метил. Такие бис-модифицированные нуклеозиды ЗНК описаны в WO 2010/077578, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0224] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>)- («2' О-метоксиэтил бициклическая нуклеиновая кислота», Seth *et al.*, *J. Org. Chem.* 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81).

[0225] В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -O-CHR<sup>a</sup>-, W представляет собой кислород, а  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие 6'-замещенные нуклеозиды ЗНК описаны в WO 2010/036698 и WO 2007/090071, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В таких 6'-замещенных нуклеозидах ЗНК, R<sup>a</sup>, в частности, представляет собой C1-C6 алкил, например, метил.

[0226] В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -O-CH(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>)-, W представляет собой кислород, а  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие нуклеозиды ЗНК также известны в данной области техники как циклические МОЕ (цМОЕ) и описаны в WO 2007/090071.

[0227] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

[0228] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>- (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 *op. cit.*)

[0229] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CH(CH<sub>3</sub>)-, W представляет собой кислород, а  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^5$  и  $\text{R}^{5*}$  одновременно являются водородом. Такие 6'-метил нуклеозиды ЗНК также известны в данной области техники как сЕТ-нуклеозиды, и могут быть либо (S)-сЕТ, либо (R)-сЕТ диастереоизомерами, как описано в

WO 2007/090071 (бета-D) и WO 2010/036698 (альфа-L), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0230]** В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, где ни R<sup>a</sup>, ни R<sup>b</sup> не являются водородом, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В некоторых аспектах R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> являются одновременно алкилами, в частности, одновременно метилами. Такие б'-ди-замещенные нуклеозиды ЗНК описаны в WO 2009/006478 который включен в настоящий документ посредством ссылки.

**[0231]** В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -S-CHR<sup>a</sup>-, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. Такие б'-замещенные тионуклеозиды ЗНК описаны в WO 2011/156202, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых аспектах таких б'-замещенных тио-ЗНК, R<sup>a</sup> представляет собой алкил, в частности метил.

**[0232]** В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -C(=CH<sub>2</sub>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, например, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. Такие винилкарбонуклеозиды ЗНК описаны в WO 2008/154401 и WO 2009/067647, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0233]** В некоторых аспектах, -X-Y- представляет собой -N(OR<sup>a</sup>)-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В некоторых аспектах R<sup>a</sup> представляет собой алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды ЗНК также известны как N-замещенные ЗНК и описаны в WO 2008/150729, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[0234]** В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-NCH<sub>3</sub>- (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 *op. cit.*).

**[0235]** В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой ON(R<sup>a</sup>)-, -N(R<sup>a</sup>)-O-, -NR<sup>a</sup>-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>- или -NR<sup>a</sup>-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В некоторых аспектах R<sup>a</sup> представляет собой алкил, например, метил. (Seth *et al.*, *J. Org. Chem* 2010 *op. cit.*).

**[0236]** В некоторых аспектах R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В других аспектах один из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> является водородом, а другой - алкилом, например, метилом. В таких аспектах R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> могут быть, в частности, водородом, а -X-Y- может быть, в частности, -O-CH<sub>2</sub>- или -O-CHC(R<sup>a</sup>)<sub>3</sub>-, например -O-CH(CH<sub>3</sub>)-

**[0237]** В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, например -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В таких аспектах R<sup>a</sup> может быть, в частности, алкилом, таким как метил. Такие нуклеозиды ЗНК также известны как конформационно ограниченные нуклеотиды (КОН) и

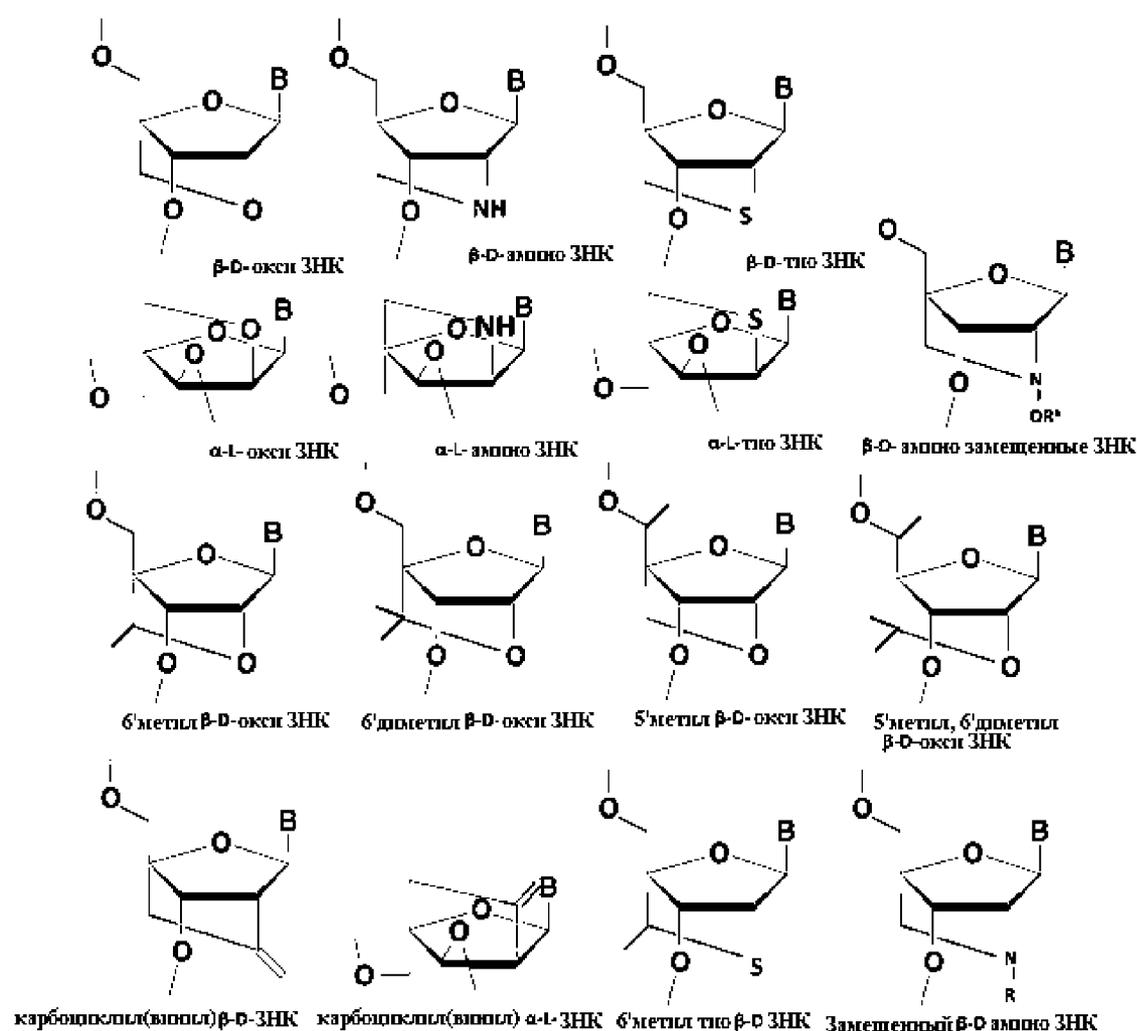
описаны в WO 2013/036868, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0238] В некоторых аспектах -X-Y- представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, например -O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой кислород, а R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> одновременно являются водородом. В некоторых аспектах R<sup>a</sup> может быть, в частности, алкилом, таким как метил. Такие нуклеозиды ЗНК также известны как нуклеотиды СОС и описаны в Mitsuoka *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2009, 37(4), 1225-1238, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0239] Следует понимать, что, если не указано, нуклеозиды ЗНК могут быть в стереоизоформе бета-D или альфа-L.

[0240] Некоторые примеры нуклеозидов ЗНК представлены на схеме 1.

Схема 1



[0241] Как показано выше, в некоторых аспектах изобретения нуклеозиды ЗНК в олигонуклеотидах представляют собой бета-D-окси-ЗНК нуклеозиды.

### **III.E. Деградация, опосредованная нуклеазой**

[0242] Деградация, опосредованная нуклеазой, относится к олигонуклеотиду, способному опосредовать деградацию комплементарной нуклеотидной последовательности при образовании дуплекса с такой последовательностью.

[0243] В некоторых аспектах олигонуклеотид может функционировать посредством деградации, опосредованной нуклеазой, целевой нуклеиновой кислоты, где олигонуклеотиды по изобретению способны рекрутировать нуклеазу, в частности эндонуклеазу, предпочтительно эндорибонуклеазу (РНКазу), такую как РНКазу H. Примерами олигонуклеотидных конструкций, которые действуют через механизмы, опосредованные нуклеазой, являются олигонуклеотиды, которые обычно содержат область из по меньшей мере 5 или 6 нуклеозидов ДНК и фланкированы с одной стороны или с обеих сторон нуклеозидами, усиливающими аффинность, например, гэпмерами.

### **III.F. Активность и рекрутинг РНКазы H**

[0244] РНКазная активность антисмыслового олигонуклеотида относится к его способности рекрутировать РНКазу H в дуплексе с комплементарной молекулой РНК и вызывать деградацию комплементарной молекулы РНК. В WO01/23613 предложены способы *in vitro* для определения активности РНКазы H, которые могут быть использованы для определения способности рекрутировать РНКазу H. Как правило, олигонуклеотид считается способным рекрутировать РНКазу H, если при предоставлении комплементарной последовательности целевой 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 фосфоротиоатной связью между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с использованием методики, представленной в Примерах 91 - 95 WO01/23613.

[0245] В некоторых аспектах олигонуклеотид считается по существу неспособным к рекрутированию РНКазы H, если при наличии комплементарной целевой нуклеиновой кислоты начальная скорость РНКазы H, 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 фосфоротиоатной связью между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с использованием

методики, представленной в Примерах 91 - 95 WO01/23613.

## **II.G. Конструкции АСО**

[0246] АСО по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, которая содержит как нуклеозиды, так и нуклеозидные аналоги, и может быть в форме гэтамера. Примеры конфигураций гэтамера, которые могут быть использованы с АСО по изобретению, описаны в заявке на патент США Публ. № 2012/0322851.

[0247] Термин «гэтамер» как используется в настоящем документе, относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который включает область олигонуклеотидов, рекрутирующих РНКазу Н (гэта), которая 5' и 3' фланкирована одним или более модифицированными нуклеозидами (фланками), повышающими аффинность. Термин «гэтамер ЗНК» представляет собой гэтамерный олигонуклеотид, в котором по меньшей мере один из модифицированных нуклеозидов, повышающих аффинность, представляет собой нуклеозид ЗНК. Термин «смешанный гэтамер крыла» относится к гэтамеру ЗНК, в котором фланкирующие области включают по меньшей мере один нуклеозид ЗНК и по меньшей мере один нуклеозид ДНК или модифицированный нуклеозид не-ЗНК, такой как по меньшей мере один 2'-замещенный модифицированный нуклеозид, такой как, например, 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, арабинонуклеиновую кислоту (АНК) и 2'-фтор-АНК нуклеозид(ы).

[0248] В некоторых аспектах, АСО по изобретению может быть в форме миксмера. В некоторых аспектах, АСО по изобретению может быть в форме тоталмера. В некоторых аспектах, в дополнение к повышению аффинности АСО к целевой области, некоторые аналоги нуклеозидов также опосредуют связывание и расщепление РНКазой (*например*, РНКазой Н). Поскольку мономеры  $\alpha$ -L-ЗНК в определенной степени рекрутируют активность РНКазы Н, в некоторых аспектах, области гэта (*например*, область В, как упоминается в данном документе) АСО, содержащих мономеры  $\alpha$ -L-ЗНК, состоят из меньшего количества мономеров, узнаваемых и расщепляемых РНКазой Н, и появляется большая гибкость в конструкции миксмера.

### **II.G.1. Конструкция гэтамера**

[0249] В некоторых аспектах АСО по изобретению представляет собой гэтамер и содержит непрерывный участок нуклеотидов (*например*, одну или более ДНК), который способен рекрутировать РНКазу, такую как РНКазу Н, называемую в настоящем документе областью В (В), где область В фланкирована 5' и 3' областями нуклеозидных аналогов 5' и

3' к непрерывному участку нуклеотидов области В - эти области называются областями А (А) и С (С), соответственно. В некоторых аспектах нуклеозидные аналоги представляют собой нуклеозиды, модифицированные сахаром (*например*, высокоаффинные нуклеозиды, модифицированные сахаром). В некоторых аспектах нуклеозиды, модифицированные сахаром, областей А и С повышают аффинность АСО к целевой нуклеиновой кислоте (*т.е.* повышающие аффинность нуклеозиды, 2'-модифицированные сахаром). В некоторых аспектах нуклеозиды, модифицированные сахаром, представляют собой нуклеозиды, 2'-модифицированные сахаром, *например*, высокоаффинные 2'-модификации сахара, такие как ЗНК и/или 2'-МОЕ.

**[0250]** В гэпмере большинство 5'- и 3'-нуклеозидов области В представляют собой нуклеозиды ДНК и расположены рядом с аналогами нуклеозидов (*например*, высокоаффинными нуклеозидами, модифицированными сахаром) областей А и С, соответственно. В некоторых аспектах области А и С могут быть дополнительно определены путем наличия нуклеозидных аналогов на конце, наиболее удаленном от области В (*т.е.* на 5' конце области А и на 3' конце области С).

**[0251]** В некоторых аспектах, АСО по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность формулы (5' к 3') А-В-С, где: (А) (5'-область или первая последовательность крыла) содержит по меньшей мере один нуклеозидный аналог (*например*, 3-5 единиц ЗНК); (В) содержит по меньшей мере четыре последовательных нуклеозида (*например*, 4-24 единицы ДНК), которые способны рекрутировать РНКазу (при образовании дуплекса с комплементарной молекулой РНК, такой как пре-мРНК или целевая мРНК); и (С) (3'-область или вторая последовательность крыла) содержит по меньшей мере один нуклеозидный аналог (*например*, 3-5 единиц ЗНК).

**[0252]** В некоторых аспектах область А содержит 3-5 нуклеозидных аналогов, таких как ЗНК, область В содержит 6-24 (*например*, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) единиц ДНК, а область С содержит 3 или 4 нуклеозидных аналога, таких как ЗНК. К таким конструкциям относятся (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 АСО имеет конструкцию, состоящую из  $LLLD_nLLL$ ,  $LLLLD_nLLLL$  или  $LLLLLD_nLLLLL$ , где L - нуклеозидный аналог, D - 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 АСО имеет конструкцию, состоящую из  $LLLMMD_nMMLLL$ ,  $LLLMD_nMLLL$ ,  $LLLLMMD_nMMLLLL$ ,  $LLLLLD_nMMLLLL$ ,  $LLLLLLMMD_nMMLLLL$  или  $LLLLLLMD_nMMLLLL$ , где D представляет собой ДНК, n может быть любым целым числом от 3 до 15, L представляет собой ЗНК, а M представляет собой 2'-МОЕ.

[0253] Другие конструкции гёпмеров описаны в WO2004/046160, WO 2007/146511 и WO2008/113832, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **II. Межнуклеотидные связи**

[0254] Мономеры описанных в данном документе АСО соединены между собой с помощью групп сцепления. Предпочтительно, каждый мономер связан с 3'-смежным мономером посредством группы сцепления.

[0255] Специалист в данной области понимает, что в контексте настоящего изобретения 5'-мономер на конце АСО не включает 5'-группу сцепления, хотя он может включать или не включать 5'-терминальную группу.

[0256] В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. Термины «группа сцепления» или «межнуклеозидная связь» означают группу, способную ковалентно соединять два нуклеозида. Неограничивающие примеры включают фосфатные группы и фосфоротиоатные группы.

[0257] Нуклеозиды АСО по изобретению или их непрерывные нуклеозидные последовательности соединены вместе посредством групп сцепления. Предпочтительно, каждый нуклеозид связан с 3'-смежным нуклеозидом посредством группы сцепления.

[0258] В некоторых аспектах межнуклеозидная связь изменена с обычной фосфодизфирной на связь, более устойчивую к нуклеазной атаке, такую как фосфоротиоатная, которая 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 90%, по меньшей 91%, по меньшей 92%, по меньшей 93%, по меньшей 94%, по меньшей 95%, по меньшей 96%, по меньшей 97%, по меньшей 98%, по меньшей 99% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы.

### **III. Внеклеточные везикулы, например, экзосомы**

[0259] В настоящем документе описаны ВВ, например, экзосомы, содержащие АСО. АСО может быть любым АСО, описанным в настоящем документе, или его функциональным фрагментом. В некоторых аспектах АСО снижает уровень мРНК *STAT6* или белка *STAT6* в целевой клетке.

[0260] 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.

**[0261]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, снижает экспрессию одного или более генов, которые регулируются STAT6. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, способствует дифференциации макрофагов M2. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, снижает дифференцировку макрофагов M1.

**[0262]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит рак у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, аденокарциномы прямой кишки, рака поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, серозной цистаденокарциномы яичников, рака предстательной железы, плоскоклеточного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, лимфомы, лейкемии (*например*, острого миелоидного лейкоза), рака печени, глиобластомы, меланомы, миеломы, базальноклеточного рака, аденокарциномы, рака потовых желез, рака сальных желез, папиллярного рака, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярного рака, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, рака желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбрионального рака, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака яичка, герминогенных опухолей яичка, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевого пузыря, эпителиального рака, глиомы (*например*, глиомы головного мозга низшего класса), глиобластомы (*например*, мультиформной глиобластомы), астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, увеальной меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, карциномы

щитовидной железы, карциномы эндометрия тела матки, карциносаркомы матки, феохромоцитомы, параганглиомы и любой их комбинации. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, увеличивает инфильтрацию опухоли иммунными клетками, *например*, макрофагами. В некоторых аспектах рак представляет собой рак с высоким содержанием миелоидов. В некоторых аспектах рак включает рак с высоким содержанием М2. В некоторых аспектах рак включает рак печени. В некоторых аспектах рак включает гепатоцеллюлярный рак (ГЦР). В некоторых аспектах рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы (ПАПЖ), в некоторых аспектах рак включает колоректальную карциному (КРК). В некоторых аспектах рак включает рак яичников. В некоторых аспектах рак включает лептоменингеальный рак. В некоторых аспектах рак включает трудноизлечимую опухоль центральной нервной системы.

**[0263]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит опухоль центральной нервной системы у субъекта. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит опухоль мозга у субъекта. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит глиобластому у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах глиобластома представляет собой мультиформную глиобластому (МГБ). В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит лептоменингеальное онкологическое заболевание у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, включающая АСО, активирует макрофаги в центральной нервной системе. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, включающая АСО, индуцирует М1-поляризацию макрофагов в центральной нервной системе. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, включающая АСО, активирует менингеальные макрофаги. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, включающая АСО, индуцирует М1-поляризацию менингеальных макрофагов

**[0264]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит фиброз у субъекта, нуждающегося в этом. Чрезмерная активация макрофагов М2 приводит к постоянной выработке TGF $\beta$  и факторов роста, которые способствуют пролиферации миофибробластов, активации EMT/EndoMT и отложению внеклеточного матрикса. Макрофаги М2 представляют собой точку разрыва между заживлением раны и обострением про-фибротического процесса. В некоторых аспектах, фиброз выбран из фиброза печени (NASH), цирроза, легочного фиброза, муковисцидоза, хронического язвенного колита/IBD, фиброза мочевого пузыря, фиброза почек, CAPS (синдрома Макла-Уэллса), фиброза предсердий, эндомиокардиального фиброза, перенесённого инфаркта миокарда, глиального рубца, артериальной ригидности, артрофиброза, болезни Крона, контрактуры Дюпюитрена, келоидного фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, болезни Пейрони, нефрогенного системного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, ретроперитонеального

фиброза, склеродермии/системного склероза, адгезивного капсулита, а также любой их комбинации. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит фиброз печени (NASH). В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит CAPS (синдром Макла-Уэллса).

**[0265]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит нейродегенеративное заболевание. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, прионной болезни, болезни двигательных нейронов, болезни Хантингтона, спиноцереbellлярной атаксии, спинальной мышечной атрофии и любой их комбинации.

**[0266]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, лечит метаболическое расстройство/CVD. В некоторых аспектах метаболическое расстройство/CVD выбирают из кислотно-основного дисбаланса, метаболического заболевания мозга, нарушения метаболизма кальция, нарушения репарации ДНК, нарушения метаболизма глюкозы, гиперлактатемии, нарушения обмена железа, нарушения липидного обмена, синдрома мальабсорбции, метаболического синдрома X, врожденной ошибки метаболизма, митохондриальной болезни, нарушения фосфорного обмена, порфирии, дефицита протеостаза, метаболического заболевания кожи, синдрома истощения, водно-электролитного дисбаланса и любой их комбинации.

**[0267]** 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*.

**[0268]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, по данному изобретению содержит билипидную мембрану («мембрана ВВ, *например*, экзосомы»), содержащую внутреннюю (просвета) поверхность и внешнюю поверхность. В определенных аспектах внутренняя (просвета) поверхность обращена к внутреннему ядру (*т.е.* просвету) ВВ, *например*, экзосомы. В определенных аспектах внешняя поверхность может контактировать с эндосомой, мультивезикулярными тельцами или мембраной/цитоплазмой клетки-продуцента или клетки-мишени.

**[0269]** 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, холестерин и фосфатидилсерин.

**[0270]** В некоторых аспектах мембрана ВВ, *например*, экзосомы содержит внутреннюю и внешнюю мембраны. Состав внутренней и внешней мембран может быть определен с помощью известных в данной области анализов трансбислойного

распределения, см., например, Kuipers *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.

[0271] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, мембрана содержит один или несколько полисахаридов, таких как гликан.

[0272] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, по настоящему изобретению включает АСО, где АСО связан с ВВ через каркасный фрагмент либо на внешней поверхности ВВ, либо на поверхности просвета ВВ.

[0273] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержащая АСО, включает якорный фрагмент, который, по желанию, содержит линкер, между АСО и мембраной экзосомы. Неограничивающие примеры линкеров описаны в другом месте в настоящем документе.

### Ш.А. Якорные фрагменты (ЯФ)

[0274] Для прикрепления АСО к ВВ по настоящего изобретению можно использовать один или более якорных фрагментов (ЯФ). В некоторых аспектах АСО связан непосредственно с якорным фрагментом или посредством линкера. В некоторых аспектах АСО может быть присоединен к якорному фрагменту или комбинации линкеров посредством реакции между «реактивной группой» (РГ; например, амином, тиолом, гидроксидом, карбоновой кислотой или азидом) с «реактивным фрагментом» (РФ; например, малеимидом, сукцинатом, NHS). Предполагается несколько потенциальных путей синтеза, например:

[ЯФ]-реактивный фрагмент/ + /реактивная группа/-[АСО]

[ЯФ]-[линкер]n-реактивный фрагмент/ + /реактивная группа/-[АСО]

[ЯФ]-Реактивный фрагмент/ + /Реактивная группа/-[линкер]n-[АСО]

[ЯФ]-[линкер]n-Реактивный фрагмент/ + /Реактивная группа/-[линкер]n-[АСО]

[0275] Якорный фрагмент может встраиваться в липидный бислой ВВ, например, экзосомы, что позволяет загрузить в экзосому АСО. В настоящее время основным препятствием для коммерциализации экзосом в качестве средства доставки полярных АСО является крайне неэффективная загрузка. Это препятствие может быть преодолено путем модификации полярных АСО перед их загрузкой в экзосомы. Таким образом, как описано в настоящем документе, модификация АСО облегчает их загрузку в экзосомы.

[0276] Изложенные в данном документе способы загрузки экзосом

модифицированными полярными АСО значительно повышают эффективность загрузки по сравнению с эффективностью загрузки, о которой сообщалось ранее при введении немодифицированных АСО в экзосомы, например, с помощью электропорации или трансфекции катионными липидами.

**[0277]** В некоторых аспектах модификации увеличивают гидрофобность АСО по меньшей мере примерно на 1, по меньшей мере примерно на 2, по меньшей мере примерно на 3, по меньшей мере примерно на 4, по меньшей мере примерно на 5, по меньшей мере примерно на 6, по меньшей мере примерно на 7, по меньшей мере примерно на 8, по меньшей мере примерно на 9 или по меньшей мере примерно в 10 раз по сравнению с нативным (немодифицированным) АСО. В некоторых аспектах модификации увеличивают гидрофобность АСО по меньшей мере примерно на 1, по меньшей мере примерно на 2, по меньшей мере примерно на 3, по меньшей мере примерно на 4, по меньшей мере примерно на 5, по меньшей мере примерно на 6, по меньшей мере примерно на 7, по меньшей мере примерно на 8, по меньшей мере примерно на 9 или по меньшей мере примерно в 10 раз по сравнению с нативным (немодифицированным) АСО.

**[0278]** В некоторых аспектах модификации увеличивают гидрофобность АСО по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 175%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или по меньшей мере на 1000% относительно нативного (немодифицированного) АСО, например, соответствующего немодифицированного АСО. Увеличение гидрофобности может быть оценено любым подходящим методом. Например, гидрофобность может быть определена путем измерения процентной растворимости в органическом растворителе, таком как октанол, по сравнению с растворимостью в водном растворителе, таком как вода.

**[0279]** В некоторых аспектах якорный фрагмент может быть химически конъюгирован с АСО для усиления его гидрофобного характера. В примерных аспектах якорный фрагмент представляет собой стерин (например, холестерин), GM1, липид, витамин, нозкомолекулярное вещество, пептид или их комбинацию. В некоторых аспектах фрагмент представляет собой липид. В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой стерин, например, холестерин. Дополнительные гидрофобные фрагменты включают, например, фосфолипиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или

витамины (например, витамин D или витамин E).

**[0280]** В некоторых аспектах якорный фрагмент конъюгируется на концевых участках АСО либо непосредственно, либо через один или более линкеров (т.е. «терминальная модификация»). В других аспектах якорный фрагмент конъюгировано с другими частями АСО.

**[0281]** В некоторых аспектах АСО может включать детектируемую метку. Примерные метки включают флуоресцентные метки и/или радиоактивные метки. В некоторых аспектах, когда АСО являются флуоресцентно меченными, детектируемая метка может быть, например, Су3. Добавление детектируемой метки к АСО может быть использовано как способ маркировки экзосом и отслеживания их биораспределения. В других аспектах детектируемая метка может быть прикреплена к экзосомам напрямую, например, путем мечения липида экзосомы и/или пептида экзосомы.

**[0282]** Различные компоненты АСО (т.е. якорные фрагменты, линкеры и комбинации линкеров, а также АСО) могут быть связаны амидными, сложноэфирными, эфирными, тиоэфирными, дисульфидными, фосфорамидатными, фосфотриэфирными, фосфородитиоатными, метилфосфонатными, фосфодиэфирными или фосфоротиоатными связями или, альтернативно, любыми или другими связями.

**[0283]** В некоторых аспектах различные компоненты АСО 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-масляная кислота, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, йодоацетоксисукцинимид, N-(4-малеимидбутилокси) сукцинимид, N-[5-(3'-малеимидпропиламид)-1-карбокспентил]иминодиуксусная кислота, N-(5-аминопентил)-иминодиуксусная кислота и тому подобное.

### **III.A.1. Якорные фрагменты**

**[0284]** Подходящие якорные фрагменты, способные прикрепить АСО к поверхности ВВ, например, экзосомы, включают, например, стеринны (например, холестерин), липиды, лизофосфолипиды, жирные кислоты или жирорастворимые витамины, как подробно описано ниже.

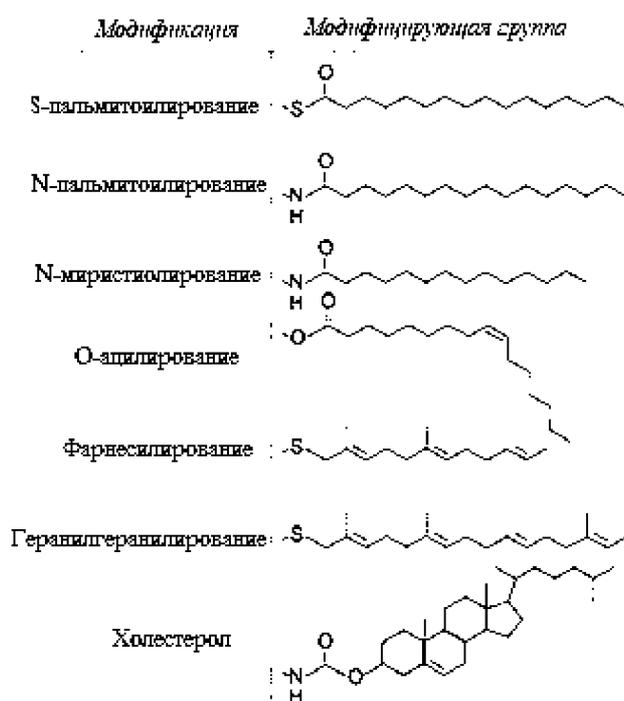
**[0285]** В некоторых аспектах якорный фрагмент может представлять собой липид. Липидный якорный фрагмент может представлять собой любой липид, известный из уровня техники, *например*, пальмитиновую кислоту или гликозилфосфатидилинозитолы. В некоторых аспектах липид представляет собой жирную кислоту, фосфатид, фосфолипид

(например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин) или их аналог (например, фосфатидилхолин, лецитин, фосфатидилэтаноламин, цефалин или их части, например, его частично гидролизованную часть).

**[0286]** Как правило, якорные фрагменты являются химически присоединенными. Однако якорный фрагмент может быть присоединен к АСО ферментативно. В некоторых аспектах возможно присоединение якорного фрагмента к АСО посредством модификации условий клеточной культуры. Например, для использования 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 миристанат, как сообщалось, присоединяется посттрансляционно к внутренним остаткам серина/треонина или тирозина посредством гидроксиэфирной связи.

**[0287]** Якорный фрагмент может быть конъюгирован с АСО непосредственно или опосредованно через комбинацию линкеров в любом химически доступном месте, например, на 5'- и/или 3'-конце АСО. В одном аспекте якорный фрагмент конъюгирован только с 3'-концом АСО. В другом аспекте якорный фрагмент конъюгирован только с 5'-концом АСО. В третьем аспекте якорный фрагмент конъюгирован в месте, которое не является 3'-концом или 5'-концом АСО.

**[0288]** Некоторые типы мембранных якорей, которые могут быть использованы для осуществления способов по настоящему изобретению, представлены в следующей таблице:



**[0289]** В некоторых аспектах якорный фрагмент по настоящему изобретению может включать два или более типов якорных фрагментов, описанных в настоящем документе.

Например, в некоторых аспектах якорный фрагмент может содержать два липида, например, фосфолипид и жирную кислоту, или два фосфолипида, или две жирные кислоты, или липид и витамин, или холестерин и витамин и т.д., которые совместно имеют 6-80 атомов углерода (т.е. эквивалентное число атомов углерода (ЭЧУ) от 6 до 80).

**[0290]** В некоторых аспектах комбинация якорных фрагментов, например, комбинация липидов (например, жирных кислот) имеет ЭЧУ на уровне 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.

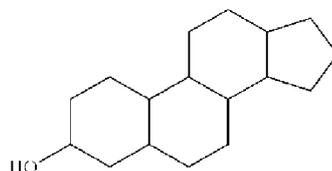
### **III.A.1.a. Холестерин и другие стерины**

**[0291]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стерин, стероид, гопаиноид, гидроксистероид, секостероид или их аналог с липофильными свойствами. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стерин, 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 стерин выбран из эргостерина, 7-дегидрохолестерина, холестерина, 24S-гидроксихолестерина, ланостерина, циклоартенола, фукостерина, сарингостерина, кампестерина,  $\beta$ -ситостерина, ситостанола, копростанола, авенастерина или стигмастерина. Стерины могут встречаться в виде свободных стеринов, ацилированных (сложные эфиры стеринов), алкилированных (стерилалкиловые эфиры), сульфатированных (сульфат стерина) или связанных с гликозидным фрагментом (стерилгликозиды), который сам по себе может быть ацилирован (ацилированные стерингликозиды).

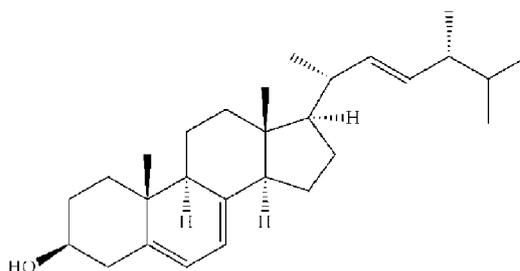
**[0292]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит стероид. В некоторых аспектах стероид выбран из дигидротестостерона, уваола, гецигенина, диосгенина,

прогестерона или кортизола.

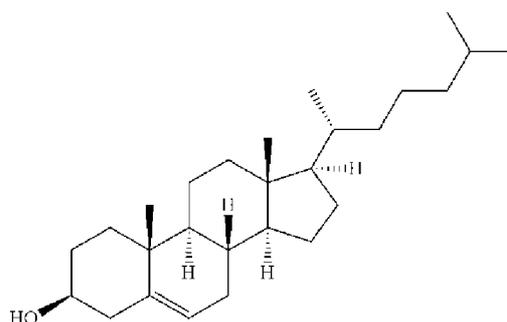
[0293] Например, стерины можно конъюгировать с АСО непосредственно или посредством линкерной комбинации в доступной группе —ОН стерина. Иллюстративные стерины имеют общий скелет, показанный ниже:



[0294] В качестве дополнительно примера: эргостерин имеет следующую структуру:



[0295] Холестерин имеет следующую структуру:



[0296] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления свободная группа —ОН стерина или стероида используется для конъюгирования АСО непосредственно или посредством комбинации линкеров, со стерином (например, холестерином) или стероидом.

### III.A.1.b. Жирные кислоты

[0297] В некоторых аспектах якорный фрагмент представляет собой жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту с короткой, средней или длинной цепью. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой ненасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой мононенасыщенную жирную кислоту. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой полиненасыщенную жирную кислоту, такую как омега-3 или

омега-6 жирная кислота.

**[0298]** В некоторых аспектах липид, например, жирная кислота, имеет цепь C<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>. В некоторых вариантах осуществления липид, например, жирная кислота, имеет цепь C<sub>2</sub>-C<sub>28</sub>. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>. В некоторых аспектах жирная кислота, имеет цепь C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> или C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C<sub>4</sub>-C<sub>40</sub>. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C<sub>4</sub>-C<sub>40</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>38</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>36</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>34</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>32</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>28</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>28</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>26</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>11</sub>-C<sub>13</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>. В некоторых аспектах жирная кислота имеет цепь C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>32</sub>, C<sub>33</sub>, C<sub>34</sub>, C<sub>35</sub>, C<sub>36</sub>, C<sub>37</sub>, C<sub>38</sub>, C<sub>39</sub>, C<sub>40</sub>, C<sub>41</sub>, C<sub>42</sub>, C<sub>43</sub>, C<sub>44</sub>, C<sub>45</sub>, C<sub>46</sub>, C<sub>47</sub>, C<sub>48</sub>, C<sub>49</sub>, C<sub>50</sub>, C<sub>51</sub>, C<sub>52</sub>, C<sub>53</sub>, C<sub>54</sub>, C<sub>55</sub>, C<sub>56</sub>, C<sub>57</sub>, C<sub>58</sub>, C<sub>59</sub> или C<sub>60</sub>.

**[0299]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит две жирные кислоты, каждая из которых независимо выбрана из жирной кислоты, имеющей цепь с любым из вышеуказанных диапазонов или числами атомов углерода. В некоторых аспектах одна из жирных кислот независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C<sub>6</sub>-C<sub>21</sub>, а другая независимо представляет собой жирную кислоту с цепью C<sub>12</sub>-C<sub>36</sub>. В некоторых вариантах осуществления каждая жирная кислота независимо имеет цепь из 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 атомов углерода.

**[0300]** Подходящие жирные кислоты включают насыщенные жирные кислоты с прямой цепью, насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью, ненасыщенные жирные кислоты, гидроксигирные кислоты и поликарбоновые кислоты. В некоторых аспектах такие жирные кислоты содержат до 32 атомов углерода.

**[0301]** 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, арахидиновая кислота, бегеновая кислота, лигноцеридиновая 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.

**[0302]** 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,  $\alpha$ -этилгексановую кислоту,  $\alpha$ -гексилдекановую кислоту,  $\alpha$ -гептилундекановую кислоту, 2-децилтетрадекановую кислоту, 2-ундецилтетрадекановую кислоту, 2-децилпеновую кислоту, 2-ундецилпентадекановую кислоту и кислоту Fine Oxocol 1800 (продукт Nissan Chemical Industries, Ltd.). Подходящие насыщенные жирные кислоты с разветвленной цепью с нечетным числом атомов углерода включают антеизо-жирные кислоты, заканчивающиеся изобутильной группой, такие как 6-метилоктановая кислота, 8-метилдекановая кислота, 10-метилдодекановая кислота, 12-метил-тетрадекановая кислота, 14-метил-гексадекановая кислота, 16-метил-октадекановая кислота, 18-метил-эйкозановая кислота, 20-метил-докозановая кислота, 22-метил-тетракозановая кислота, 24-метил-гексакозановая кислота и 26-метилоктакозановая кислота.

**[0303]** 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,  $\alpha$ -элеостеариновую кислоту,  $\beta$ -элеостеариновую кислоту, пуническую кислоту, 6,9,12,15-октадекатетраеноую кислоту, паринаровую кислоту, 5,8,11,14-эйкозатетраеноую кислоту, 5,8,11,14,17-эйкозапентаеновую кислоту, 7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту, 4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту и т.п.

**[0304]** Примеры подходящих гидроксилауриновых кислот включают  $\alpha$ -гидроксилауриновую кислоту,  $\alpha$ -гидроксимиристиновую кислоту,  $\alpha$ -гидроксипальмитиновую кислоту,  $\alpha$ -гидроксистеариновую кислоту,  $\omega$ -

гидроксилауриновую кислоту,  $\alpha$ -гидроксиарахиновую кислоту, 9-гидрокси-12-октадеценовую кислоту, рицинолевою кислоту,  $\alpha$ -гидроксибегеновую кислоту, 9-гидрокси-транс-10,12-октадекадиеновую кислоту, камоленовую кислоту, ипуроловую кислоту, 9,10-дигидроксистеариновую кислоту, 12-гидроксистеариновую кислоту и т.п.

**[0305]** 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.

**[0306]** 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.

**[0307]** В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из  $\alpha$ -линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, линолевой кислоты, гамма-линолевой кислоты, дигомогамма-линолевой кислоты, арахидиновой кислоты, докозатетрамитолиновой кислоты, пальмолитической кислоты, пауллиновой кислоты, олеиновой кислоты, элаидиновой кислоты, гондоевой кислоты, зурковой кислоты, нервоновой кислоты, мидовой кислоты, адреновой кислоты, босеопентаеновой кислоты, озубондовой кислоты, сардиновой кислоты, сельдевой кислоты, докозагексаеновой кислоты или тетракозанолпентаеновой или другой мононенасыщенной или полинасыщенной жирной кислоты.

**[0308]** В некоторых аспектах одна или обе жирные кислоты представляют собой незаменимую жирную кислоту. Принимая во внимание благоприятное воздействие на здоровье некоторых незаменимых жирных кислот, терапевтические преимущества раскрываемых терапевтически нагруженных экзосом могут быть увеличены путем включения таких жирных кислот в терапевтический агент. В некоторых аспектах незаменимая жирная кислота представляет собой незаменимую жирную кислоту n-6 или n-

3, выбранную из группы, состоящей из линоленовой кислоты, гамма-линоленовой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, адреновой кислоты, докозапентаеновой n-6-кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, 20:4n-3 кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозапентаеновой n-3 кислоты или докозагексаеновой кислоты.

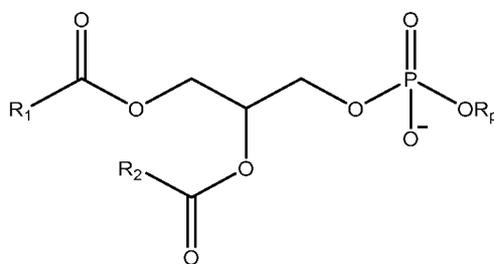
**[0309]** В некоторых аспектах каждая жирная кислота независимо выбрана из полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновой кислоты,  $\alpha$ -линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозатриеновой кислоты, эйкозатетраеновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты (DHA), тетракозапентаеновой кислоты, тетракозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. В других аспектах жирная кислота выбрана из эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты или липоевой кислоты. Другие примеры жирных кислот включают полностью цис-7,10,13-гексадекатриеновую кислоту,  $\alpha$ -линоленовую кислоту (ALA или полностью цис-9,12,15-октадекатриеновую кислоту), стеаридоновую кислоту (STD или полностью цис-6,9,12,15-октадекатетраеновую кислоту), эйкозатриеновую кислоту (ETE или полностью-цис-11,14,17-эйкозатриеновую кислоту), эйкозатетраеновую кислоту (ETA или полностью-цис-8,11,14,17-эйкозатетраеновую кислоту) , эйкозапентаеновую кислоту (EPA), докозапентаеновую кислоту (DPA, клупанодоновую кислоту или полностью цис-7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту), докозагексаеновую кислоту (DHA или полностью цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту), тетракозапентаеновую кислоту (полностью-цис-9,12,15,18,21-докозагексаеновую кислоту) или тетракозагексаеновую кислоту (низиновую кислоту или полностью-цис-6,9,12,15,18,21-тетракозеновую кислоту). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой жирную кислоту со средней длиной цепи, такую как липоевая кислота.

**[0310]** Цепи жирных кислот сильно различаются по длине цепей и могут быть разделены на категории в зависимости от длины цепи, например от короткой до очень длинной. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) представляют собой жирные кислоты с цепями из пяти или менее атомов углерода (например, масляная кислота). В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой SCFA. Жирные кислоты со средней длиной цепи (MCFA) включают жирные кислоты с цепями из 6-12 атомов углерода, которые могут образовывать триглицериды со средней длиной цепи. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой MCFA. Длинноцепочечные жирные кислоты (LCFA) включают жирные кислоты с цепями из 13-21 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой LCFA. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой LCFA. Жирные кислоты с очень длинной цепью (VLCFA) включают

жирные кислоты с цепями из 22 или более атомов углерода, например, 22-60, 22-50 или 22-40 атомов углерода. В некоторых аспектах жирная кислота представляет собой VLCFA.

### III.A.1.c. Фосфолипиды

[0311] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит фосфолипид. Фосфолипиды представляют собой класс липидов, которые являются основным компонентом всех клеточных мембран. Они могут образовывать липидные бислои в результате их амфифильных характеристик. Структура молекулы фосфолипида обычно состоит из двух гидрофобных «хвостов» жирных кислот и гидрофильной «головки», состоящей из фосфатной группы. Например, фосфолипид может представлять собой липид следующей формулы:



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

[0312] Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0313] Конкретные фосфолипиды могут способствовать слиянию с липидным бислоем, например, с липидным бислоем экзосомальной мембраны. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или несколькими отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны. Слияние фосфолипида с мембраной может позволить одному или нескольким элементам липидсодержащей композиции связываться с мембраной или проходить через мембрану.

[0314] 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.

**[0315]** Фосфолипиды, используемые в качестве якорных фрагментов в настоящем изобретении, могут быть природными или неприродными фосфолипидами. Также рассматриваются неприродные виды фосфолипидов, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован или перекрестно-сшит с одним или более алкинами (например, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемой медью циклоприсоединению при воздействии азидов.

**[0316]** Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты.

**[0317]** Примеры фосфолипидов, которые можно использовать в якорных 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.

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 содержат 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 содержат разное количество атомов углерода (например, фрагмент переменной жирной кислоты включает по меньшей мере на два атома углерода больше, чем углеводородная цепь, или по меньшей мере на два атома углерода меньше, чем углеводородная цепь).

**[0318]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид. Симметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

- 1,2-дипропионил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (03:0 PC),
- 1,2-дибутирил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (04:0 PC),
- 1,2-дипентаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (05:0 PC),
- 1,2-дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 PC),
- 1,2-дигептаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 PC),
- 1,2-диоктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 PC),
- 1,2-динонаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 PC),
- 1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (10:0 PC),
- 1,2-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-дилигноцероил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:0 PC),  
1,2-димиристолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 ( $\Delta^9$ -цис) PC),  
1,2-димиристеаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (14:1 ( $\Delta^9$ -транс) PC),  
1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 ( $\Delta^9$ -цис) PC),  
1,2-дипальмителаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (16:1 ( $\Delta^9$ -транс) PC),  
1,2-дипетроселеноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 ( $\Delta^6$ -цис) PC),  
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 ( $\Delta^9$ -цис) PC, DOPC),  
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (18:1 ( $\Delta^9$ -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, DHAPC),  
1,2-динервоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (24:1 (цис) PC),  
1,2-Дигексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (06:0 PE),  
1,2-диооктаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (08:0 PE),  
1,2-дидеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (10:0 PE),  
1,2-дилауроил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (12:0 PE),  
1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (14:0 PE),  
1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (15:0 PE),  
1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:0 PE),  
1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (4ME 16:0 PE),  
1,2-дигептадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (17:0 PE),  
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:0 PE, DSPE),  
1,2-дипальмитолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (16:1 PE),  
1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 ( $\Delta^9$ -цис) PE, DOPe),  
1,2-диелаидоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (18:1 ( $\Delta^9$ -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.

**[0319]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит по меньшей мере один симметричный фосфолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из DLPC, DMPC, DOPC, DPPC, DSPC, DUPC, 18:0 диэфира PC, DLnPC, DAPC, DHAFC, DOPE, 4ME 16:0 PE, DSPE, DLPE, DLnPE, DAPE, DHAPE, DOPG и любой их комбинации.

**[0320]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит по меньшей мере один асимметричный фосфолипид. Асимметричные фосфолипиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из

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

**[0321]** Для обеспечения более заметной устойчивости к нуклеазам, эффективность клеточного поглощения и более заметный эффект РНК-интерференции, фосфатидилэтаноламины могут быть использованы в качестве якорных фрагментов, например, димиристоилфосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтаноламин и диолеоилфосфатидилэтаноламин.

**[0322]** Сайт связывания липида (например, фосфолипида) и комбинации линкера или ВАР, например, АСО, можно подходящим образом выбрать в соответствии с типами липида и линкера или АСО. Любое положение, отличное от гидрофобных групп липида, может быть связано с линкером или АСО посредством химической связи. Например, при использовании фосфатидилэтаноламина связь может быть образована путем образования амидной связи и т.д. между аминогруппой фосфатидилэтаноламина и линкером или АСО. При использовании фосфатидилглицерина связь может быть осуществлена путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка глицерина и линкером или АСО. При использовании фосфатидилсерина связь может быть образована путем образования амидной связи или сложноэфирной связи и т.д. между аминогруппой или карбоксильной группой остатка серина и линкером или АСО. При использовании фосфатидной кислоты связь может быть образована путем образования фосфоэфирной связи и т.д. между фосфатным остатком и линкером или АСО. При использовании фосфатидилинозитола связь может быть осуществлена путем образования сложноэфирной связи, простой эфирной связи и т.д. между гидроксильной группой остатка инозитола и линкером или АСО.

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

**[0323]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит лизолипид, например, лизофосфолипид. Лизолипиды представляют собой производные липида, в котором одна или обе жирные ацильные цепи удалены, как правило, путем гидролиза. Лизофосфолипиды представляют собой производные фосфолипидов, в которых одна или обе жирные

ацильные цепи удалены путем гидролиза.

**[0324]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит любой из фосфолипидов, описанных выше, в которых одна или обе ацильные цепи были удалены путем гидролиза, и, следовательно, полученный лизофосфолипид содержит одну ацильную цепь жирной кислоты или не содержит ее.

**[0325]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит лизоглицерофосфолипид, лизогликофинголипид, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилинозитол или лизофосфатидилсерин.

**[0326]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит лизолипид, выбранный из неограничивающей группы, состоящей из

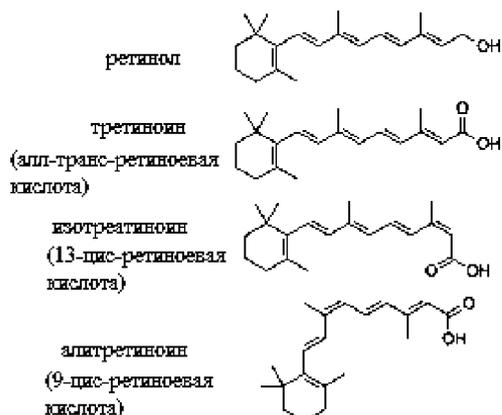
1-гексаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (06:0 лизо PC),  
1-гептаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (07:0 лизо PC),  
1-октаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (08:0 лизо PC),  
1-нонаноил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (09:0 лизо PC),  
1-деканоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина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

### **III.A.1.e. Витамины**

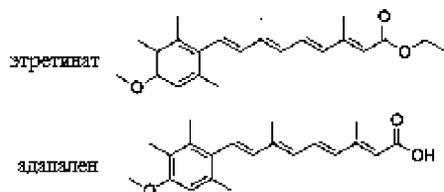
**[0327]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит липофильный витамин, например, фолиевую кислоту, витамин А, витамин Е или витамин К

**[0328]** В некоторых аспектах якорный 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 якорный фрагмент содержит ретинол. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит ретиноид. Ретиноиды представляют собой класс химических соединений, которые являются витаминами витамина А или химически связаны с ним. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит ретиноид первого поколения (например, ретинол, третиноин, изотреатиноин или алитретиноин), ретиноид второго поколения (например, этретинат или ацитретин), ретиноид третьего поколения (например, адапален, бексаротен, или тазаротен) или любую их комбинацию.

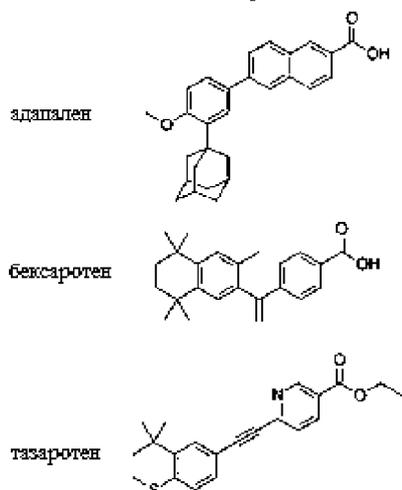
**Ретиноиды первого поколения**



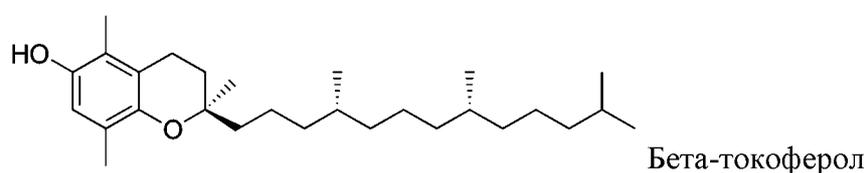
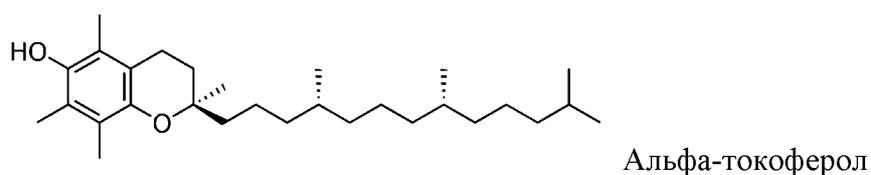
**Ретиноиды второго поколения**

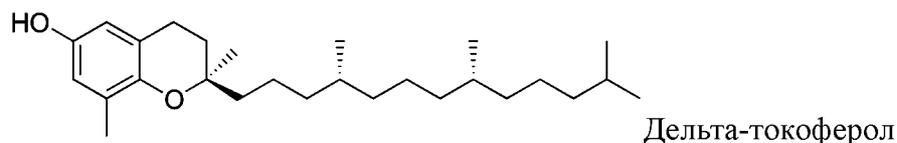
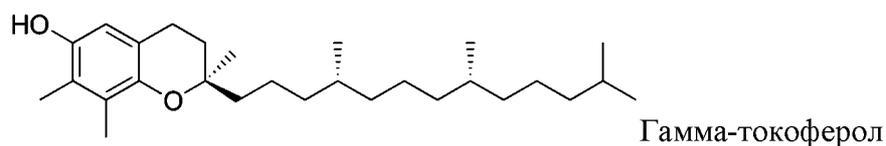


**Ретиноиды третьего поколения**

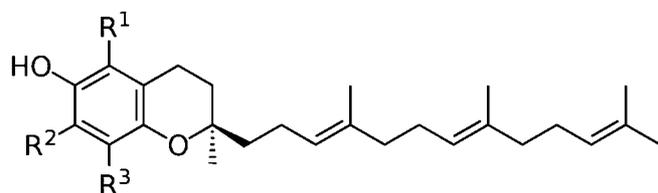


[0329] В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин Е. Токоферолы представляют собой класс метилированных фенолов, многие из которых обладают активностью витамина Е. Таким образом, в некоторых аспектах якорный фрагмент содержит альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол или их комбинацию.





**[0330]** Токотриенолы также обладают активностью витамина Е. Критическое химическое структурное различие между токотриенолами и токоферолами состоит в том, что токотриенолы имеют ненасыщенную изопреноидную боковую цепь с тремя углерод-углеродными двойными связями по сравнению с насыщенными боковыми цепями токоферолов. В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит альфа-токотриенол, бета-токотриенол, гамма-токотриенол, дельта-токотриенол или их комбинацию. Токотриенолы могут быть представлены следующей формулой



альфа( $\alpha$ )-Токотриенол: R1 = Me, R2 = Me, R3 = Me;

бета( $\beta$ )-Токотриенол: R1 = Me, R2 = H, R3 = Me;

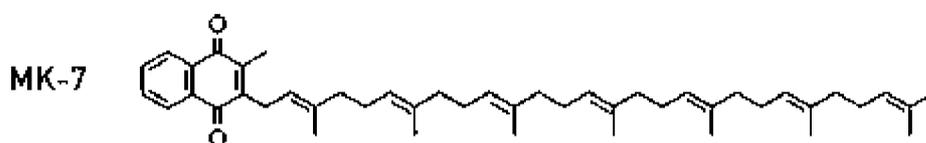
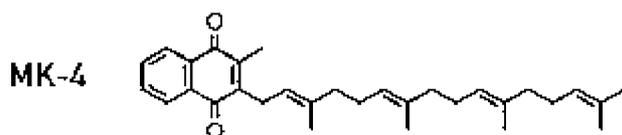
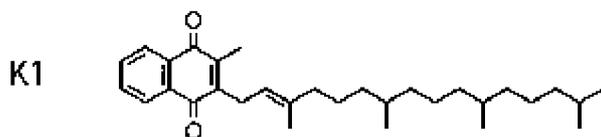
гамма( $\gamma$ )-Токотриенол: R1 = H, R2 = Me, R3 = Me;

дельта( $\delta$ )-Токотриенол: R1 = H, R2 = H, R3 = Me.

**[0331]** В некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин К. Химически семейство витаминов К включает производные 2-метил-1,4-нафтохинона (3-). Витамин К включает два натуральных витамина: витамин К<sub>1</sub> и витамин К<sub>2</sub>. В структуре витамина К<sub>1</sub> (также известного как фитонадион, филлохинон или (Е)-фитонадион) присутствует фитильная группа. Структуры витамина К<sub>2</sub> (менахиноны) отмечены полиизопренильной боковой цепью, присутствующей в молекуле, которая может содержать от шести до 13 изопренильных единиц. Таким образом, витамин К<sub>2</sub> 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 К<sub>2</sub>. Формы с длинной цепью, такие как МК-7, МК-8 и МК-9, преобладают в ферментированных продуктах. Формы витамина К<sub>2</sub> 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 К<sub>3</sub> (менадион; 2-метилнафталин-1,4-

дион), витамин К<sub>4</sub> и витамин К<sub>5</sub>.

[0332] Соответственно, в некоторых аспектах якорный фрагмент содержит витамин К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub> (например, МК-4, МК-5, МК-6, МК-7, МК-8, МК-9, МК-10, МК-11, МК-12 или МК-13), К<sub>3</sub>, К<sub>4</sub>, К<sub>5</sub> или любую их комбинацию.



### III.A.2. Комбинации линкеров

[0333] В некоторых аспектах АСО связан с гидрофобным мембранным якорным фрагментом, описанным в настоящем документе, через комбинацию линкеров, которая может включать любую комбинацию расщепляемых и/или нерасщепляемых линкеров. Основная функция комбинации линкеров заключается в обеспечении оптимального расстояния между якорным фрагментом или фрагментами и целевой БАМ. Например, в случае с АСО комбинация линкеров должна уменьшать стерические препятствия и позиционировать АСО таким образом, чтобы он мог взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой, например, мРНК или миРНК.

[0334] Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы. Таким образом, в некоторых аспектах комбинация линкеров, описанная в данном документе, может содержать расщепляемый линкер. Такие расщепляемые линкеры могут быть чувствительны, например, к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых биологически активная молекула остается активной. В качестве альтернативы линкеры могут быть по сути устойчивыми к расщеплению («нерасщепляемый линкер»). В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит спейсер. В некоторых аспектах

спейсер представляет собой ПЭГ.

**[0335]** 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).

**[0336]** В некоторых аспектах линкер представляет собой прямую связь между якорным фрагментом и БАМ, например, АСО.

### **III.A.2.a. Нерасщепляемые линкеры**

**[0337]** 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 раскрытию (например, биологически активную молекулу и якорный фрагмент; биологически активную молекулу и расщепляемый линкер; якорный 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 кислотному-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи.

**[0338]** 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.

**[0339]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит нерасщепляемый линкер, содержащий, например, тетраэтиленгликоль (ТЭГ), гексаэтиленгликоль (ГЭГ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сукцинимид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер содержит спейсерную единицу для связывания биологически активной молекулы с нерасщепляемым линкером.

**[0340]** В некоторых аспектах один или несколько нерасщепляемых линкеров содержат более мелкие единицы (например, ГЭГ, ТЭГ, глицерин, С2-С12-алкил и т.п.), связанные вместе. В одном аспекте связь представляет собой сложноэфирную связь (например, сложный эфир фосфодиэфира или фосфоротиоата) или другую связь.

### **Ш.А.2.в. Этиленгликоли (ГЭГ, ТЭГ, ПЭГ)**

**[0341]** В некоторых аспектах комбинация линкеров представляет собой нерасщепляемый линкер, при этом нерасщепляемый линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), характеризуемый формулой  $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-$  или  $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$ , при этом  $R^3$  представляет собой водород, метил или этил, а  $n$  имеет значение от 2 до 200. В некоторых аспектах линкер содержит спейсер, при этом спейсер представляет собой ПЭГ.

**[0342]** В некоторых аспектах линкер ПЭГ представляет собой линкер на основе олигоэтиленгликоля, например, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, тетраэтиленгликоля (ТЭГ), пентаэтиленгликоля или гексаэтиленгликоля (ГЭГ).

**[0343]** 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.

**[0344]** 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.

**[0345]** В некоторых конкретных аспектах  $n$  имеет значение от 3 до 200, от 3 до 20, от 10 до 30 или от 9 до 45.

**[0346]** В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой разветвленный ПЭГ. Разветвленные ПЭГ содержат от трех до десяти цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра.

**[0347]** В определенных вариантах осуществления фрагмент ПЭГ представляет

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

**[0348]** В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой звездчатый ПЭГ. Звездчатые ПЭГ содержат от 10 до 100 цепей ПЭГ, исходящих из центральной группы ядра.

**[0349]** В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой гребенчатый ПЭГ. Гребенчатые ПЭГ имеют несколько цепей ПЭГ, обычно привитых к остову полимера.

**[0350]** В определенных аспектах ПЭГ имеет молярную массу от 100 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 100 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 100 г/моль до 2000 г/моль. В определенных аспектах ПЭГ имеет молярную массу от 200 г/моль до 3000 г/моль, в частности, от 300 г/моль до 2500 г/моль, более конкретно от примерно 400 г/моль до 2000 г/моль.

**[0351]** В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой PEG<sub>100</sub>, PEG<sub>200</sub>, PEG<sub>300</sub>, PEG<sub>400</sub>, PEG<sub>500</sub>, PEG<sub>600</sub>, PEG<sub>700</sub>, PEG<sub>800</sub>, PEG<sub>900</sub>, PEG<sub>1000</sub>, PEG<sub>1100</sub>, PEG<sub>1200</sub>, PEG<sub>1300</sub>, PEG<sub>1400</sub>, PEG<sub>1500</sub>, PEG<sub>1600</sub>, PEG<sub>1700</sub>, PEG<sub>1800</sub>, PEG<sub>1900</sub>, PEG<sub>2000</sub>, PEG<sub>2100</sub>, PEG<sub>2200</sub>, PEG<sub>2300</sub>, PEG<sub>2400</sub>, PEG<sub>2500</sub>, PEG<sub>1600</sub>, PEG<sub>1700</sub>, PEG<sub>1800</sub>, PEG<sub>1900</sub>, PEG<sub>2000</sub>, PEG<sub>2100</sub>, PEG<sub>2200</sub>, PEG<sub>2300</sub>, PEG<sub>2400</sub>, PEG<sub>2500</sub>, PEG<sub>2600</sub>, PEG<sub>2700</sub>, PEG<sub>2800</sub>, PEG<sub>2900</sub> или PEG<sub>3000</sub>. В одном конкретном аспекте ПЭГ представляет собой PEG<sub>400</sub>. В другом конкретном аспекте ПЭГ представляет собой PEG<sub>2000</sub>.

**[0352]** В некоторых аспектах комбинация линкеров по настоящему изобретению может содержать несколько линкеров на основе ПЭГ, например, расщепляемый линкер, фланкированный линкерами на основе ПЭГ, ГЭГ или ТЭГ.

**[0353]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит (ГЭГ)<sub>n</sub> и/или (ТЭГ)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством линкера на основе сложного эфира фосфорной кислоты, связи сложного эфира фосфоротиоата или их сочетания.

### **III.A.2.c. Глицерин и полиглицерины (ПГ)**

**[0354]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит нерасщепляемый линкер, содержащий глицериновую единицу или полиглицерин (PG), описываемую формулой ((R<sub>3</sub>—O—(CH<sub>2</sub>—CHОН—CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>—), где R<sub>3</sub> 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.

**[0355]** В некоторых аспектах линкер на основе PG представляет собой линкер на основе диглицерина, триглицерина, тетраглицерина (TG), пентаглицерина или гексаглицерина (HG).

**[0356]** 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.

**[0357]** 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.

**[0358]** 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  $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$  и  $R^3$  представляет собой водород, метил или этил. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой гиперразветвленный полиглицерин, описываемый формулой  $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$ , при этом  $R^5$  представляет собой водород или цепь глицерина, описываемую формулой  $(R^3-O-(CH_2-CHOR^6-CH_2-O)_n-)$ , при этом  $R^6$  представляет собой водород или цепь глицерина, описываемую формулой  $(R^3-O-(CH_2-CHOR^7-CH_2-O)_n-)$ , при этом  $R^7$  представляет собой водород или линейную цепь глицерина, описываемую формулой  $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$  и  $R^3$  представляет собой водород, метил или этил. Гиперразветвленный глицерин и способы его синтеза описаны в Oudshorn et al. (2006) *Biomaterials* 27:5471-5479; Wilms et al. (2010) *Acc. Chem. Res.* 43, 129-41 и литературных источниках, цитируемые в данном документе.

**[0359]** 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.

**[0360]** В некоторых аспектах PG представляет собой PG<sub>100</sub>, PG<sub>200</sub>, PG<sub>300</sub>, PG<sub>400</sub>, PG<sub>500</sub>, PG<sub>600</sub>, PG<sub>700</sub>, PG<sub>800</sub>, PG<sub>900</sub>, PG<sub>1000</sub>, PG<sub>1100</sub>, PG<sub>1200</sub>, PG<sub>1300</sub>, PG<sub>1400</sub>, PG<sub>1500</sub>, PG<sub>1600</sub>, PG<sub>1700</sub>, PG<sub>1800</sub>, PG<sub>1900</sub>, PG<sub>2000</sub>, PG<sub>2100</sub>, PG<sub>2200</sub>, PG<sub>2300</sub>, PG<sub>2400</sub>, PG<sub>2500</sub>, PG<sub>1600</sub>, PG<sub>1700</sub>, PG<sub>1800</sub>, PG<sub>1900</sub>, PG<sub>2000</sub>, PG<sub>2100</sub>, PG<sub>2200</sub>, PG<sub>2300</sub>, PG<sub>2400</sub>, PG<sub>2500</sub>, PG<sub>2600</sub>, PG<sub>2700</sub>, PG<sub>2800</sub>, PG<sub>2900</sub> или PG<sub>3000</sub>. В одном конкретном аспекте PG представляет собой PG<sub>400</sub>. В другом конкретном аспекте PG представляет собой PG<sub>2000</sub>.

**[0361]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит (глицерин)<sub>n</sub> и/или (HG)<sub>n</sub> и/или (TG)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число от 1 до 50, и каждая единица связана, например, посредством линкера на основе сложного эфира фосфорной кислоты, связи сложного эфира фосфоротиоата или их сочетания.

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

**[0362]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит по меньшей мере один алифатический (алкильный) линкер, например, пропил, бутил, гексил или C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкил, такой как C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкил или C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкил.

**[0363]** В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит алкильную цепь, например, незамещенный алкил. В некоторых аспектах комбинация линкеров содержит замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкенилилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил или алкенилгетероциклилалкенил.

**[0364]** Необязательно эти компоненты могут быть заменены. Заместители включают спирт, алкокси (такой как метокси, этокси и пропокси), алкил с прямой или разветвленной цепью (такой как C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил), амин, аминоалкил (такой как амино C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 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, сульфонилгалогенид, имидатный эфир, изоцианат, изотиоцианат, галоформиат, карбодуимидный аддукт, альдегиды, кетон, сульфгидрил, галогенацетил, алкилгалогенид, алкилсульфонат,  $C(=O)CH=CHC(=O)$  (малеимид), тиоэфир, циано, сахар (такой как, манноза, галактоза и глюкоза),  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный карбонил, алкилртутиевый или  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный сульфен.

**[0365]** 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*, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 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 многовалентные 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.

**[0366]** Термин «алкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную (бирадикальную) алкильную группу, в которой алкил определен в данном документе. Примером «алкилена» является, но не ограничиваясь им,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ . Обычно «алкиленовая» группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, например, 10 или меньше атомов углерода (*например*, от 1 до 8 или от 1 до 6 атомов углерода). Группа «низший алкилен» представляет собой группу алкилена, содержащую от 1 до 4 атомов углерода.

**[0367]** 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.

**[0368]** Термин «алкинил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к ненасыщенному или полиненасыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 2 до 24 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Типичная «алкинильная» группа имеет от 2 до 10 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. В одном аспекте настоящего изобретения алкинильные группы содержат от 2 до 6 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь. Примеры алкинильных групп включают проп-1-инил, проп-2-инил (*т.е.* пропаргил), этинил и 3-бутинил.

**[0369]** 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.

**[0370]** 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*, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> или C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 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 (гетероатомы) помещен/помещены в любое внутреннее положение гетероалкильной группы. Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваясь ими, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=N-OCH<sub>3</sub> и -CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>. До двух гетероатомов могут быть последовательными, например, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> и -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

**[0371]** Аналогично термин «гетероалкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как проиллюстрировано, но без ограничения ими, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-. 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.

**[0372]** 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<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкил или C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкил). Примеры циклоалкила включают, но без ограничения ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Термин «циклоалкил» также включает мостиковые, полициклические (*например*, бициклические) структуры, такие как норборнил, адамантил и бицикло[2.2.1]гептил. «Циклоалкильная» группа может быть конденсирована по меньшей мере с одним (*например*, от 1 до 3) другим кольцом, выбранным из арильного (*например*, фенильного), гетероарильного (*например*, пиридинного) и неароматического (*например*, карбоциклического или гетероциклического) колец. Когда «циклоалкильная» группа включает конденсированное арильное, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, тогда «циклоалкильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством карбоциклического кольца.

**[0373]** 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.

**[0374]** Типичные гетероциклоалкильные или гетероциклические группы по настоящему изобретению включают морфолинил, тиоморфолинил, тиоморфолинил S-оксид, тиоморфолинил S,S-диоксид, пиперазинил, гомопиперазинил, пирролидинил, пирролинил, имидазолидинил, тетрагидропиранил, пиперидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пиперидинил, гомопиперидинил, гомоморфолинил, гомотиоморфолинил, гомотиоморфолинил S,S-диоксид, оксазолидинонил, дигидропиразолил, дигидропирролил, дигидропиразолил, дигидропиридил,

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

**[0375]** 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.

**[0376]** 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.

**[0377]** 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 арилоксигруппы в одном варианте осуществления представляет собой фенил.

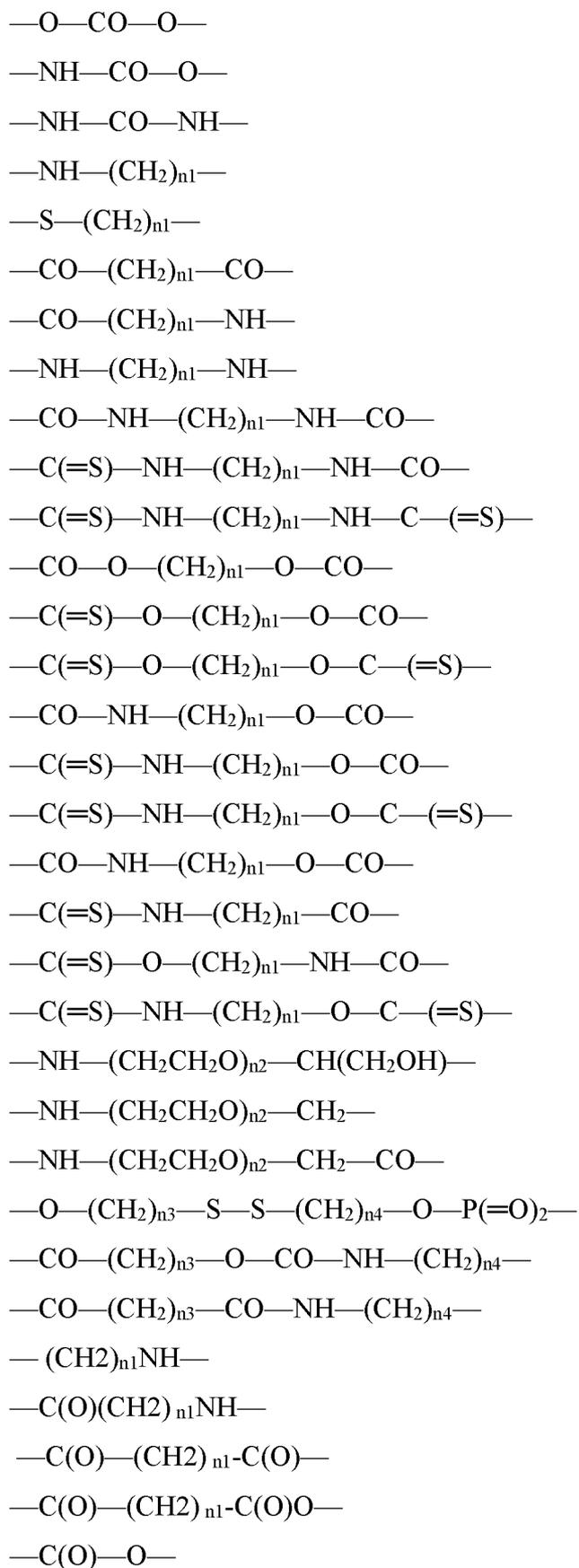
**[0378]** Термин «гетероарильный» или «гетероароматический» относится к полиненасыщенному, 5-, 6- или 7-членному ароматическому фрагменту, содержащему по меньшей мере один гетероатом (*например*, от 1 до 5 гетероатомов, таких как 1-3 гетероатома), выбранных из N, O, S, Si и B (например, N, O и S), где 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

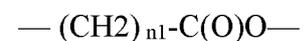
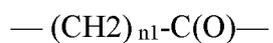
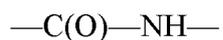
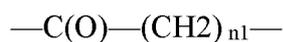
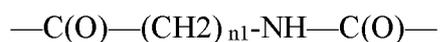
«гетероарильная» группа содержит конденсированное арильное, циклоалкильное или гетероциклоалкильное кольцо, тогда «гетероарильная» группа присоединяется к остальной части молекулы посредством гетероарильного кольца. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы посредством атома углерода или гетероатома.

**[0379]** В одном примере гетероарильная группа имеет от 4 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из O, S и N. Неограничивающие примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиримидинил, хинолинил, бензотиенил, индолил, индолинил, пиридазинил, пиразинил, изоиндолил, изохинолил, хиназолинил, хиноксалинил, фталазинил, имидазолил, изоксазолил, пиразолил, оксазолил, тиазолил, индолизинил, индазолил, бензотиазолил, бензимидазолил, бензофуранил, фуранил, тиенил, пирролил, оксадиазолил, тиадиазолил, триазолил, тетразолил, изотиазолил, нафтиридинил, изохроманил, хроманил, тетрагидроизохинолинил, изоиндолинил, изобензотетрагидрофуранил, изобензотетрагидротииенил, изобензотиенил, бензоксазолил, пиридопиридил, бензотетрагидрофуранил, бензотетрагидротииенил, пуринил, бензодиоксолил, триазинил, птеридинил, бензотиазолил, имидазопиридил, имидазотиазолил, дигидробензизоксазинил, бензизоксазинил, бензоксазинил, дигидробензизотиазинил, бензопиранил, бензотиопиранил, хромонил, хроманонил, пиридил-N-оксид, тетрагидрохинолинил, дигидрохинолинил, дигидрохинолинонил, дигидроизохинолинонил, дигидрокумаринил, дигидроизокумаринил, изоиндолинонил, бензодиоксанил, бензоксазолинонил, пирролил N-оксид, пиримидинил N-оксид, пиридазинил N-оксид, пиразинил N-оксид, хинолинил N-оксид, индолил N-оксид, индолинил N-оксид, изохинолил N-оксид, хиназолинил N-оксид, хиноксалинил N-оксид, фталазинил N-оксид, имидазолил N-оксид, изоксазолил N-оксид, оксазолил N-оксид, тиазолил N-оксид, индолизинил N-оксид, индазолил N-оксид, бензотиазолил N-оксид, бензимидазолил N-оксид, пирролил N-оксид, оксадиазолил N-оксид, тиадиазолил N-оксид, триазолил N-оксид, тетразолил N-оксид, бензотиопиранил S-оксид, бензотиопиранил S,S-диоксид. Иллюстративные гетероарильные группы включают имидазолил, пиразолил, тиадиазолил, триазолил, изоксазолил, изотиазолил, имидазолил, тиазолил, оксадиазолил и пиридил. Другие иллюстративные гетероарильные группы включают 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, пиридин-4-ил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из вышеупомянутых

арильных и гетероарильных кольцевых систем выбраны из группы приемлемых заместителей арильной группы, описанной ниже.

**[0380]** Примеры алифатических линкеров включают следующие структуры:





$n_1$  - целое число от 1 до 40 (например, от 2 до 20 или от 2 до 12);  $n_2$  - 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 представляют собой целое число от 1 до 20 (например, от 1 до 10 или от 1 до 6).

**[0381]** 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 линкера на основе сложного фосфатного эфира, связи на основе сложного эфира фосфоротиоата или их комбинации.

### III.A.3. Расщепляемые линкеры

**[0382]** В некоторых аспектах различные компоненты описанного в настоящем документе АСО могут быть соединены расщепляемым линкером. 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.

**[0383]** В некоторых аспектах термин «расщепляемый» в контексте данного документа относится, например, к быстро разлагаемым линкерам, таким как, например, фосфодиэфир и дисульфиды, тогда как термин «нерасщепляемый» относится, например, к более стабильным связям, таким как, например, устойчивые к нуклеазам фосфоротиоаты.

**[0384]** В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой динуклеотидный или тринуклеотидный линкер, дисульфид, имин, тиокеталь, дипептид val-

cit или любую их комбинацию.

[0385] В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

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

[0386] В некоторых аспектах комбинация линкеров включает редокс-расщепляемый линкер. В качестве неограничивающего примера одним типом расщепляемого линкера является редокс-расщепляемая связывающая группа, которая расщепляется при восстановлении или при окислении.

[0387] В некоторых аспектах редокс-расщепляемый линкер содержит дисульфидную связь, т.е. он представляет собой расщепляемый дисульфидом линкер.

[0388] Редокс-расщепляемые линкеры могут быть восстановлены, например, внутриклеточными меркаптанами, оксидазами или редуктазами.

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

[0389] В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать расщепляемый линкер, который может расщепляться реактивными формами кислорода (ROS), такими как супероксид (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) или пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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**

[0390] В некоторых аспектах линкер представляет собой «кислотолабильный линкер», содержащий расщепляемую кислотой связывающую группу, которая представляет собой связывающую группу, которая селективно расщепляется в кислых условиях (pH < 7).

[0391] В качестве неограничивающего примера расщепляемая кислотой связывающая группа отщепляется в кислой среде, например, около 6,0, 5,5, 5,0 или меньше. В некоторых аспектах pH составляет около 6,5 или меньше. В некоторых аспектах линкер

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

**[0392]** Расщепляемая кислотой группа может иметь общую формулу  $-C=NN-$ , C (O) O или  $-OC(O)$ . В другом неограничивающем примере углерод, присоединенный к сложноэфирному кислороду (алкоксигруппе), присоединен к арильной группе, замещенной алкильной группой или третичной алкильной группой, такой как, например, диметилпентил или трет-бутил. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваясь ими, амин, имин, сложный аминоэфир, бензойный имин, диортоэфир, полифосфоэфир, полифосфазен, ацеталь, виниловый эфир, гидразон, цис-аконитат, гидразид, тиокарбамоил, имизин, азидометилметилмалеиновый ангидрид, тиопропионат, замаскированный эндосомолитический агент, цитраконильную группу или любую их комбинацию. Дисульфидные связи также чувствительны к pH.

**[0393]** 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.

**[0394]** В некоторых 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 около 4) с образованием диола и кетона; ацетали, которые в кислой среде (например, при pH менее 7, более около 4) лабильны с образованием диола и альдегида; имины или иминий, которые лабильны в кислой среде (например, при pH менее 7, более около 4) с образованием амина и альдегида или кетона; связи кремний-кислород-углерод, неустойчивые в кислых условиях; кремний-азотные (силазановые) связи; кремний-углеродные связи (например, арилсиланы, винилсиланы и аллилсиланы); малеаматы (амидные связи, синтезированные из производных малеинового ангидрида и

аминов); ортоэфиры; гидразоны; активированные производные карбоновой кислоты (например, сложные эфиры, амиды), предназначенные для кислотно-катализируемого гидролиза); или виниловые эфиры.

**[0395]** Дополнительные примеры можно найти в патентах США No. №№ 9790494B2 и 8137695B2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### **III.A.3.d. Ферментативные расщепляемые линкеры**

**[0396]** 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. Линкеры, расщепляемые протеазой**

**[0397]** В некоторых аспектах комбинация линкеров включает линкер, расщепляемый протеазой, т.е. линкер, который может расщепляться эндогенной протеазой. Только определенные пептиды легко расщепляются внутри или за пределами клеток. См., например, Trout et al., 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -аминокислотной группой лизина, считаются непептидными связями и считаются нерасщепляемыми.

**[0398]** 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 С-эндопептидаз, проколлагеновых N-эндопептидаз, металлопротеиназ ADAM и ADAMT, миелинассоциированных металлопротеиназ, энамелизина, фактор некроза опухоли  $\alpha$ -конвертирующего фермента, инсулизина, нардилизина, митохондриальной процессинговой пептидазф, магнолизина, дактилизин-подобных металлопротеиназ, нейтрофильной коллагеназы, матриксных металлопептидаз, матриксных металлопротеиназ мембранного типа, эндопептидазы SP2, простатоспецифического антигена (PSA), плазмина, урокиназы, белка активации фибробластов человека (FAP $\alpha$ ), трипсина, химотрипсинов, кальдекрина, панкреатических эластаз, панкреатической эндопептидазы, энтеропептидазы, лейкоцитарной эластазы, миелобластов, химазы, триптазы, гранзима, химотриптического фермента рогового слоя, акрозина, калликреинов, компонентов и факторов комплемента, конвертазы c3/c5 альтернативного пути комплемента, сериновой протеазы, ассоциированной с маннозо-связывающим белком, факторов коагуляции, тромбина, протеина с, активатора плазминогена u и t, катепсина G, гепсина, простаина, эндопептидазы, активирующей фактор роста гепатоцитов, пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа, фурина, пропротеинконвертаз, пролилпептидаз, ациламиноацилпептидазы, пептидилгликаминазы, сигнальной пептидазы, n-концевых нуклеофильных аминогидролаз, 20s протеасомы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, митохондриальной эндопептидазы, митохондриальной эндопептидазы Ia, htra2-пептидазы, матриптазы, протеазы сайта 1, легумаина, катепсинов, цистеиновых катепсинов, кальпаинов, убиквитинизопептидазы T, каспаз, гликозилфосфатидилинозитолпротеинтрансмидазы, прокоагулянта рака, прогормона тиолпротеазы,  $\gamma$ -глутамилгидролазы, блеомицингидролазы, сепразы, катепсина B, катепсина D, катепсина L, катепсина M, протеиназы K, пепсинов, химозина, гастриксина, ренина, япсина и/или карпинов, простатоспецифического антигена (PSA) или любой протеазы Asp-N, Glu- C, Lys-C или Arg-C в целом. См., *например*, Cancer Res. 77(24):7027-7037 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[0399]** 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.

**[0400]** 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.

**[0401]** 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.

**[0402]** 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. Линкеры, расщепляемые эстеразой**

**[0403]** Некоторые линкеры расщепляются эстеразами («линкеры, расщепляемые эстеразой»). Только определенные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами и амидазами, присутствующими внутри или вне клеток. Сложные эфиры образуются при конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с простыми спиртами, такими как алифатические спирты, а также с малыми циклическими и малыми ароматическими спиртами. Примеры расщепляемых связующих групп на основе сложных эфиров включают, но без ограничения ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемая сложным эфиром связывающая группа имеет общую формулу -C (O) O- или -OC (O)-.

### **III.A.3.g. Линкеры, расщепляемые фосфатазой**

**[0404]** 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<sub>k</sub>) —O—, —O—P (S) (OR<sub>k</sub>) —O—, —O—P (S) (SR<sub>k</sub>) —O—, —O—P (O) (OR<sub>k</sub>) —O—, —O—P (O) (OR<sub>k</sub>) —S—, —S—P (O) (OR<sub>k</sub>) —S—, —O—P (S) (OR<sub>k</sub>) —S—, —SP (S) (OR<sub>k</sub>) —O—, —OP (O) (R<sub>k</sub>) —O—, —OP (S) (R<sub>k</sub>) —O—, —SP (O) (R<sub>k</sub>) —O—, —SP (S) (R<sub>k</sub>) —O—, —SP (O) (R<sub>k</sub>) —S— или —OP (S) (R<sub>k</sub>) —S—.

**[0405]** В различных аспектах R<sub>k</sub> является любым из следующего: NH<sub>2</sub>, BH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>6-10</sub> арил, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>6-10</sub> арил-окси. В некоторых аспектах C<sub>1-6</sub> алкил и C<sub>6-10</sub> 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. Фотоактивированные расщепляемые линкеры**

**[0406]** В некоторых аспектах комбинация линкеров включает фотоактивированный расщепляемый линкер, например, нитробензильный линкер или линкер, содержащий нитробензильную реактивную группу.

### **III.A.3.i. Саморасщепляющийся линкер**

**[0407]** 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 линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер в ВВ (*например*, экзосоме) по настоящему изобретению подвергается 1,6-элиминированию после ферментативного расщепления линкера, расщепляемого протеазой. В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер представляет собой, например, производное п-аминобензила (pAB), такое как п-аминобензилкарбамат (pABC), пара-аминобензиловый эфир (PABE), пара-аминобензилкарбонат или их комбинацию.

**[0408]** 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, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NO<sup>3+</sup>, NHCOCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCOCF<sub>3</sub>, алкила, галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 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, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NO<sup>3+</sup>, NHCOCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCOCF<sub>3</sub>, алкила, галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилгалида, карбоксилата, сульфата, сульфамата и сульфоната.

**[0409]** В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер содержит аминобензилкарбаматную группу (например, пара-аминобензилкарбамат), аминобензилэфирную группу или аминобензилкарбонатную группу. В одном аспекте саморасщепляющийся линкер представляет собой пара-аминобензилкарбамат (pABC).

**[0410]** pABC является наиболее эффективной и распространенной соединительной связью для саморасщепляющейся сайт-специфической активации пролекарств (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)).

**[0411]** В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер соединяет биологически активную молекулу (например, ACO) с расщепляемым протеазой субстратом (например, Val-Cit). В конкретных аспектах карбаматная группа саморасщепляющегося линкера pABC присоединена к аминогруппе биологически активной молекулы (например, ACO), а аминогруппа саморасщепляющегося линкера pABC связана с расщепляемым протеазой субстратом.

**[0412]** Ароматическое кольцо аминобензильной группы необязательно может быть замещено одним или несколькими (например, R<sub>1</sub> и/или R<sub>2</sub>) 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<sub>x</sub>» (например, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>) представляет собой общее сокращение, обозначающее группу заместителей, как описано в данном документе.

**[0413]** Замещающие группы могут улучшить способность п-аминобензильной группы к саморасщеплению (Hay *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:2759-2770 (1999); см. также, Sykes *et al.* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:1601-1608 (2000)).

**[0414]** Саморасщепление может происходить, например, посредством 1,4-элиминирования, 1,6-элиминирования (например, pABC), 1,8-элиминирования (например, пара-аминоциннамиловый спирт),  $\beta$ -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).

**[0415]** 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). Из уровня техники известны многочисленные гомоароматические группы (см., *например*, Carl *et al.* J. Med. Chem. 24:479 (1981); Senter *et al.* J. Org. Chem. 55:2975 (1990); Taylor *et al.* J. Org. Chem. 43:1197 (1978); Andrianomenjanahary *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 2:1903 (1992)), и кумарин (см., *например*, Weinstein *et al.* Chem. Commun. 46:553 (2010)), фуран, тиофен, тиазол, оксазол, изоксазол, пиррол, пиразол (см., *например*, Hay *et al.* J. Med. Chem. 46:5533 (2003)), пиридин (см., *например*, Perry-Feigenbaum *et al.* Org. Biomol. Chem. 7:4825 (2009)), имидазон (см., *например*, Nailor *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 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. См. также патенты США №№ 7691962; 7091186; патентные публикации США №№ US2006/0269480; US2010/0092496; US2010/0145036; US2003/0130189; US2005/0256030)

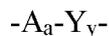
**[0416]** В некоторых аспектах комбинация линкеров, описанная в данном документе, содержит более одного саморасщепляющегося линкера в тандеме, *например*, две или более единиц рABC. См., *например*, de Groot *et al.* J. Org. Chem. 66:8815-8830 (2001). В некоторых аспектах комбинация линкеров может содержать 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)).

**[0417]** Если группы заместителей в саморасщепляющихся линкерах определены их общепринятыми химическими формулами, записанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые возникли бы в результате написания структуры справа налево. Например, «-CH<sub>2</sub>O-» также означает «-OCH<sub>2</sub>-».

**[0418]** Группы заместителей в саморасщепляющемся линкере, например, заместители R<sub>1</sub> и/или R<sub>2</sub> в пара-аминобензиловом 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

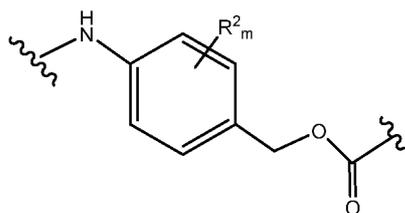
заместителя, тогда каждый из заместителей выбран независимо.

**[0419]** В некоторых конкретных аспектах саморасщепляющийся линкер присоединен к расщепляемому пептидному линкеру, имеющему следующую формулу, комбинация имеет следующую формулу:



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

**[0420]** В некоторых аспектах саморасщепляющийся линкер  $-Y_y-$  имеет следующую формулу:



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

**[0421]** В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

#### III.A.4. Реактивные фрагменты (РФ)

**[0422]** АСО по настоящему изобретению создают либо путем химического синтеза, либо путем химической реакции между их компонентами. Например, в некоторых аспектах якорный фрагмент, включающее реактивную группу (например, малеимид), может реагировать с АСО, включающим малеимид-реактивную группу, для получения гидрофобно-модифицированного АСО по настоящему изобретению, где якорный фрагмент может входить в липидный бислой мембраны экзосомы, тем самым прикрепляя АСО к поверхности экзосомы.

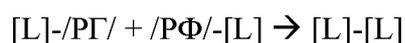
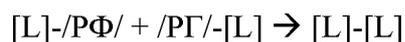
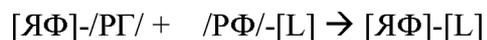
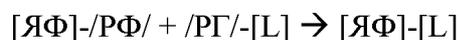
**[0423]** Любой компонент или группа компонентов гидрофобно-модифицированного

АСО по настоящему изобретению может включать по меньшей мере РГ и/или РФ, что позволит соединить компоненты посредством одной реакции или серии реакций для получения гидрофобно-модифицированного АСО по настоящему изобретению. Примерные схемы синтеза для получения гидрофобно-модифицированных АСО включают:



где [ЯФ] - якорный фрагмент, [АСО] - антисмысловый олигонуклеотид, [L] - линкер или комбинация линкеров, /РФ/ - реактивный фрагмент, и /РГ/ - реактивная группа. В любом из представленных схематических изображений АСО может быть присоединен, например, через его 5'-конец или 3'-конец.

**[0424]** Примерные схемы синтеза для получения промежуточных продуктов в синтезе АСО включают:



где [ЯФ] - якорный фрагмент, [АСО] - антисмысловый олигонуклеотид, [L] - линкер или комбинация линкеров, /РФ/ - реактивный фрагмент, и /РГ/ - реактивная группа. В любом из представленных схематических изображений АСО может быть присоединен, например, через его 5'-конец или 3'-конец.

**[0425]** В некоторых аспектах реактивная группа «/РГ/» может быть, например, аминогруппой, тиоловой группой, гидроксильной группой, группой карбоновой кислоты или азидной группой. Конкретные реактивные фрагменты «/РФ/», которые могут реагировать с этими реактивными группами, более подробно описаны ниже.



**[0427]** Любой из якорных фрагментов, линкера или комбинации линкеров, или АСО,

описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с реактивным фрагментом, например, аминореактивным фрагментом (например, NHS-эфиром, п-нитрофенолом, изотиоцианатом, изоцианатом или альдегидом), тиоловым реактивным фрагментом (например, акрилатом, малеимидом или пиридилдисульфидом), гидроксиреактивный фрагмент (например, изотиоцианатом или изоцианатом), реактивным фрагментом карбоновой кислоты (например, эпоксидом) или азидным реактивным фрагментом (например, алкином).

**[0428]** Примерные реактивные фрагменты, которые могут быть использованы для ковалентного связывания двух компонентов, описанных в настоящем документе (например, якорного фрагмента и АСО, или якорного фрагмента и линкера, или якорного фрагмента и линкера, или двух линкеров, или линкера и АСО, или двух якорных фрагментов), включают, например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, N-4-малеимид-масляную кислоту, S-(2-пиридилдитио)цистеамин, йодоацетоксисукцинимид, 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).

**[0429]** В некоторых аспектах якорный фрагмент, линкер или АСО может содержать терминальную оксиаминогруппу, например,  $-ONH_2$ , гидразиногруппу,  $-NHNH_2$ , меркаптогруппу (т.е. SH или тиол) или олефин (например,  $CH=CH_2$ ). В некоторых аспектах якорный фрагмент, линкер или АСО может содержать электрофильный фрагмент, например, в терминальном положении, например, альдегид, алкилгалогенид, мезилат, тозилат, нозилат или брозилат, или активированный сложный эфир карбоновой кислоты, например, NHS-эфир, фосфорамидит или пентафторфениловый эфир. В некоторых аспектах ковалентная связь может быть образована путем соединения нуклеофильной группы лиганда, например, гидроксила, тиола или аминогруппы, с электрофильной группой.

**[0430]** Настоящее изобретение может быть использовано с любыми реактивными группами и реактивными фрагментами, включая, помимо прочего, известные в данной области.

**[0431]** Термин «защитная группа» как используется в настоящем документе, относится к лабильному химическому фрагменту, который известен в данной области для защиты реактивных групп, включая, помимо прочего, гидроксильные, amino- и тиоловые группы, от нежелательных реакций во время процедур синтеза. Защитные группы обычно используются селективно и/или ортогонально для защиты участков во время реакций на

других реактивных участках и затем могут быть удалены, чтобы оставить незащищенную группу как есть или сделать доступной для дальнейших реакций. Защитные группы, известные в данной области, в целом описаны в Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999).

**[0432]** Кроме того, различные этапы синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке для получения желаемых соединений. Синтетические химические превращения и методологии защитных групп (защита и депротекция), применимы для синтеза описанных в данном документе соединений, известны в данной области техники и включают, например, такие, как описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994) и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), и последующие издания.

**[0433]** Дополнительно или альтернативно может быть использован твердофазный синтез, известный в данной области техники. Подходящие твердофазные методы, включая автоматизированные методы синтеза, описаны в F. Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991) и Toy, P.H.; Lam, Y (ed.), *Solid-Phase Organic synthesis, concepts, Strategies, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (2012).

**[0434]** В некоторых аспектах реактивная группа может альтернативно реагировать с более чем одним из реактивных фрагментов, описанных ниже.

#### **III.A.4.a. Аминореактивные фрагменты**

**[0435]** В некоторых аспектах реактивный фрагмент представляет собой аминореактивный фрагмент. Как используется в настоящем документе термин «аминореактивный фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реактивной группой, содержащей аминогруппу, например, первичные амины. Примерами аминореактивных фрагментов являются N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS-эфир), п-нитрофенол, изотиоцианат, изоцианат и альдегид. Альтернативные реактивные фрагменты, реагирующие с первичными аминами, также хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах, аминореактивный фрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, комбинации линкеров или АСО по настоящему изобретению.

**[0436]** В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой NHS-эфир. Обычно NHS-эфирный реактивный фрагмент реагирует с первичным амином реактивной группы с образованием стабильной амидной связи и N-гидрохлоридсукцинимид (NHS).

**[0437]** В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой п-нитрофенольную группу. Обычно п-нитрофенольный реактивный фрагмент представляет собой активированный карбамат, который реагирует с первичным аминореактивным фрагментом с образованием стабильного карбаматного фрагмента и п-нитрофенола.

**[0438]** В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой изотиоцианат. Как правило, изотиоцианат вступает в реакцию с первичным амином реактивной группы с образованием стабильного фрагмента тиомочевины.

**[0439]** В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой изоцианат. Как правило, изоцианат вступает в реакцию с первичным амином реактивной группы с образованием стабильного фрагмента мочевины.

**[0440]** В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой альдегид. Как правило, альдегиды реагируют с первичными аминами с образованием оснований Шиффа, которые в дальнейшем могут быть восстановлены с образованием ковалентной связи путем восстановительного аминирования.

#### **III.A.4.b. Тиолреактивные фрагменты**

**[0441]** В некоторых аспектах реактивный фрагмент представляет собой тиолреактивный фрагмент. Как используется в настоящем документе термин «тиолреактивный фрагмент» относится к химическим группам, которые могут реагировать с реактивной группой, содержащей тиольный фрагмент (или меркаптогруппу). Примерами тиолреактивных фрагментов являются акрилаты, малеимиды и пиридилдисульфиды. Альтернативные реактивные фрагменты, реагирующие с первичными тиолами, также хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах, тиолреактивный фрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, комбинации линкеров или АСО по настоящему изобретению.

**[0442]** В некоторых аспектах тиолреактивный фрагмент представляет собой акрилат. Как правило, акрилаты реагируют с тиолами по атому углерода  $\beta$  к карбонилу акрилата с образованием стабильной сульфидной связи.

**[0443]** В некоторых аспектах тиолреактивный фрагмент представляет собой малеимид. Обычно малеимиды реагируют с тиолами по любому из атомов углерода от  $\beta$  до

карбонилов с образованием стабильной сульфидной связи.

[0444] В некоторых аспектах тиолреактивный фрагмент представляет собой пиридилдисульфид. Обычно пиридилдисульфиды реагируют с тиолами по атому серы  $\beta$  к пиридилу с образованием стабильной дисульфидной связи и пиридин-2-тиона.

#### **III.A.4.c. Гидроксиреактивные фрагменты**

[0445] В некоторых аспектах реактивный фрагмент представляет собой гидроксиреактивный фрагмент. Как используется в настоящем документе термин «гидроксиреактивный фрагмент» относится к химической группе, которая может реагировать с реактивной группой, содержащей гидроксильный фрагмент. Примерными гидроксиреактивными фрагментами являются изотиоцианаты и изоцианаты. Альтернативные гидроксиреактивные фрагменты, реагирующие с первичными тиолами, также хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах, гидроксиреактивный фрагмент может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, комбинации линкеров или АСО по настоящему изобретению.

[0446] В некоторых аспектах гидроксиреактивный фрагмент представляет собой изотиоцианат. Как правило, изотиоцианат вступает в реакцию с гидроксилом реактивной группы с образованием стабильного фрагмента тиомочевины.

[0447] В некоторых аспектах аминореактивный фрагмент представляет собой изоцианат. Как правило, изоцианат вступает в реакцию с гидроксилом реактивной группы с образованием стабильного карбаматного фрагмента.

#### **III.A.4.d. Реактивные фрагменты карбоновых кислот**

[0448] В некоторых аспектах реактивный фрагмент представляет собой реактивный фрагмент карбоновой кислоты. Как используется в настоящем документе термин «реактивный фрагмент карбоновой кислоты» относится к химической группе, которая может реагировать с реактивной группой, содержащей фрагмент карбоновой кислоты. Примером реактивных фрагментов карбоновой кислоты является эпоксид. Альтернативные реактивные фрагменты, которые реагируют с фрагментами карбоновой кислоты, также хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах реактивный фрагмент карбоновой кислоты может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, комбинации линкеров или АСО по настоящему изобретению.

[0449] В некоторых аспектах реактивный фрагмент карбоновой кислоты

представляет собой эпоксид. Как правило, эпоксид реагирует с карбоновой кислотой реактивной группы по любому из атомов углерода эпоксида с образованием 2-гидроксиэтилацетатного фрагмента.

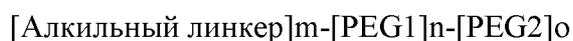
#### **III.A.4.e. Азидные реактивные фрагменты**

**[0450]** В некоторых аспектах реактивный фрагмент представляет собой азидный реактивный фрагмент. Как используется в настоящем документе термин «азидный реактивный фрагмент» относится к химической группе, которая может реагировать с реактивной группой, содержащей азидный фрагмент. Примером азидных реактивных фрагментов является алкин. Альтернативные реактивные фрагменты, которые реагируют с азидными фрагментами, также хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах реактивный фрагмент карбоновой кислоты может быть присоединен к концевому положению якорного фрагмента, комбинации линкеров или АСО по настоящему изобретению.

**[0451]** В некоторых аспектах азидный реактивный фрагмент представляет собой алкин. Как правило, алкин реагирует с азидом реактивной группы посредством реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения, также называемой «клик-химией» с образованием 1,2,3-триазольного фрагмента.

#### **III.A.5. Конкретные примеры и топологии**

**[0452]** В конкретных аспектах настоящего изобретения комбинация линкеров состоит из линкера формулы

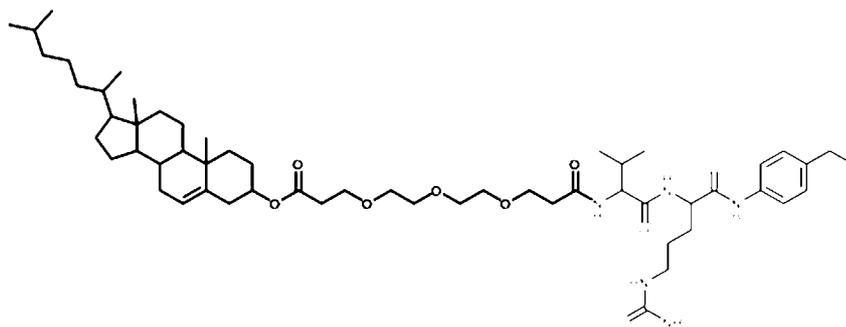


где  $m$ ,  $n$  и  $o$  равны 0 или 1, и по меньшей мере одно из  $m$ ,  $n$  или  $o$  не равно нулю. Примерами комбинаций линкеров в соответствии с такой формулой являются С6-ТЕГ-НЕГ, С6-НЕГ, С6-ТЕГ, С6, ТЕГ-НЕГ, ТЕГ, С8-ТЕГ-НЕГ, С8-НЕГ, С8-ТЕГ и С8.

**[0453]** В некоторых аспектах комбинация линкеров включает нерасщепляемый линкер (например, ТЭГ или ГЭГ) в сочетании с одним или более расщепляемыми линкерами, например, ферментативно расщепляемым линкером и саморасщепляющимся линкером.

**[0454]** В конкретном аспекте комбинация линкеров включает комбинацию линкеров ТЭГ (нерасщепляемый линкер)-Val-Cit (расщепляемый линкер)-pAB

(саморасщепляющийся линкер), как показано ниже



[0455] Конкретные комбинации якорных фрагментов и комбинаций линкеров показаны в таблицах ниже.

Таблица 2.

Якорные фрагменты	Комбинации линкеров		
	1 <sup>й</sup> линкер	2 <sup>й</sup> линкер	3 <sup>й</sup> линкер
Холестерин	C6	ТЭГ	ГЭГ
Холестерин	C6	ГЭГ	№
Холестерин	C6	ТЭГ	№
Холестерин	C6	№	№
Холестерин	ТЭГ	ГЭГ	№
Холестерин	ТЭГ	№	№
Токоферол	C8	ТЭГ	ГЭГ
Токоферол	C8	ГЭГ	№
Токоферол	C8	ТЭГ	№
Токоферол	C8	№	№
Токоферол	ТЭГ	ГЭГ	№
Токоферол	ГЭГ	№	№
Токоферол	ТЭГ	№	№
Токоферол	№	№	№

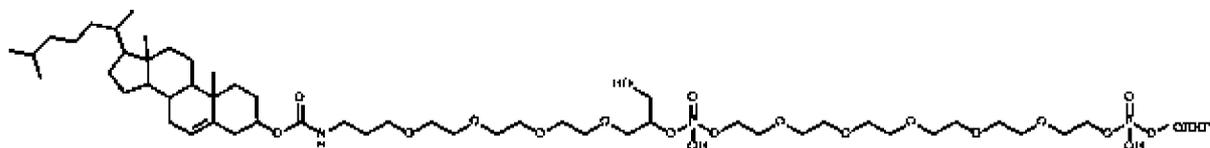
Пальмитат	C6	ТЭГ	ГЭГ
Пальмитат	C6	ГЭГ	№
Пальмитат	C6	ТЭГ	№
Пальмитат	C6	№	№
Холестерин	ТЭГ	Глицерин	ГЭГ

Таблица 3.

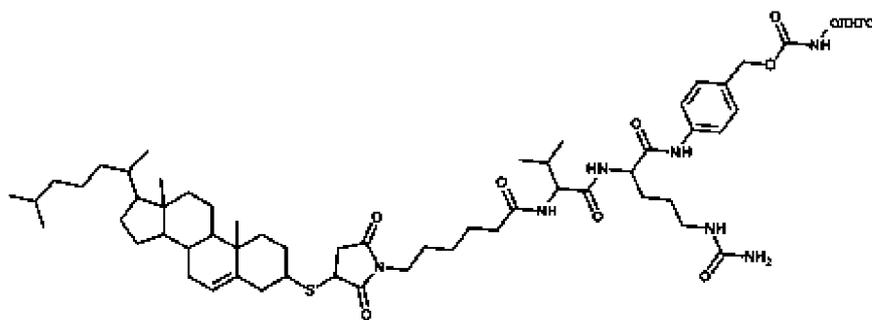
Комбинации линкеров		
Линкер 1	Расщепляемый линкер 2	линкер 3
C6	Дисульфид Имин Тиокетал Три/динуклеотид Val-Cit	C6
Отсутствует		Отсутствует
ТЭГ		ТЭГ
ГЭГ		ГЭГ
ТЭГ-ГЭГ		ТЭГ-ГЭГ

**[0456]** Конкретные олигонуклеотиды, такие как АСО по настоящему изобретению, приведены в качестве примера ниже

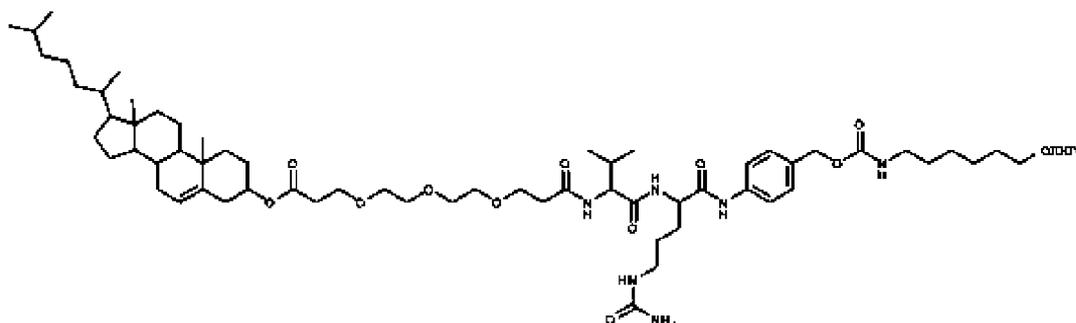
[Холестерин]-[ТЭГ]-[ГЭГ]-[АСО]



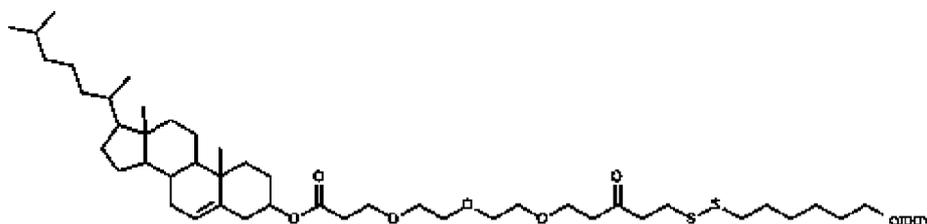
[Холестерин]-[SMal]-[Val-Cit]-[pAB]-[АСО]



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



[Холестерин]-[ТЭГ]-[SS]-[C6]-[ACO]



где [Холестерин] - холестеринный якорный фрагмент, [ТЭГ] - нерасщепляемый линкер ТЭГ, [ГЭГ] - нерасщепляемый линкер ГЭГ, [SS] - дисульфидный окислительно-восстановительный расщепляемый линкер, [C6] - алкильный нерасщепляемый линкер, [SMal] - S-малеимид, [Val-Cit] - расщепляемый линкер валин-цитруллин, [pAB] - саморасщепляемый линкер pAB. В некоторых аспектах АСО по настоящему изобретению имеет структуру в соответствии с приведенными выше примерами структур, в которых один или более компонентов заменены компонентом того же класса, что и изображенные в примере. Например, якорный фрагмент [холестерин] может быть заменено другим якорным фрагментом, описанным в настоящем документе, [ТЭГ] может быть заменен другим полимерным нерасщепляемым линкером, описанным в настоящем документе (например, ГЭГ, ПЭГ, РГ), [Val-Cit] может быть заменен другим расщепляемым пептидазой линкером, или [pAB] может быть заменен другим саморасщепляемым линкером.

### Ш.В. Каркасные фрагменты

[0457] В ВВ может быть экспрессировано одно или более каркасных фрагментов. В некоторых аспектах, один или более каркасных фрагментов используют для прикрепления АСО к ВВ по настоящему изобретению. В других аспектах для прикрепления белка или молекулы к ВВ в дополнение к АСО используют один или более каркасных фрагментов. Таким образом, ВВ по настоящему изобретению содержит якорный фрагмент, связывающий АСО, и каркасный фрагмент, связывающий белок или молекулу, например, нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах, АСО связан с каркасным фрагментом. В некоторых аспектах ВВ содержит более одного каркасного фрагмента. В некоторых аспектах первый АСО связан с первым каркасным фрагментом, а второй АСО связан со вторым каркасным фрагментом. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент и второй каркасный фрагмент представляют собой один и тот же тип каркасного фрагмента, *например*, первый и второй каркасные фрагменты представляют собой каркасный белок X. В некоторых аспектах, первый каркасный фрагмент и второй каркасный фрагмент представляют собой различные типы каркасных фрагментов, *например*, первый каркасный фрагмент представляет собой каркасный белок Y, а второй каркасный фрагментов представляет собой каркасный белок X. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент представляет собой каркас Y, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах первый каркасный фрагмент представляет собой каркас X, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах второй каркасный фрагмент представляет собой каркас Y, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах второй каркасный фрагмент представляет собой каркас X, описанный в настоящем документе.

[0458] В некоторых аспектах ВВ содержит один или более каркасных фрагментов, которые способны прикреплять АСО к ВВ, *например*, экзосоме, (*например*, либо на поверхности просвета, либо на внешней поверхности). В некоторых аспектах каркасный фрагмент представляет собой полипептид («каркасный белок»). В некоторых аспектах каркасный белок включает белок экзосомы или его фрагмент. В других аспектах каркасные фрагменты являются неполипептидными фрагментами. В некоторых аспектах каркасные белки включают различные мембранные белки, такие как трансмембранные белки, цельные белки и периферические белки, находящиеся в больших количествах на мембранах экзосом. Они могут включать различные белки CD, транспортеры, интегрины, лектины и кадгеринины. В определенных аспектах каркасный фрагмент (*например*, каркасный белок) включает каркас X. В других аспектах каркасный фрагмент (*например*, белок экзосомы) включает каркас Y. В дополнительных аспектах каркасный фрагмент (*например*, белок экзосомы) включает как каркас X, так и каркас Y.

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

**[0459]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению содержат мембрану, модифицированную по своему составу. Например, составы их мембран могут быть изменены путем изменения содержания белков, липидов или гликанов в мембране.

**[0460]** В некоторых аспектах сконструированные на поверхности ВВ, *например*, экзосомы генерируются химическими и/или физическими методами, такими как индуцированное ПЭГ-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.

**[0461]** Например, сконструированные на поверхности ВВ (*например*, с каркасом X) могут быть получены из клетки (*например*, клеток НЕК293), 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.

**[0462]** 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.

**[0463]** Каркасные фрагменты могут быть сконструированы так, чтобы экспрессироваться в виде слитой молекулы, *например*, слитой молекулы каркаса X с АСО. 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 АСО.

**[0464]** В некоторых аспектах поверхностно(*например*, каркас X)-сконструированные ВВ, описанные в настоящем документе, демонстрируют превосходные характеристики по сравнению с ВВ, известными в данной области. Например, поверхностно(*например*, каркас X)-сконструированные ВВ содержат модифицированные белки, более высоко обогащенные на их поверхности, чем природные ВВ или ВВ, полученные с использованием обычных белков экзосом. Более того, поверхностно(*например*, каркас X)-сконструированные ВВ по настоящему изобретению могут обладать большей, более специфической или более контролируемой биологической активностью по сравнению с ВВ, встречающимися в природе, или ВВ, полученными с использованием обычных белков экзосом.

**[0465]** 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 с 1 по 25 из SEQ ID NO: 301), внеклеточный домен (аминокислоты с 26 по 832 из SEQ ID NO: 301), трансмембранный домен (аминокислоты с 833 по 853 из SEQ ID NO: 301), и цитоплазматический домен (аминокислоты с 854 по 879 из SEQ ID NO: 301). Зрелый полипептид PTGFRN состоит из SEQ ID NO: 301 без сигнального пептида, *т.е.* аминокислот с 26 по 879 из SEQ ID NO: 301. В некоторых аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, применимый в контексте настоящего раскрытия, включает трансмембранный домен полипептида PTGFRN. В других аспектах фрагмент полипептида PTGFRN, используемый 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).

**[0466]** В некоторых аспектах фрагменты полипептида PTGFRN лишены одного или нескольких функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0467]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную аминокислотам 26–879 SEQ ID NO: 301. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 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.

**[0468]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 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, 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: 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)	MGRLASRPLLLALLSLALCRGRVVRVPTATLVRVVGTELVIPCN VSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEVGFPAQLYQERLQ RGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQGHYKCSTPSTDATVQGN EDTVQVKVLADSLHVGPSARPPPSLSLREGEFPFELRCTAASASPL HTHLALLWEVHRGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDV RLDTVGS DAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEIQE KAVEVATVVIQPSVLRRAAVPKNVSV AEGKELDLTCNITDRADD VRPEVTWFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDSL VHSSPHVALSHVD ARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHVSLWAPGHNRSWHKVAEAVS SPAGVGV TWLEPDYQVYLNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSG EANVRFTVSWYYRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERS KQRAQDGD FIFSKEHTDTFNFR IQR TTEEDRGNY YCVVSAWTKQ RNNSWVKSKDVFSKPVNIFW ALED SVLVVKARQPKPFFAAGNT FEMTCKVSSKNIKSPRYSVLIMAEKPVGDLSSPNETKYIISLDQDS VVKLENWTDASRVDGVVLEK VQEDEF RYRMYQTQVSDAGLYR CMVTAWSPVRGSLWREAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTP SVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPV LLSSLD RKGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSEDQDF GNY YCSVTPWVKSP TGSWQKEAEIHSKPVFITVKMDVLNAFKY PLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCKKEVQETRERRRRLMSM EMD
Фрагмент белка PTGFRN	GPIFNASVHSDTPSVIRGDLIKLFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWF AVHSFGLDKAPVLLSSLD RKGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFL LQVHGSEDQDFGNY YCSVTPWVKSP TGSWQKEAEIHSKPVFITV

(SEQ ID NO: 302)	KMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCCKKEVQE TRRERRRLMSMEM  687-878 из SEQ ID NO: 301
---------------------	--

**[0469]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 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, 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: 319, 320, 321, 322, 323, 323 или 325.

**[0470]** В некоторых аспектах каркас X содержит 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 с 1 по 21 из SEQ ID NO: 303. Аминокислоты 138-323 из SEQ ID NO: 303 - внеклеточный домен, аминокислоты с 324 по 344 - трансмембранный домен, а аминокислоты с 345 по 385 из SEQ ID NO: 303 - цитоплазматический домен.

**[0471]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на

около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную 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 с 221 по 315 из SEQ ID NO: 303. В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 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, 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: 326, 327 или 328.

**[0472]** 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 имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 27 из SEQ ID NO: 304), внеклеточный домен (аминокислоты с 28 по 579 из SEQ ID NO: 304), трансмембранный домен (аминокислоты с 580 по 600 из SEQ ID NO: 304), и цитоплазматический домен (аминокислоты с 601 по 613 из SEQ ID NO: 304).

**[0473]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на

около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную 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 по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 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 больше на N-конце и/или C-конце SEQ ID NO: 330, 331, 332 или 333.

**[0474]** В некоторых аспектах каркас X по настоящему изобретению содержит представителя суперсемейства 3 иммуноглобулинов (IgSF3 или белок IGSF3), который также известен как белок 3, содержащий мотив EWI Glu-Trp-Ile (EWI-3), и представлен в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 309. Белок IGSF3 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 19 из SEQ ID NO: 309), внеклеточный домен (аминокислоты с 20 по 1124 из SEQ ID NO: 309), трансмембранный домен (аминокислоты с 1125 по 1145 из SEQ ID NO: 309), и цитоплазматический домен (аминокислоты с 1146 по 1194 из SEQ ID NO: 309).

**[0475]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную аминокислотам 28–613 SEQ ID NO: 309. В некоторых аспектах белок IGSF3 лишен одного

или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0476]** В некоторых аспектах каркас X по настоящему изобретению включает интегрин-бета-1 (белок ITGB1), также известный как бета-субъединица рецептора фибронектина, гликопротеин IIa (GPIIa), бета-субъединица VLA-4 или CD29, и показан как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 305. Белок ITGB1 человека имеет сигнальный пептид (аминокислоты с 1 по 20 из SEQ ID NO: 305), внеклеточный домен (аминокислоты с 21 по 728 из SEQ ID NO: 305), трансмембранный домен (аминокислоты с 729 по 751 из SEQ ID NO: 305), и цитоплазматический домен (аминокислоты с 752 по 798 из SEQ ID NO: 305).

**[0477]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную аминокислотам 21–798 SEQ ID NO: 305. В некоторых аспектах белок ITGB1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0478]** В других аспектах каркас X содержит белок ITGA4, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 306 без сигнального пептида (аминокислоты с 1 по 33 из SEQ ID NO: 306). В некоторых аспектах белок ITGA4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0479]** В других аспектах каркас X содержит белок SLC3A2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 307 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок SLC3A2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0480]** В других аспектах каркас X содержит белок ATP1A1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%,

на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 310 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0481]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР1А2, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 311 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0482]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР1А3, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 312 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0483]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР1А4, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 313 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР1А4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0484]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В1, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 85%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 96%, на по меньшей мере около 97%, на по меньшей мере около 98%, на по меньшей мере около 99% или на около 100% идентична SEQ ID NO: 314 без сигнального пептида. В

некоторых аспектах белок АТР2В1 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0485]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В2, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 315 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0486]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В3, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 316 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В3 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0487]** В других аспектах каркас X содержит белок АТР2В4, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 317 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок АТР2В4 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0488]** В других аспектах каркас X содержит белок IGSF2, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную SEQ ID NO: 318 без сигнального пептида. В некоторых аспектах белок IGSF2 лишен одного или более функциональных или структурных доменов, таких как IgV.

**[0489]** Неограничивающие примеры других каркасных белков X можно найти в патенте США № US10195290B1, выданном 5 февраля 2019 г., который полностью включен посредством ссылки.

**[0490]** 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.

**[0491]** 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.

**[0492]** В некоторых аспектах каркас X можно использовать для связывания любого фрагмента, *например*, АСО, с поверхностью просвета и на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы в одно и то же время. Например, полипептид PTGFRN можно использовать для связывания АСО внутри просвета (*например*, на поверхности просвета) в дополнение к внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. Поэтому в некоторых аспектах каркас X может использоваться для двух целей, *например*, АСО на поверхности просвета и АСО на внешней поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах, каркас X представляет собой каркасный белок, который способен закреплять АСО на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

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

**[0493]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему изобретению содержат внутреннее пространство (*т.е.* просвет), которое отличается от такового у встречающихся в природе ВВ. Например, 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.

**[0494]** В некоторых аспектах сконструированные ВВ, *например*, экзосомы могут быть получены из клетки, трансформированной экзогенной последовательностью,

кодирующей каркасный фрагмент (*например*, белки экзосомы, *например*, каркас Y) или модификацию или фрагмент фрагмента каркаса, который изменяет состав или содержимое поверхности просвета BB, *например*, экзосомы. Различные модификации или фрагменты экзосомного белка, которые могут экспрессироваться на поверхности просвета BB, *например*, экзосомы, могут быть использованы для аспектов настоящего изобретения.

**[0495]** В некоторых аспектах белки экзосом, которые могут изменять поверхность просвета BB, *например*, экзосомы, включают, но не ограничиваются ими, миристоилированный, богатый аланином субстрат киназы C (MARCKS), белок 1, подобный миристоилированному, богатому аланином субстрату киназы C (MARCKSL1), кислоторастворимый белок 1 головного мозга (BASP1) или любую их комбинацию.

**[0496]** В некоторых аспектах каркаса 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 каркаса 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 каркаса 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 с 88 по 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 каркасного белка Y

Белок	Последовательность
Белок MARCKS (SEQ ID NO: 401)	MGAQFSKTAACKGEAAAERPGEAAVASSPSKANGQENGHVKV NGDASPAAAESGAKEELQANGSAPAADKEEPAAAGSGAASPS AAEKGEPAAAAAPAEAGASPVEKEAPAEGEAAEPGSPTAAEGE AASAASSTSSPKAEDGATPSPSNETPKKKKKRFSFKKSFKLSGF

	SFKKNKKEAGEGGEAEAPAAEGGKDEAAGGAAAAAAEAGA ASGEQAAAPGEEAAAGEEGAAGGDPQEAKPQEAAVAPEKPPA SDETKAAEEPSKVEEKKAEEAGASAAACEAPSAAGPGAPPEQE AAPAEPPAAAAASSACAAPSQEAQPECSPEAPPAEAAE
Белок MARCKSL1 (SEQ ID NO: 402)	MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGDLS PKGEGESPPVNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAEAKGEVPPKE TPKKKKKFSFKKPKLSGLSFKRNRKEGGGDSSASSPTEEEQE QGEIGACSDGTAQEGKAAATPESQEPQAKGAEASAASEEEA GPQATEPSTPSGPESGPTPASAEQNE
Белок BASP1 (SEQ ID NO: 403)	MGGKLSKGGKGYNVNDEKAKEKDKKAEGAATEEEGTPKESE PQAAAEPAEAKEGKEKPDQDAEGKAEEKEGKDAAAAKEEA PKAEPEKTEGAAEAKAEPKAPQEQAAPGPAAGGEAPKAAE AAAAPAESAAPAAGEEPSKEEGEPKKTEAPAAPAAQETKSDG APASDSKPGSSEAAPSSKETPAATEAPSSTPKAQGPAASAEEP PVEAPAANSQDQTVTVKE

**[0497]** В последовательности зрелого белка BASP1 отсутствует первый Met из SEQ ID NO: 403 и, таким образом, он содержит аминокислоты с 2 по 227 SEQ ID NO: 403. Точно так же в зрелых белках MARCKS и MARCKSL1 также отсутствует первый Met из SEQ ID NO: 401 и 402, соответственно. Соответственно, зрелый белок MARCKS содержит аминокислоты от 2 до 332 из SEQ ID NO: 401. Зрелый белок MARCKSL1 содержит аминокислоты от 2 до 227 из SEQ ID NO: 402.

**[0498]** В других аспектах каркас Y, используемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную аминокислотам 2–227 SEQ ID NO: 403. В других аспектах каркас Y содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на

около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 404-567. В других аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 403, за исключением одной аминокислотной мутации, двух аминокислотных мутаций, трех аминокислотных мутаций, четырех аминокислотных мутаций, пяти аминокислотных мутаций, шести аминокислотных мутаций или семи аминокислотных мутаций. В других аспектах каркас Y, применимый для настоящего изобретения, 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 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: 404-567.

**[0499]** В некоторых аспектах, последовательность белка любой из SEQ ID NO: 404-567 достаточна, чтобы быть каркасом Y по настоящему изобретению (*например*, каркасный фрагмент, связанный с АСО).

**[0500]** В некоторых аспектах каркас Y, применимый в настоящем изобретении, представляет собой пептид с последовательностью GXLKSKKK, где X представляет собой аланин или любую другую аминокислоту (SEQ ID NO: 404). В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, содержит пептид с последовательностью (G)( $\pi$ )( $\xi$ )( $\Phi/\pi$ )(S/A/G/N)(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом  $\pi$  представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser),  $\xi$  представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg),  $\Phi$  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)( $\pi$ )(X)( $\Phi/\pi$ )( $\pi$ )(+)(+), при этом каждое положение в скобках представляет собой аминокислоту, и при этом  $\pi$  представляет собой любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из (Pro, Gly, Ala, Ser), X представляет собой любую аминокислоту,  $\Phi$  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.

**[0501]** В других аспектах каркас X содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 404-567.

**[0502]** Сконструированные с помощью каркаса Y BB, *например*, экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 404-567.

**[0503]** В некоторых аспектах каркасный белок Y, применимый для настоящего изобретения, содержит «N-концевой домен» (НД) и «эффекторный домен» (ЭД), при этом НД и/или ЭД 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» (НД) и «эффекторный домен» (ЭД); при этом НД и/или ЭД связаны с поверхностью просвета BB, *например*, экзосомой. В контексте настоящего 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 каркасный белок Y, содержит N-концевой домен (НД) и эффекторный домен (ЭД), при этом НД ассоциирован с поверхностью просвета BB, а ЭД ассоциирован с поверхностью просвета BB посредством ионного взаимодействия, при этом ЭД 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 непрерывных основных аминокислот, *например*, лизинов (Lys) подряд.

**[0504]** В других аспектах каркасный белок Y, содержит N-концевой домен (НД) и эффекторный домен (ЭД), при этом НД ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, а ЭД ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, *например*, экзосомы, посредством ионного взаимодействия, при этом ЭД 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 непрерывных основных аминокислот, *например*, лизинов (Lys) подряд.

**[0505]** В некоторых аспектах НД ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, *например*, экзосомы, посредством липидирования, *например*, посредством миристоилирования. В некоторых аспектах НД имеет Gly на N-конце. В некоторых аспектах N-концевой Gly является миристоилированным.

**[0506]** В некоторых аспектах ЭД ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, *например*, экзосомы, посредством ионного взаимодействия. В некоторых аспектах ЭД ассоциирован с поверхностью просвета ВВ, *например*, экзосомы, посредством электростатического взаимодействия, в частности, притягивающего электростатическое взаимодействие.

**[0507]** В некоторых аспектах ЭД 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)<sub>n</sub>, при этом n является целым числом от 1 до 10.

**[0508]** В других аспектах ЭД содержит по меньшей мере лизин, а НД содержит лизин на C-конце, если N-конец ЭД напрямую связан с лизином на C-конце НД, *т.е.*, лизин находится на N-конце ЭД и слит с лизином на C-конце НД. В других аспектах ЭД 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 ЭД связан с C-концом НД посредством линкера, *например*, одной или нескольких аминокислот.

**[0509]** В некоторых аспектах ЭД 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 ЭД содержит КК, ККК, КККК (SEQ ID NO: 405), ККККК (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.

**[0510]** 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.

**[0511]** В некоторых аспектах ND каркасного белка 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.

**[0512]** В некоторых аспектах аминокислоту X3 выбирают из группы, состоящей из Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His и Arg.

**[0513]** В некоторых аспектах ND и ED соединены с помощью линкера. В некоторых аспектах линкер содержит одну или несколько аминокислот. В некоторых аспектах термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например*, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или к не полипептиду, *например*, алкильной цепи. В некоторых аспектах два или более 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.

**[0514]** 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.

**[0515]** 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  $[(\text{Gly})_x\text{-Ser}]_y$ , 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  $\text{G}_n$ , 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.

**[0516]** 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).

**[0517]** 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.

**[0518]** В настоящем изобретении также предложена выделенная внеклеточная везикула (ВВ), *например*, экзосома, содержащая АСО, связанный с каркасным белком Y, где каркасный белок Y содержит НД—ЭД, при этом : НД 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 ЭД представляет собой эффекторный домен, содержащий (i) по меньшей мере два непрерывных лизина (Lys), которые связаны с X6 пептидной связью или одной или несколькими аминокислотами, или (ii) по меньшей мере один лизин, который непосредственно связан с X6 пептидной связью.

**[0519]** 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.

**[0520]** В некоторых аспектах ЭД в каркасном белке содержит Lys (K), KK, KKK, KKKK (SEQ ID NO: 405), KKKKK (SEQ ID NO: 406), Arg (R), RR, RRR, RRRR (SEQ ID NO: 407); RRRRR (SEQ ID NO: 408), KR, RK, KKR, KRK, RKK, KRR, RRK, (K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 409), (K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(K/R) (SEQ ID NO: 410) или любую их комбинацию.

**[0521]** 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: 413), (iv) GGKLAKK (SEQ ID NO: 414) или (v) любой из комбинации.

**[0522]** В некоторых аспектах НД в каркасе Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (i) GGKLSK (SEQ ID NO: 415), (ii) GAKLSK (SEQ ID NO: 416), (iii) GGKQSK (SEQ ID NO: 417), (iv) GGKLAK (SEQ ID NO: 418) или (v) любую их комбинацию, а ЭД 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 GGGSGG (SEQ ID NO: 435), KKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 436), KRFSFKKS (SEQ ID NO: 437).

**[0523]** В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка Y, применяемая 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.

**[0524]** 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) любую их комбинацию.

**[0525]** В некоторых аспектах полипептидная последовательность каркасного белка Y, применимые 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.

**[0526]** В некоторых аспектах длина каркасного белка Y, составляет по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере



до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190, от около 190 до около 200, от около 200 до около 210, от около 210 до около 220, от около 220 до около 230, от около 230 до около 240, от около 240 до около 250, от около 250 до около 260, от около 260 до около 270, от около 270 до около 280, от около 280 до около 290, от около 290 до около 300, от около 300 до около 310, от около 310 до около 320, от около 320 до около 330, от около 330 до около 340 или от около 340 до около 350 аминокислот.

**[0528]** 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).

**[0529]** 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).

**[0530]** Неограничивающие примеры каркасного белка Y, применимого для настоящего изобретения, описаны в настоящем документе. В некоторых аспектах каркасный белок Y содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 411, 438, 446 и 455-567. В некоторых аспектах каркасный белок Y состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 411, 438, 446 и 455-567.

**[0531]** 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.

### **III.C. Нацеливающий фрагмент**

**[0532]** 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 анкириновым повтором (darpin), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжьей нанотела или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, антитело с одним доменом, антитело, содержащее только тяжелую цепь (VHH), одноцепочечное антитело, антитело, содержащее только тяжелую цепь, полученное из акул (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

**[0533]** 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 миелоидной линии (*например*, нейтрофил, моноцит, макрофаг или МКС (*например*, моноцитарные МКС или гранулоцитарные МКС)), гемопоэтическую стволовую клетку или любую их комбинацию.

**[0534]** В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент связан с ВВ, *например*, экзосомой, посредством каркасного белка. В некоторых аспектах каркасный белок представляет собой любой 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**

**[0535]** Как описано выше, внеклеточные везикулы (ВВ) по настоящему изобретению

(*например*, экзосомы и нановезикулы) могут содержать один или более линкеров, которые связывают представляющую интерес молекулу (*например* АСО) с ВВ (*например*, с внешней поверхностью или на поверхности просвета). В некоторых аспектах АСО связан с ВВ напрямую или посредством каркасного фрагмента (*например*, каркаса X или каркаса Y). В некоторых аспектах АСО связан с каркасным фрагментом посредством линкера. В некоторых аспектах АСО связан со вторым каркасным фрагментом посредством линкера.

**[0536]** В некоторых аспектах АСО связан с внешней поверхностью экзосомы посредством каркаса X. В других аспектах АСО связан с поверхностью просвета экзосомы посредством каркаса X или каркаса Y. Линкер может быть любым химическим соединением, известным в данной области.

**[0537]** 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.

**[0538]** 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.

**[0539]** 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).

**[0540]** Линкеры могут быть восприимчивыми к расщеплению («расщепляемый линкер»), за счет чего облегчается высвобождение биологически активной молекулы (*например*, АСО).

**[0541]** 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.

**[0542]** В некоторых аспектах линкер включает нерасщепляемый линкер.

**[0543]** В некоторых аспектах, линкер включает акриловый фосфорамидит (*например*, ACRYDITE™), аденилирование, азид (NHS-эфир), дигоксигенин (NHS-эфир), холестерин-ТЭГ, I-LINKER™, модификатор аминокислоты (*например*, аминокислотный модификатор С6, аминокислотный модификатор С12, аминокислотный модификатор С6 dT или аминокислотный модификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадиинил dU, биотинилирование (*например*, биотин, биотин (азид), биотин dT, биотин-ТЭГ, двойной биотин, PC-биотин или дестиобиотин), тиольную модификацию (тиоловый модификатор С3 S-S, дитиоловый или тиоловый модификатор С6 S-S), или любую их комбинацию.

**[0544]** В некоторых аспектах линкер включает терпен, такой как неролидол, фарнезол, лимонен, линалоол, гераниол, карвон, фенхон или ментол; липид, такой как пальмитиновая или миристиновая кислота; холестерин; олеил; ретинил; остатки холестерина; холевую кислоту; адамантануксусную кислоту; 1-пиренмасляную кислоту; дигидротестостерон; 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин; геранилгексильную группу; гексадецилглицерин; борнеол; 1,3-пропандиол; гептадецильную группу; О3-(олеил)линолевую кислоту; О3-(олеил)холеновую кислоту; диметокситритил; феноксазин, малеимидное соединение, глюкоинидазный тип, тип CL2A-SN38, фолиевую кислоту; углевод; витамин А; витамин Е; витамин К, или любую их комбинацию.

### **III.E. Модифицированные ВВ, содержащие фрагменты тропизма**

[0545] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, описанная в настоящем документе, может быть сконструирована для изменения ее свойств, например, биораспределения, например, путем включения иммуноаффинных лигандов или лигандов когнатных рецепторов. Например, ВВ, например, экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть поверхностно модифицированы для направления их к определенному типу клеток, например, к клеткам Шванна, сенсорным нейронам, моторным нейронам, менингеальным макрофагам или опухолевым клеткам, или могут быть поверхностно модифицированы для усиления их миграции в определенный компартмент, например, в ЦНС (для улучшения удержания в интратекальном компартменте) или в микроокружение опухоли.

[0546] В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, содержит (i) АСО, описанный в настоящем документе, и (ii) агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент. В некоторых аспектах агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент включает одномономерный антигенсвязывающий фрагмент, *например*, VHH и/или vNAR. Как используется в данном документе, термины «агент, модифицирующий биораспределение» и «нацеливающий фрагмент» используются взаимозаменяемо и относятся к агенту, который может модифицировать распределение внеклеточных везикул (*например*, экзосом, нановезикул) *in vivo* или *in vitro* (*например*, в смешанной культуре клеток разных видов). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент изменяет тропизм ВВ (*например*, экзосомы), т.е. нацеливающий фрагмент является «фрагментом 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*, экзосомы) конкретной клеткой, тканью или органом.

[0547] 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 включать аффинный лиганд, *например*, антитело (такое как анти-CD19, анти-CD22, анти-CLEC9A или анти-CD3), домен VHH, пептид фагового дисплея, домен фибронектина, нанотело верблюда и/или vNAR. В некоторых аспектах фрагмент тропизма может включать, например, синтетический полимер (*например*, ПЭГ), природный лиганд/молекулу (*например*, CD40L, альбумин, CD47, CD24, CD55, CD59) и/или

рекомбинантный белок (*например*, ХТЕН).

**[0548]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма может увеличить поглощение ВВ, например, экзосомы, клеткой. В некоторых аспектах фрагмент тропизма, который может увеличить поглощение ВВ, например, экзосомы, клеткой, включает антиген лимфоцита 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), молекулы межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрин (также известный как DC-SIGN или CD209), рецептор 1 лектинового типа окисленных ЛПНП (LOX-1), рецептор макрофага с коллагеновой структурой (MARCO), член А семейства 12 лектиновых доменов С-типа (CLEC12A), член А семейства 10 лектиновых доменов С-типа (CLEC10A), DC-азиалогликопротеиновый рецептор (DC-ASGPR), DC-иммунорецептор 2 (DCIR2), дектин-1, макрофагальный маннозный рецептор (MMR), BDCA-2 (CD303, CLEC4C), дектин-2, BST-2 (CD317), лангерин, CD206, CD11b, CD11c, CD123, CD304, XCR1, AXL, SIGLEC 6, CD209, SIRPA, CX3CR1, GPR182, CD14, CD16, CD32, CD34, CD38, CD10, анти-CD3 антитело или любую их комбинацию.

**[0549]** 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 клеточно-специфический целевой лиганд, , который увеличивает тропизм ВВ, например, экзосомы к шванновским клеткам, связывается с маркером поверхности шванновских клеток, таким как миелиновый основной белок (МВР), миелиновый протеин нулевой (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.

**[0550]** В некоторых аспектах агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген, экспрессированный на опухолевой клетке. В некоторых аспектах агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент включает

антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген, экспрессируемый в микроокружении опухоли. В некоторых аспектах агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывает мезотелин. Любой антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области, который способен связывать мезотелин, может быть использован в ВВ, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах агент, модифицирующий биораспределение, или нацеливающий фрагмент включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33. Любой антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области, который способен связывать CD33, может быть использован в ВВ, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, выбран из анти-CD33 связывающих фрагментов, описанных в патенте США № 5877296, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0551]** 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, клетка в ЦНС или клетка Шванна в периферических нервах), можно вводить с использованием любого подходящего способа введения, известного из уровня техники (например, внутривенной инъекции или инфузии), поскольку присутствие тропизма (отдельно или в сочетании с присутствием антифагоцитарного сигнального фрагмента, такой как CD47, и использованием определенного пути введения) будет индуцировать тропизм ВВ, например экзосомы, по направлению к необходимой целевой клетке или ткани.

**[0552]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, каркасным белком 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 ПЭГ) или любой их комбинации к внешней поверхности ВВ, например, экзосоме по настоящему изобретению. В некоторых аспектах фрагмент антифагоцитарный сигнальный фрагмент связан, например, химически связан посредством малеимидного фрагмента с каркасным фрагментом, например, белком каркаса X или его фрагментом, на внешней поверхности ВВ, например, экзосоме.

**[0553]** 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).

**[0554]** 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 из фрагментов тропизма увеличивает 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 несколько 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 настоящем документе фрагмент тропизма или их комбинация присоединены к каркасному фрагменту, например, каркасному белку X или его фрагменту, через линкер или спейсер. В некоторых аспектах линкер или спейсер или их комбинация помещены между двумя описанными в настоящем документе фрагментами тропизма.

**[0555]** Ниже приведены не ограничивающие примеры фрагментов тропизма, способных направлять ВВ, например, экзосомы, по настоящему изобретению к различным типам клеток нервной системы.

### **III.E.1. Фрагменты тропизма, нацеленные на клетки Шванна**

**[0556]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма может быть нацелен на клетку Шванна. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к клетке Шванна, нацелен, например, на рецептор трансферрина (TfR), аполипопротеин D (ApoD), галектин 1 (LGALS1), протеолипидный белок миелин (PLP), глипикан 1 или синдекан 3. В некоторых аспектах фрагментом тропизма, направляющим ВВ, например, экзосому по настоящему изобретению, к клетке Шванна, является трансферрин или его фрагмент, вариант или производное.

**[0557]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на рецептор трансферрина (TfR). Рецепторы трансферрина, например, TfR1 или TfR2, являются белками-переносчиками трансферрина. Рецепторы трансферрина импортируют железо путем поглощения комплекса трансферрин-ион посредством

рецептор-опосредованного эндоцитоза.

**[0558]** TfR1 (см., например, UniProt P02786 TFR1\_Human) или рецептор трансферрина 1 (также известный как кластер дифференциации 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 легких, рак толстой кишки и лейкемия), а также в тканях, пораженных такими заболеваниями, как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). TfR2 экспрессируется преимущественно в печени и эритроидных клетках, в меньшей степени в легких, селезенке и мышцах, и имеет 45% идентичности и 66% сходства с TfR1. TfR1 - это трансмембранный рецептор, образующий гомодимер из 760 остатков с дисульфидными связями и молекулярной массой 90 кДа. Аффинность к трансферрину у двух типов рецепторов разная, причем аффинность к TfR1 по меньшей мере в 25-30 раз выше, чем к TfR2.

**[0559]** Связывание с TfR1 позволяет крупным молекулам, например антителам, проникать в головной мозг. Было показано, что некоторые антитела, нацеленные на TfR1, пересекают гематоэнцефалический барьер, не мешая поглощению железа. Среди них мышечное антитело к TfR крысы OX26 и мышечное антитело к TfR-мышцы 8D3. Аффинность взаимодействия антитело-TfR важна для определения успеха трансцитотического переноса через эндотелиальные клетки ГЭБ. Моновалентное взаимодействие TfR благоприятствует ГЭБ-переносу из-за изменения путей внутриклеточной сортировки. Эффекты авидности бивалентных взаимодействий, перенаправляющих перенос в лизосому. Кроме того, снижение аффинности связывания TfR напрямую способствует диссоциации от TfR, что увеличивает воздействие связывающего TfR антитела на паренхиму мозга. См., например, патент США № 8821943, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению может включать лиганд, который может быть нацелен на TfR, например, нацелен 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 20190202936 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

**[0560]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает весь или часть (например, связывающую часть) лиганда для рецептора трансферрина, например, трансферрина человека, доступного в GenBank под номерами доступа NM001063,

XM002793, XM039847, NM002343 или NM013900, среди прочих, или его вариант, фрагмент или производное.

**[0561]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает фрагмент, нацеленный на рецептор трансферрина, т.е. фрагмент, направленный на рецептор трансферрина. Подходящие молекулы, нацеленные на рецептор трансферрина, включают трансферрин или вариант трансферрина, например, сывороточный трансферрин, лактотрансферрин (лактоферрин) овотрансферрин или меланотрансферрин, но не ограничиваясь ими. Трансферрины - это семейство негемовых железосвязывающих белков, встречающихся у позвоночных животных, 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 разветвляются и заканчиваются несколькими антенными структурами, каждая из которых имеет концевые остатки сиаловой кислоты. Имеется два основных домена, N-домен из примерно 330 аминокислот и C-домен из примерно 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.

**[0562]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма представляет собой сывороточный трансферрин или вариант трансферрина, например, гексасиалотрансферрин, пентасиалотрансферрин, тетрасиалотрансферрин, трисиалотрансферрин, дисиалотрансферрин, моносиалотрансферрин или асиалотрансферрин, или углеводдефицитный трансферрин (CDT, англ.: carbohydrate-deficient transferrin), например, асиало-, моносиало- или дисиалотрансферрин, или безуглеводный трансферрин (CFT, англ.: carbohydrate-free transferrin), например, асиалотрансферрин. В некоторых аспектах фрагмент тропизма представляет собой вариант трансферрина, имеющий N-концевой домен трансферрина, C-концевой домен трансферрина, гликозилирование нативного трансферрина, пониженное гликозилирование по сравнению с нативным (дикого типа) трансферрином, отсутствие гликозилирования, по меньшей мере две N-концевые доли трансферрина, по меньшей мере две C-концевые доли трансферрина, по меньшей мере одну мутацию в N-домене, по меньшей мере одну мутацию в C-домене, мутацию, при которой мутант имеет более слабую связывающую способность для рецептора трансферрина, чем нативный трансферрин, и/или мутацию, при которой мутант имеет более сильную связывающую способность для рецептора трансферрина, чем нативный трансферрин, или любую комбинацию вышесказанного.

**[0563]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма, нацеленный на рецептор

трансферрина, содержит переменный домен нового антигенного рецептора (vNAR, англ.: variable new antigen receptor) к рецептору трансферрина, например, связывающий домен с общей структурой фрагмента (FW1-CDR1-FW2-3-CDR3-FW4). См., например, US 2017-0348416, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. vNAR являются ключевым компонентом адаптивной иммунной системы акул. Имея массу всего 11 кДа, эти однодоменные структуры являются самыми маленькими IgG-подобными белками в животном царстве и представляют собой отличную платформу для молекулярной инженерии и открытия биологических препаратов. К атрибутам vNAR относятся высокая аффинность к мишени, простота экспрессии, стабильность, растворимость, мультиспецифичность и повышенная способность проникновения в твердые ткани. См. Ubah et al. *Biochem. Soc. Trans.* (2018) 46(6):1559-1565.

**[0564]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает домен vNAR, способный специфически связываться с Tfr1, где домен vNAR включает или состоит по существу из каркаса vNAR с любым одним пептидом CDR1 из таблицы 1 US 2017-0348416 в комбинации с любым одним пептидом CDR3 из таблицы 1 US 2017-0348416.

**[0565]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на ApoD. В отличие от других липопротеинов, которые в основном производятся в печени, аполипопротеин D в основном производится в мозге, мозжечке и периферических нервах. Длина ApoD составляет 169 аминокислот, включая сигнал пептид секреции из 20 аминокислот. Он содержит два сайта гликозилирования (аспаргины 45 и 78), а молекулярная масса зрелого белка варьирует от 20 до 32 кДа. ApoD связывается со стероидными гормонами, такими как прогестерон и прегненолон, с относительно сильной аффинностью, а с эстрогеном - с более слабой. Арахидоновая кислота (АК) является лигандом для ApoD с гораздо лучшей аффинностью, чем у прогестерона или прегненолона. Другие лиганды ApoD включают E-3-метил-2-гексеновую кислоту, ретиноевую кислоту, сфингомиелин и сфинголипиды. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает лиганд, который может быть нацелен на ApoD, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с ApoD.

**[0566]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на галектин 1. Длина белка галектин 1 составляет 135 аминокислот. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает лиганд, который может быть нацелен на галектин 1, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с галектином 1.

**[0567]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению

нацелен на PLP. PLP является основным белком миелина в ЦНС. Он играет важную роль в формировании или поддержании мультислойной структуры миелина. Миелиновая оболочка - это многослойная мембрана, уникальная для нервной системы, которая функционирует как изолятор, значительно повышая эффективность проведения импульсов по аксонам. PLP - это высоко консервативный гидрофобный белок из 276-280 аминокислот, который содержит четыре трансмембранных сегмента, две дисульфидные связи и ковалентно связывает липиды (по меньшей мере, шесть пальмитатных групп у млекопитающих). Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает лиганд, который может быть нацелен на PLP, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с PLP.

**[0568]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на глипикан 1. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает лиганд, который может быть нацелен на глипикан 1, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться с глипиканом 1. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению нацелен на синдекан 3. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает лиганд, который может быть нацелен на синдекан 3, например, антитело или другую связывающую молекулу, способную специфически связываться.

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

**[0569]** В некоторых аспектах описанный в настоящем документе фрагмент тропизма может направлять ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к сенсорному нейрону. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к сенсорному нейрону, нацелен на рецептор Trk, например, TrkA, TrkB, TrkC или их комбинацию.

**[0570]** Рецепторы Trk (тропомозиновая рецепторная киназа) представляют собой семейство тирозинкиназ, регулирующих 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 высокоспецифично. Каждый тип нейротрофина имеет различную аффинность связывания с соответствующим рецептором Trk. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма, направляющий ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к сенсорному нейрону, включает нейротрофин.

**[0571]** Нейротрофины связываются с рецепторами Trk в виде гомодимеров. Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает по меньшей мере два нейротрофина, описанных в настоящем документе, например, в тандеме. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает по меньшей мере два нейротрофина, описанных в настоящем 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 не менее 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.

**[0572]** В некоторых аспектах нейротрофин является предшественником нейротрофина, то есть пронеуротрофином, который впоследствии расщепляется для получения зрелого белка.

**[0573]** Фактор роста нервов (NGF, англ.: Nerve growth factor) является первым идентифицированным и, вероятно, наиболее хорошо охарактеризованным представителем семейства нейротрофинов. Он оказывает заметное влияние на развивающиеся сенсорные и симпатические нейроны периферической нервной системы. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF, англ.: Brain-derived neurotrophic factor) обладает нейротрофической активностью, сходной с NGF, и экспрессируется в основном в ЦНС, а также был обнаружен в сердце, легких, скелетных мышцах и седалищном нерве на периферии (Leibrock, J. и др., Nature, 341:149-152 (1989)). Нейротрофин-3 (NT-3) является третьим членом семейства NGF и экспрессируется преимущественно в подмножестве пирамидальных и гранулярных нейронов гиппокампа, а также 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-415) является наиболее вариабельным членом семейства нейротрофинов. Нейротрофин-6 (NT-6) был обнаружен у телеостовых рыб и связывается с рецептором p75.

**[0574]** В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный на TrkB, включает, например, NT-4 или BDNF, или их фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный TrkA, включает, например, NGF, или его фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах нейротрофин, нацеленный TrkC, включает, например, NT-3 или его фрагмент, вариант или производное.

**[0575]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает в себя нейротрофический

фактор головного мозга (BDNF). В некоторых аспектах BDNF представляет собой вариант нативного BDNF, например, усеченный вариант с удалением двух аминокислот на карбоксильном конце. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает полную последовательность из 119 аминокислот BDNF (HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR; SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах и усеченный вариант BDNF с удалением одной аминокислоты на карбоксильном конце (аминокислоты 1-118 из SEQ ID NO: 161).

**[0576]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает карбокси-усеченный вариант нативного BDNF, например, вариант, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот отсутствуют на карбокси-конце BDNF. Варианты BDNF включают полный BDNF из 119 аминокислот, вариант из 117 или 118 аминокислот с усечением на карбокси-конце, варианты с усечением на амино-конце или варианты с изменением аминокислотного состава до примерно 20%, примерно 30 или примерно 40%, при условии, что вариант белка по-прежнему связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью.

**[0577]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает усеченный вариант BDNF с удалением двух аминокислот на карбоксильном конце (аминокислоты 1-117 из SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает усеченный вариант BDNF с удалением трех аминокислот на карбоксильном конце (аминокислоты 1-116 из SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает усеченный вариант BDNF с удалением четырех аминокислот на карбоксильном конце (аминокислоты 1-115 из SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает усеченный вариант BDNF с удалением пяти аминокислот на карбоксильном конце (аминокислоты 1-114 из SEQ ID NO: 161). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает BDNF, который по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 161, или ее усеченному варианту, например, варианту из 117 или 118 аминокислот с усечением одной или двух аминокислот на карбоксильном конце, или вариантам с усечением на амино-конце. См., например, патент США № 8053569 В2, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[0578]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает фактор роста нервов (NGF). В некоторых аспектах NGF представляет собой вариант нативного NGF, например, усеченный вариант. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает 26-кДа бета-

субъединицу белка, единственный компонент комплекса 7S NGF, который является биологически активным. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает полноразмерную последовательность из 120 аминокислот бета NGF (SSSHPIFHRGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATDIKKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM DGKQAAWRFIRIDTACV CVLSRKAVRRA; SEQ ID NO: 162). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает карбокси-усеченный вариант нативного NGF, 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 усечением на карбокси-конце, варианты с усечением на амино-конце или варианты с изменением аминокислотного состава до примерно 20%, примерно 30% или примерно 40%, при условии, что фрагмент тропизма по-прежнему связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает NGF, который по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 162, или ее усеченному варианту.

**[0579]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает нейротрофин-3 (NT-3). В некоторых аспектах NT-3 представляет собой вариант нативного NT-3, например, усеченный вариант. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает полноразмерную последовательность из 119 аминокислот NT-3 (YAENKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETRCKE ARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCALSRKIGRT; SEQ ID NO: 163). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает карбокси-усеченный вариант нативного NT-3, 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 усечением на карбокси-конце, варианты с усечением на амино-конце или варианты с изменением аминокислотного состава до примерно 20%, примерно 30% или примерно 40%, при условии, что фрагмент тропизма по-прежнему связывается с рецептором TrkC с высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает NT-3, который по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей

мере на около 99% или на около 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 163, или ее усеченному варианту.

**[0580]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает нейротрофин-4 (NT-4). В некоторых аспектах NT-4 представляет собой вариант нативного NT-4, например, усеченный вариант. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма включает полноразмерную последовательность из 130 аминокислот NT-4 (GVSETAPASRRGELAVCDAVSGWVTDRRTAVDLRGREVEVLGEVPAAGGSPLRQYFF ETRCKADNAEEGGPGAGGGGCRGVDRRHVSECKAKQSYVRALTADAQGRVGVWRWIRIDTACVCTLLSRTGRA; SEQ ID NO: 164). В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает карбокси-усеченный вариант нативного NT-4, 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 усечением на карбокси-конце, варианты с усечением на аминоконце или варианты с изменением аминокислотного состава до примерно 20%, примерно 30% или примерно 40%, при условии, что фрагмент тропизма по-прежнему связывается с рецептором TrkB с высокой аффинностью. В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает NT-4, который по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 164, или ее усеченному варианту.

**[0581]** Исследования взаимосвязи структуры и функции NGF и связанных с NGF рекомбинантных молекул показали, что мутации в области 25-36 NGF, наряду с другими  $\beta$ -шпилечными петлевыми и непетлевыми областями, значительно влияют на взаимодействие NGF/NGF-рецепторов. (Ibanez et al., EMBO J., 10, 2105-2110, (1991)). Было продемонстрировано, что небольшие пептиды, полученные из этой области, имитируют NGF в связывании с контрольным рецептором и влияют на биологические реакции (LeSauter et al. J. Biol. Chem. 270, 6564-6569, 1995). Было установлено, что димеры циклических пептидов, соответствующих  $\beta$ -петлевым областям NGF, действуют как частичные агонисты NGF, поскольку они обладают как стимулирующей выживание, так и NGF-ингибирующей активностью, в то время как мономерные и линейные пептиды были неактивны (Longo et al., J. Neurosci. Res., 48, 1-17, 1997). Соответственно, в некоторых аспектах, фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает такие пептиды.

**[0582]** Также были сконструированы и синтезированы циклические пептиды, имитирующие  $\beta$ -петлевые области NGF, BDNF, NT3 и NT-4/5. Определенные мономеры,

димеры или полимеры этих циклических пептидов могут иметь трехмерную структуру, которая связывается с рецепторами нейротрофинов в физиологических условиях. Все эти структурные аналоги нейротрофинов, которые связываются с поверхностными рецепторами нервных клеток и интернализируются, 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.

**[0583]** В некоторых аспектах антитела к поверхностным рецепторам нервных клеток, способные связываться с рецепторами и интернализироваться, также могут служить в качестве фрагментов тропизма, связывающихся с рецептором Trk. Например, моноклональное антитело (MAb) 5C3 специфично для сайта стыковки NGF человеческого рецептора p140 TrkA, без перекрестной реакции с человеческим рецептором TrkB. MAb 5C3 и его Fab имитируют действие NGF *in vitro*, и изображение Trk-A-позитивных опухолей человека *in vivo* (Kramer et al., Eur. J. Cancer, 33, 2090-2091, (1997)). Молекулярное клонирование, рекомбинация, мутагенез и моделирование варибельной области MAb 5C3 показали, что три или менее из его гиперварибельных участков (CDR) имеют значение для связывания с TrkA. Анализы с рекомбинантными CDR и CDR-подобными синтетическими полипептидами показали, что они обладают агонистической биоактивностью, аналогичной интактному MAb 5C3. Моноклональное антитело MC192 к рецептору p75 также обладает нейротрофическим действием. Таким образом, эти антитела и их функционально эквивалентные фрагменты также могут служить в качестве фрагментов тропизма по настоящему изобретению.

**[0584]** В некоторых аспектах пептидомиметики, синтезированные путем включения неестественных аминокислот или других органических молекул, также могут служить фрагментами тропизма по настоящему изобретению.

**[0585]** Другие нейротрофины известны в данной области техники. Соответственно, в некоторых аспектах целевой фрагмент включает нейротрофин, выбранный из группы, состоящей из фактора роста фибробластов (FGF)-2 и других FGF, эритропоэтина (EPO), фактора роста гепатоцитов (HGF), эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста (TGF)- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), глиально-деривационного нейротрофического фактора (GDNF), невтурина, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), ерегулина, нейрегулина, артемина, персефина, интерлейкинов, гранулоцитарно-

колониестимулирующего фактора (КСФ), гранулоцитарно-макрофагального КСФ, нетринов, кардиотрофина-1, Hedgehog, лейкемического ингибирующего фактора (LIF), мидллина, плейотрофина, костных морфогенетических белков (BMP), нетринов, сапосинов, семафоринов и фактора роста стволовых клеток (SCF).

**[0586]** В некоторых аспектах, фрагмент тропизма, направляющий ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к сенсорному нейрону, содержит пептид вируса ветряной оспы (VZV).

### **III.E.3. Фрагменты тропизма, нацеленные на двигательные нейроны**

**[0587]** В некоторых аспектах описанный в настоящем документе фрагмент тропизма может направлять ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к двигательному нейрону. В некоторых аспектах, фрагмент тропизма, который направляет ВВ, например, экзосому, описанную в настоящем документе, к двигательному нейрону, включает пептид гликопротеина вируса бешенства (RVG), пептид направленного аксонального импорта (TAXI), пептид P75R или пептид Tet-C.

**[0588]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает пептид гликопротеина вируса бешенства (RVG). См., например, публикацию патентной заявки США № 2014-00294727, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. 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 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, такой как функция пептидного фрагмента связывать ацетилхолиновый рецептор и/или способность передаваться 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.

**[0589]** «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 со всей молекулой, либо с ее фрагментом. Вариант пептида RVG может содержать мутацию или модификацию,

отличающуюся 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 настоящем документе. В некоторых аспектах вариант RVG может представлять собой другую изоформу SEQ ID NO: 601 или может содержать различные изомерные аминокислоты. Варианты могут представлять собой встречающиеся в природе, синтетические, рекомбинантные или химически модифицированные полинуклеотиды или полипептиды, выделенные или созданные с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Варианты RVG могут включать консервативные или неконсервативные изменения аминокислот. См., например, патент США № 9757470, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0590]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма включает пептид направленного аксонального импорта (TAXI). В некоторых аспектах пептид TAXI представляет собой циклизованный пептид TAXI последовательности SACQSQSQSMRCGGG (SEQ ID NO: 602). См., например, Sellers et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113:2514-2519 и патент США № 9056892, которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки. Транспортные пептиды TAXI, описанные в настоящем документе, могут иметь любую длину. Как правило, длина транспортного пептида составляет от 6 до 50 аминокислот, более типично - от 10 до 20 аминокислот. В некоторых аспектах транспортный пептид TAXI включает аминокислотную последовательность QSQSQMR (SEQ ID NO: 603), ASGAQAR (SEQ ID NO: 604), PF или TSTAPHLRLRLTSR (SEQ ID NO: 605). При необходимости, транспортный пептид TAXI дополнительно содержит фланкирующую последовательность для облегчения встраивания в конструкцию 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 ядро. Например, пептид, облегчающий доставку в ядро, является сигналом ядерной локализации (NLS). Обычно этот сигнал состоит из нескольких коротких последовательностей положительно заряженных лизинов или аргининов, таких как PPKRKKV (SEQ ID NO: 606). В одном аспекте NLS имеет аминокислотную последовательность PPKRKKV (SEQ ID NO: 607).

**[0591]** В некоторых аспектах фрагмент тропизма по настоящему изобретению включает челночный пептид ГЭБ, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 608-627 (см. ниже) и любую их комбинацию. 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 в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

SEQ ID	Пептид	Последовательность
--------	--------	--------------------

NO		
608	Ангиопептид-2	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH
609	АpoB (3371–3409)	SSVIDALQYKLEGTTRLTRK- RGLKLATALSLSNKFVEGS
610	АpoE (159–167) <sub>2</sub>	(LRKLRKRL) <sub>2</sub>
611	Пептид-22	Ac-C(&)MPRLRGC(&)-NH <sub>2</sub>
612	THR	THRPPMWSPVWP-NH <sub>2</sub>
613	ретро-энантио THR	pwvpswmpprht-NH <sub>2</sub>
614	CRT	C(&)RTIGPSVC(&)
615	Лептин30	YQQILTSMPSRNVIQISND-LENLRDLLHVL
616	RVG29	YTIWMPENPRPGTPCDIFT-NSRGKRASNG-OH
617	<sup>D</sup> CDX	GreirtGraerwsekf-OH
618	Апамин	C(& <sub>1</sub> )NC(& <sub>2</sub> )KAPETALC(& <sub>1</sub> )-AR-RC(& <sub>2</sub> )QQH- NH <sub>2</sub>
619	MiniAp-4	[Dap](&)KAPETALD(&)
620	GSH	γ-L-глутамил-CG-OH
621	G23	HLNILSTLWKYRC
622	g7	GFtGFLS(O-β-Glc)-NH <sub>2</sub>
623	TGN	TGNYKALHPHNG
624	TAT (47–57)	YGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub>
625	SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
626	Дикетопиперазины	&(N-MePhe)–(N-MePhe)дикето-пиперазины
627	PhPro	(Фенилпролин) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>

Номенклатура циклических пептидов (&) адаптирована к 3-буквенному коду аминокислот из описанного в Spengler *et al. Pept. Res.*, 2005, **65**, 550–555

[Dap] обозначает диаминопропионовую кислоту.

### III.F. Антифагоцитарный сигнал

[0592] Клиренс введенных ВВ, *например*, экзосом, иммунной системой организма может снизить эффективность терапии с помощью введенных ВВ, *например*, экзосом. В некоторых аспектах поверхность ВВ, *например*, экзосомы, модифицируют для ограничения или блокирования поглощения ВВ, *например*, экзосомы, клетками иммунной системы, *например*, макрофагами. В некоторых аспектах поверхность ВВ, *например*, экзосомы, модифицируют 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).

**[0593]** Поверхностные антигены, применимые в настоящем изобретении, включают, помимо прочего, антигены, которые маркируют клетку как «аутологичную» клетку. В некоторых аспектах поверхностный антиген включает антифагоцитарный сигнал. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал выбран из CD47, CD24, их фрагмента и любой их комбинации. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал включает CD24, например, человеческий CD24. В некоторых аспектах антифагоцитарный сигнал включает фрагмент CD24, например, человеческого CD24. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии CD47 или его фрагмента на внешней поверхности ВВ, например, экзосомы.

**[0594]** CD47, также называемый поверхностным антигеном лейкоцитов CD47 и белком, связанным с интегрином (IAP, англ.: integrin associated protein), как используется в настоящем документе, является трансмембранным белком, который обнаруживается на многих клетках организма. CD47 часто называют сигнал «не ешь меня», поскольку он сигнализирует иммунным клеткам, в частности миелоидным клеткам, что конкретная клетка, экспрессирующая CD47, не является чужеродной клеткой. CD47 является рецептором для SIRPA, связывание с которым предотвращает созревание незрелых дендритных клеток и подавляет выработку цитокинов зрелыми дендритными клетками. Взаимодействие CD47 с SIRPG опосредует клеточно-клеточную адгезию, усиливает суперантиген-зависимую Т-клеточно-опосредованную пролиферацию и костимулирует активацию Т-клеток. Известно, что CD47 также играет роль в адгезии клеток, выступая в качестве рецептора адгезии для THBS1 на тромбоцитах, 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 мембраны, вызванных вирусной инфекцией.

**[0595]** В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, описанная в настоящем документе, модифицирована для экспрессии человеческого CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы. Каноническая аминокислотная последовательность для человеческого CD47 и различных известных изоформ (UniProtKB - Q08722) представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 629-632. В некоторых аспектах, ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 629, или его фрагмент. В некоторых

аспектах, ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 630, или его фрагмент. В некоторых аспектах, ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 631, или его фрагмент. В некоторых аспектах, ВВ, *например*, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 632, или его фрагмент.

**[0596]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, модифицирована для экспрессии полномерного CD47 на поверхности ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, модифицирована для экспрессии фрагмента CD47 на поверхности ВВ, например, экзосомы, где фрагмент включает внеклеточный домен CD47, например, человеческого CD47. Любой фрагмент CD47, который сохраняет способность блокировать и/или ингибировать фагоцитоз макрофагом, может быть использован в ВВ, например, экзосомах, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах фрагмент включает аминокислоты от 19 до около 141 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-141 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент включает аминокислоты от 19 до около 135 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-135 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент включает аминокислоты от 19 до около 130 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-130 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах фрагмент включает аминокислоты от 19 до около 125 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислоты 19-125 из SEQ ID NO 629).

**[0597]** В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, имеющего идентичность последовательности 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% или по меньшей мере около 99% с аминокислотами от 19 до 141 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислотами 19-141 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, имеющего идентичность последовательности 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% или по меньшей мере около 99% с аминокислотами от 19 до 135 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислотами 19-

135 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, имеющего идентичность последовательности 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% или по меньшей мере около 99% с аминокислотами от 19 до 130 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислотами 19-130 из SEQ ID NO 629). В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, модифицирована для экспрессии полипептида, имеющего идентичность последовательности 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% или по меньшей мере около 99% с аминокислотами от 19 до 125 канонической последовательности CD47 человека (например, аминокислотами 19-125 из SEQ ID NO 629).

**[0598]** В некоторых аспектах CD47 или его фрагмент модифицирован для повышения аффинности CD47 и его лиганда SIRP $\alpha$ . В некоторых аспектах фрагмент CD47 включает в себя Velcro-CD47 (см., например, Ho et al., JBC 290:12650-63 (2015), который включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В некоторых аспектах Velcro-CD47 включает замену C15S относительно последовательности CD47 человека дикого типа (SEQ ID NO: 629).

**[0599]** 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 слит с каркасным белком. Для экспрессии CD47 или его фрагмента на поверхности ВВ, например, экзосомы, можно использовать любой каркасный белок, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосому, модифицируют для экспрессии фрагмента CD47, слитого с N-концом каркасного белка X. В некоторых аспектах ВВ, например, экзосому, модифицируют для экспрессии фрагмента CD47, слитого с N-концом PTGFRN.

**[0600]** 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.

**[0601]** 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, экзосом, экспрессирующих CD47 или его фрагмент, снижается по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95% по сравнению с поглощением миелоидными клетками ВВ, например, экзосом, которые не экспрессируют CD47 или его фрагмент.

**[0602]** 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 меньшей мере на около 5%, по

меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95% по сравнению с локализацией в печени ВВ, например, экзосом, не экспрессирующих CD47 или его фрагмент.

**[0603]** 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 период полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 4,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз или по меньшей мере в около 10 раз по сравнению с периодом полужизни *in vivo* ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент.

**[0604]** 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 ее фрагмент, в кровотоке, например, плазме. В некоторых аспектах удержание в кровотоке, например, в плазме, ВВ, например, экзосомы, экспрессирующей CD47 или его фрагмент, увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 4,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз или по меньшей мере в около 10 раз по сравнению с удержанием в кровотоке, например, в плазме, ВВ, например, экзосомы, которая не экспрессирует CD47 или его фрагмент.

**[0605]** 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 скелетные мышцы,

сердечную мышцу, диафрагму, почки, костный мозг, центральную нервную систему, легкие, спинномозговую жидкость (СМЖ) или любую их комбинацию, но не ограничиваясь ими.

#### **IV. Клетка-продуцент для получения сконструированных экзосом**

**[0606]** 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 CHO и MSC. В некоторых аспектах клетка-продуцент не является дендритной клеткой, макрофагом, В-клеткой, тучной клеткой, нейтрофилом, клеткой Бровича — Купфера, клеткой, полученной из любой из этих клеток, или любой их комбинацией.

**[0607]** Человеческие эмбриональные клетки почек 293, также часто называемые НЕК 293, НЕК-293, 293 клетки, или менее точно как клетки НЕК, являются специфической клеточной линией, первоначально полученной из клеток эмбриональной почки человека, выращенных в культуре ткани.

**[0608]** Клетки НЕК 293 были получены в 1973 году путем трансфекции культур нормальных клеток эмбриональных почек человека с помощью ДНК аденовируса 5 в лаборатории Alex van der Eb в Лейдене, Нидерланды. Клетки были культивированы и трансфицированы аденовирусом. Последующий анализ показал, что трансформация была вызвана вставкой ~4,5 тысяч пар нуклеотидов из левого плеча вирусного генома, которые были включены в хромосому 19 человека.

**[0609]** Комплексное исследование геномов и транскриптомов клеток НЕК 293 и пяти производных клеточных линий позволило сравнить транскриптомы НЕК 293 с транскриптомами почек, надпочечников, гипофиза и центральной нервной ткани человека. Паттерн НЕК 293 больше всего напоминал паттерн клеток надпочечников, которые обладают многими свойствами нейронов.

**[0610]** Клетки НЕК 293 имеют сложный кариотип, демонстрируя две или более копий каждой хромосомы и имея модальное число хромосом 64. Они описываются как гипотриплоидные, содержащие менее чем в три раза больше хромосом, чем гаплоидные гаметы человека. Хромосомные аномалии включают в себя в общей сложности три копии X-хромосомы и четыре копии хромосомы 17 и хромосомы 22.

**[0611]** Варианты клеток НЕК293, применимые для получения ВВ, включают, помимо прочего, НЕК 293F, НЕК 293FT и НЕК 293T.

**[0612]** Клетка-продуцент может быть генетически модифицирована для включения

экзогенных последовательностей, кодирующих АСО, для получения ВВ, описанных в настоящем документе. Генетически модифицированная клетка-продуцент 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-продуцента, в сайт-мишень или в случайный сайт. В некоторых аспектах генерируется стабильная клеточная линия для получения экзосом, сконструированных в просвете.

**[0613]** Экзогенные последовательности могут быть вставлены в геномную последовательность клетки-продуцента, расположенную внутри, против хода транскрипции (5'-конец) или по ходу транскрипции (3'-конец) эндогенной последовательности, кодирующей белок экзосомы. Для введения экзогенных последовательностей в клетку-продуцент можно использовать различные способы, известные в данной области. Например, клетки, модифицированные с использованием различных способов редактирования генов (*например*, способы, использующие гомологичную рекомбинацию, систему, опосредованную транспозоном, систему loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN), входят в объем данного описания.

**[0614]** 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.

**[0615]** В некоторых аспектах клетка-продуцент может быть модифицирована, *например*, трансфицирована, одним или более векторами, кодирующими каркасный фрагмент, связанный с АСО.

**[0616]** В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосомы по настоящему раскрытию (*например*, сконструированные на поверхности и/или сконструированные в просвете экзосомы) могут быть получены из клетки, трансформированной последовательностью, кодирующей полноразмерный зрелый каркасный фрагмент, раскрытый в данном документе, или каркасный фрагмент, связанный с АСО. 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

[0617] 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.

[0618] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит один или более терапевтических агентов и экзосому, описанные в данном документе. В определенных аспектах ВВ, *например*, экзосомы, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах АСО и один или более дополнительных терапевтических агентов по настоящему изобретению могут быть введены в одной и той же ВВ. В других аспектах АСО и один или более дополнительных терапевтических агентов по настоящему изобретению вводят в разных ВВ. Например, настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, содержащую АСО, 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).

[0619] 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 (ПЭГ).

**[0620]** 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 состояния, для лечения которых предназначены ВВ, *например*, экзосомы.

**[0621]** 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 (ЭДТК); 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.

**[0622]** 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, Cremophor 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.

**[0623]** Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения ВВ, *например* экзосом, в эффективном количестве в подходящем растворителе с одним или более ингредиентами, перечисленными в настоящем документе или известными в данной области, по 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 позволяют получить порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его предварительно стерильно-отфильтрованного 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.

**[0624]** 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.

**[0625]** В определенных аспектах фармацевтическая композиция, содержащая ВВ, *например*, экзосомы, вводят 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.

**[0626]** 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.

**[0627]** 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.

**[0628]** 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.

**[0629]** В некоторых аспектах фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включают фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах, фармацевтически приемлемая соль включает натриевую соль, калиевую соль,

аммониевую соль или любую их комбинацию.

**[0630]** Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат ВВ, *например*, экзосомы, описанные в настоящем 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 STAT6. В некоторых аспектах антагонист STAT6 представляет собой любой антагонист STAT6, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах дополнительный антагонист STAT6 представляет собой анти-STAT6 антитело. В некоторых аспектах дополнительный антагонист STAT6 представляет собой низкомолекулярное вещество. В некоторых аспектах дополнительный антагонист STAT6 представляет собой низкомолекулярное вещество.

**[0631]** В некоторых аспектах дополнительный антагонист STAT6 включает АСО. В некоторых аспектах дополнительный антагонист STAT6 включает любой АСО, описанный в настоящем документе.

**[0632]** Предложены лекарственные формы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую ВВ, *например*, экзосомы, описанные в настоящем документе. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для внутривенной инъекции. В некоторых аспектах лекарственная форма составлена в виде жидкой суспензии для интратуморальной инъекции.

**[0633]** 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.

**[0634]** 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.

**[0635]** 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, 10 000 или более 10 000 мЗв.

## **VI. Наборы**

**[0636]** 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 способом, описанным в настоящем документе. В некоторых аспектах набор предназначен для применения в лечении заболевания или состояния, связанного с кроветворением. В некоторых аспектах набор представляет собой диагностический набор.

## **VII. Способы получения ВВ**

[0637] 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, где клетка-продуцент содержит один или более компонентов ВВ, *например*, экзосомы (*например*, АСО); и необязательно выделение полученной ВВ, *например*, экзосомы. В некоторых аспектах способ включает: модификацию клетки-продуцента путем введения одного или более компонентов ВВ, описанной в данном документе (*например*, АСО); получение ВВ, *например*, экзосомы, из модифицированной клетки-продуцента; и необязательно выделение полученной ВВ, *например*, экзосомы. В дальнейших аспектах способ включает получение ВВ из клетки-продуцента; выделение полученного ВВ; и модификации выделенной ВВ. В некоторых аспектах способ дополнительно включает включение выделенной ВВ в фармацевтическую композицию.

### **VII.A. Способы модификации клетки-продуцента**

[0638] Как описано выше, в некоторых аспектах способ получения ВВ включает модификацию клетки-продуцента одним или более фрагментами (*например*, АСО). В некоторых аспектах один или более фрагментов содержат АСО. В некоторых аспектах один или более фрагментов дополнительно содержат каркасный фрагмент, описанный в данном документе (*например*, каркас X или каркас Y).

[0639] 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 СВВЕС, 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<sup>®</sup>, клетки амниоцитов CAP<sup>®</sup>, 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.

**[0640]** В некоторых аспектах клетка-продуцент не является иммунной клеткой, такой как антигенпрезентирующая клетка, Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер (NK-клетка), макрофаг, Т-хелперная клетка или регуляторная Т-клетка (клетка Treg). В других аспектах клетка-продуцент не является антигенпрезентирующей клеткой (*например*, дендритными клетками, макрофагами, В-клетками, тучными клетками, нейтрофилами, клеткой Купфера — Бровича или клеткой, полученной из любых таких клеток).

**[0641]** В некоторых аспектах один или более фрагментов могут представлять собой трансген или мРНК и введены в клетку-продуцент путем трансфекции, вирусной трансдукции, электропорации, экструзии, обработки ультразвуком, слияния клеток или других способов, которые известны специалистам в данной области техники.

**[0642]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент посредством трансфекции. В некоторых аспектах один или несколько фрагментов могут быть введены подходящие клетки-продуценты с использованием 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 полибрен, 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.

**[0643]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством вирусной трансдукции. В качестве носителей для переноса генов можно использовать ряд вирусов, включая вирус мышиноного 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.

**[0644]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся 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.

**[0645]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством микроинъекции. В некоторых аспектах для введения одного или более фрагментов в клетку-продуцент на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

**[0646]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством экструзии.

**[0647]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в клетку-продуцент посредством соникации. В некоторых аспектах клетку-продуцент подвергают воздействию звуковых волн высокой интенсивности, вызывающих временное разрушение клеточной мембраны, что позволяет загружать один или более фрагментов.

**[0648]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся 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 (ПЭГ). В дополнительных аспектах для

слияния клеток-продуцентов используют вирус Сендай.

**[0649]** 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.

**[0650]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в клетку-продуцент путем обработки детергентами. 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.

**[0651]** В некоторых аспектах один или более фрагментов введены в клетку-продуцент посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В определенных аспектах клетки-продуценты имеют поверхностный рецептор, который при связывании с одним или более фрагментами вызывает интернализацию рецептора и связанных фрагментов.

**[0652]** 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.

**[0653]** 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**

**[0654]** В некоторых аспектах способ получения ВВ, например, экзосомы, содержит модификацию выделенной ВВ путем прямого введения одного или более фрагментов в ВВ. В некоторых аспектах один или более фрагментов содержат АСО. В некоторых аспектах один или более фрагментов содержат каркасный фрагмент, описанный в данном документе (*например*, каркас X или каркас Y).

**[0655]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в ВВ посредством трансфекции. В некоторых аспектах один или несколько фрагментов могут быть введены в 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 полибрен, могут использоваться для введения одного или более фрагментов в ВВ.

**[0656]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в ВВ посредством электропорации. В некоторых аспектах ВВ подвергаются воздействию электрического поля, которое вызывает временные отверстия в мембране ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

**[0657]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в ВВ посредством микроинъекции. В некоторых аспектах для введения одного или более фрагментов ВВ на микроскопическом уровне можно использовать стеклянную микропипетку.

**[0658]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в ВВ посредством экструзии.

**[0659]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводятся в ВВ посредством соникации. В некоторых аспектах ВВ воздействуют звуковыми волнами высокой интенсивности, вызывающими временное разрушение мембраны ВВ, что позволяет загружать один или более фрагментов.

**[0660]** 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.

**[0661]** 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.

**[0662]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в ВВ путем гипотонического лизиса. В таких аспектах ВВ 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.

**[0663]** В некоторых аспектах один или более фрагментов вводят в ВВ путем обработки детергентами. В некоторых 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.

**[0664]** 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.

**[0665]** 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.

**[0666]** 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**

**[0667]** В некоторых аспектах способы получения ВВ, описанные 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.*).

**[0668]** 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.

**[0669]** В некоторых аспектах для выделения ВВ можно использовать эксклюзионную хроматографию. Методы эксклюзионной хроматографии по размеру известны в данной области техники. В настоящем документе приведены примерные, не ограничивающие методы. В некоторых аспектах выделяют долю свободного объема, которая содержит представляющие интерес ВВ. Далее, в некоторых аспектах, ВВ могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения методами центрифугирования (из одной или более фракций хроматографии), как это общеизвестно в данной области техники. В некоторых аспектах, например, для дальнейшего выделения внеклеточных везикул может быть использовано центрифугирование в градиенте плотности. 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.

**[0670]** 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.

**[0671]** Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* 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, 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

### **VIII. Способы применения**

**[0672]** В некоторых 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 АСО по настоящему изобретению). Как описано в настоящем документе, АСО, применимые для настоящего изобретения, могут специфически гибридизоваться с одной или более областями транскрипта *STAT6* (*например*, пре-мРНК или мРНК), что приводит к снижению и/или ингибированию экспрессии белка STAT6 в клетке. Соответственно, ВВ (*например*, экзосомы), содержащие такие АСО (*например*, ВВ, описанные в настоящем документе), могут быть полезны для профилактики и/или лечения любого заболевания или расстройства, связанного с повышенной экспрессией белка STAT6.

**[0673]** В некоторых аспектах заболевание или расстройство, которое можно лечить с помощью способов по изобретению, включает рак. В некоторых аспектах рак связан с повышенной экспрессией белка STAT6. Неограничивающие примеры раковых заболеваний, которые можно лечить с помощью настоящего изобретения, включают колоректальный рак, рак легких (*например*, немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), рак поджелудочной железы (*например*, протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDAC)), лейкемию, рак матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак желчных протоков, рак желудка или любую их комбинацию. В некоторых аспектах рак выбран из аденокарциномы толстой кишки, аденокарциномы прямой кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (PDAC), серозной цистаденокарциномы яичников, острой миелидной лейкемии, герминогенных опухолей яичек, аденокарциномы легких, глиомы мозга низшего класса, глиобластомы мультиформной, увеальной меланомы, карциномы щитовидной железы, карциномы

эндометрия тела матки, карциносаркомы матки, феохромоцитомы, параганглиомы и любой их комбинации. В некоторых аспектах рак представляет собой рак с высоким содержанием миелоидов. В некоторых аспектах рак включает рак печени. В некоторых аспектах рак включает гепатоцеллюлярный рак (ГЦР). В некоторых аспектах рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы (ПАПЖ), в некоторых аспектах рак включает колоректальную карциному (КРК). В некоторых аспектах рак включает рак яичников. В некоторых аспектах рак включает лептоменингеальный рак.

**[0674]** При введении субъекту, страдающему раком, в определенных аспектах ВВ (*например* экзосомы) по настоящему изобретению могут активировать иммунный ответ и усиливать нацеливание на опухоль иммунной системы субъекта. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению, характеризуется инфильтрацией лейкоцитов (Т-клеток, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов) в микроокружение опухоли или так называемые «горячие опухоли» или «воспалительные опухоли». В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению, характеризуется низкими уровнями или неопределяемыми уровнями инфильтрации лейкоцитов в микроокружение опухоли или так называемые «холодные опухоли» или «невоспалительные опухоли». В некоторых аспектах ВВ, например, экзосома, вводится в количестве и в течение времени, достаточных для превращения «холодной опухоли» в «горячую опухоль», *т.е.* указанное введение приводит к инфильтрации лейкоцитов (таких как Т-клеток) в микроокружение опухоли. В 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.

**[0675]** 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.

**[0676]** В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят внутриаартериально в кровеносную систему субъекта. В некоторых аспектах ВВ инфузируют в подходящей жидкости и вводят в артерию субъекта.

**[0677]** 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 включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Таким образом, некоторые аспекты настоящего изобретения направлены на способы введения ВВ, *например*, экзосомы, субъекту, нуждающемуся в этом, включающие введение ВВ, *например*, экзосомы, субъекту путем интратекальной инъекции с последующим приложением механической конвективной силы к туловищу субъекта. В некоторых аспектах механическая конвективная сила достигается с помощью высокочастотного осциллирующего дыхательного аппарата грудной стенки или пояснично-грудного отдела (*например*, умный жилет или умное обертывание, ELECTROMED INC, Нью-Прага, штат Массачусетс, США). В некоторых аспектах механическая конвективная сила, например, осциллирующий жилет, способствует распространению интратекально дозированных ВВ, *например*, экзосом, дальше по нерву, что позволяет улучшить доставку ВВ, *например*, экзосом, к нервам.

**[0678]** В некоторых аспектах внутри- и транскомпаратментальным биораспределением экзосом можно управлять с помощью экзогенных экстракорпоральных сил, действующих на субъект после компартментной доставки экзосом. Это включает в себя применение механической конвекции, например, путем нанесения ударов, вибрации, встряхивания или массажа какого-либо участка тела или всего тела. После интратекального дозирования, например, применение вибрации грудной стенки с помощью нескольких средств, включая осциллирующую механическую рубашку, может распространить биораспределение экзосом вдоль невраксиса или вдоль черепных и спинномозговых нервов, что может быть полезно при лечении нервных расстройств с помощью экзосом, переносящих лекарственные препараты.

**[0679]** В некоторых аспектах для удаления экзосом и других материалов из спинномозговой жидкости интратекального пространства в периферическую циркуляцию может использоваться приложение внешних механических конвективных сил с помощью осциллирующей рубашки или других подобных средств. Этот аспект может помочь удалить эндогенные токсичные экзосомы и другие вредные макромолекулы, такие как бета-амилоид, тау, альфа-синуклеин, TDP43, нейрофиламент и избыток спинномозговой жидкости из интратекального пространства на периферию для устранения.

**[0680]** В некоторых аспектах экзосомы, доставленные интрацеребровентрикулярным путем, могут транслоцироваться по всему невральному аппарату путем одновременного включения поясничной пункции и обеспечения

вентрикуло-поясничной перфузии, при которой дополнительная жидкость вливается в желудочки после дозирования экзосом, позволяя при этом существующему невращающему столбу ЦСЖ выйти через поясничную пункцию. Вентрикуло-поясничная перфузия может позволить ИЦВ-дозированным экзосомам распространиться по всему невральному аппарату и полностью покрыть субарахноидальное пространство для лечения лептоменингеального рака и других заболеваний.

**[0681]** В некоторых аспектах применение внешнего экстракорпорального фокусированного ультразвука, тепловой энергии (тепла) или холода может быть использовано для манипулирования компартментной фармакокинетикой и свойствами высвобождения лекарств из экзосом, созданных таким образом, чтобы быть чувствительными к этим явлениям.

**[0682]** В некоторых аспектах внутрикомпарментальное поведение и биораспределение экзосом, содержащих парамагнитный материал, можно регулировать путем внешнего применения магнитов или магнитного поля.

**[0683]** В некоторых аспектах ВВ вводят путем инъекции в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство, чтобы они достигли спинномозговой жидкости (СМЖ).

**[0684]** В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосомы) вводят интратуморально в одну или более опухолей субъекта.

**[0685]** 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.

**[0686]** 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 в лимфатическую систему. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в тимусе, селезенке и/или костном мозге. В некоторых аспектах внутрибрюшинное введение приводит к распределению ВВ в 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.

**[0687]** В некоторых аспектах 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 субтеноновского, заднего субтеноновского и ретробульбарного введения.

### **VIII.A. Способы лечения опухоли головного мозга**

**[0688]** Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения опухоли головного мозга у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых аспектах способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества ВВ, *например*, экзосомы, содержащей АСО, как описано в настоящем документе. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, способна осуществлять целевую доставку терапевтического агента, *например*, АСО, как описано в настоящем документе, в ЦНС для лечения опухоли мозга. В некоторых аспектах ВВ, *например*, экзосома, способна стимулировать иммунный ответ у субъекта, тем самым усиливая иммунный ответ субъекта против нейроиммунологического расстройства. В некоторых аспектах композицию вводят субъекту интратуморально или интратекально.

**[0689]** Также в настоящем документе представлены способы предотвращения метастазирования опухоли головного мозга у субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиций, описанных в настоящем документе, где композиция способна предотвратить опухоль мозга в одном месте у субъекта от стимулирования роста одной или более опухолей в другом месте у субъекта. В некоторых аспектах композицию вводят интратуморально или интратекально в первую опухоль в одном месте, и композиция, введенная в первую опухоль, предотвращает метастазирование одной или более опухолей во втором месте.

**[0690]** В некоторых аспектах введение ВВ, *например*, экзосомы, описанной в настоящем документе, ингибирует и/или уменьшает рост опухоли мозга у субъекта. В некоторых аспектах рост опухоли мозга (*например*, объем или вес опухоли) уменьшается по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или на около 100% по сравнению с эталоном (*например*, объемом опухоли у соответствующего субъекта после введения ВВ, *например*, экзосомы, без АСО).

**[0691]** Как используется в настоящем документе, термин «опухоль головного мозга» относится к аномальному росту клеток внутри мозга (*например*, в менинге). Опухоли головного мозга можно разделить на первичные и вторичные. «Первичная опухоль

головного мозга» относится к опухолям головного мозга, возникающим внутри мозга. «Вторичная опухоль мозга» относится к опухолям головного мозга, которые являются результатом метастазирования (*т.е.* распространения) в головной мозг раковых клеток, возникших в первичных местах вне мозга. Если не указано иное, термин «опухоль мозга» может относиться как к первичным, так и к вторичным опухолям мозга.

**[0692]** В некоторых аспектах опухоль мозга, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает акустическую неврому, карциному сосудистого сплетения, краниофарингиому, эмбриональную опухоль, глиому, медуллобластому, менингиому, детскую опухоль мозга, пинеобластому, опухоль гипофиза или их комбинации.

**[0693]** В некоторых аспектах опухоль мозга, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает глиому. Как используется в настоящем документе, термин «глиома» относится к типу опухоли, которая начинается в глиальных клетках мозга или позвоночника. В некоторых аспектах глиома может быть классифицирована по определенному типу клеток, с которыми она имеет общие гистологические признаки. Соответственно, глиома, которую можно лечить с помощью ВВ (*например*, экзосомами), описанными в настоящем документе, может быть классифицирована как эпендимома (эпендимальные клетки), астроцитомы (астроциты), олигодендроглиома (олигодендроциты), глиома ствола мозга (*например*, диффузная внутренняя понтинная глиома), глиома зрительного нерва, смешанная глиома, олигоастроцитомы или любая их комбинация. В некоторых аспектах астроцитомы включают мультиформную глиобластому (МГБ).

**[0694]** Глиомы, описанные в настоящем документе, могут быть дополнительно классифицированы в соответствии с их классом, который определяется при патологоанатомической оценке опухоли. В некоторых аспектах невропатологическая оценка и диагностика образцов опухолей головного мозга проводится в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы ВОЗ. В некоторых аспектах глиома, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, представляет собой глиому низкой степени злокачественности. «Глиома низкой степени злокачественности» [II степень злокачественности по ВОЗ] являются хорошо дифференцированными (не анапластическими), имеют тенденцию к доброкачественному течению и предвещают лучший прогноз для пациента. Однако в некоторых аспектах глиомы низкой степени злокачественности могут иметь равномерную частоту рецидивов и повышать степень злокачественности с течением времени, поэтому их следует классифицировать как злокачественные. В некоторых аспектах глиома, которую можно лечить, включает в себя

глиому высокой степени злокачественности. «Глиомы высокой степени злокачественности» [III-IV степень злокачественности по ВОЗ] являются недифференцированными или анапластическими, злокачественными и имеют худший прогноз. Из многочисленных используемых систем классификации наиболее распространенной является система классификации астроцитомы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), согласно которой опухоли классифицируются от I (наименее прогрессирующее заболевание - наилучший прогноз) до IV (наиболее прогрессирующее заболевание - наихудший прогноз) степени злокачественности. Неограничивающие примеры глиомы высокой степени злокачественности включают анапластические астроцитомы и мультиформную глиобластому.

**[0695]** В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), описанная в настоящем документе, может быть использована для лечения глиомы I, II, III, IV степени злокачественности или их комбинаций, как определено в соответствии с системой классификации ВОЗ. В некоторых аспектах ВВ (*например*, экзосома), описанная в настоящем документе, может быть использована для лечения любого типа глиомы.

**[0696]** В некоторых аспектах глиома, поддающаяся лечению с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой диффузная глиома ствола головного мозга (DIPG, англ.: diffuse intrinsic pontine glioma), тип глиомы ствола головного мозга. Диффузная глиома ствола головного мозга в первую очередь поражает детей, обычно в возрасте от 5 до 7 лет. Медиана времени выживания при DIPG составляет менее 12 месяцев. Хирургическое вмешательство с целью удаления опухоли обычно невозможно или нецелесообразно в случае DIPG. По своей природе эти опухоли диффузно распространяются по всему стволу головного мозга, разрастаясь между нормальными нервными клетками.

**[0697]** В других аспектах глиома, поддающаяся лечению с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой глиому с мутациями IDH1 и IDH2. Пациенты с глиомой с мутациями в генах IDH1 или IDH2, имеют относительно благоприятную выживаемость по сравнению с пациентами с глиомой с генами IDH1/2 дикого типа. При глиоме III степени злокачественности по классификации ВОЗ глиома с мутацией IDH1/2 имеет средний прогноз ~3,5 года, в то время как глиома с мутацией IDH1/2 дикого типа имеет плохой прогноз с средней общей выживаемостью 1,5 года. При глиобластоме разница больше.

**[0698]** В некоторых аспектах нейроиммунологическое расстройство, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает неопластический менингит. Как используется в настоящем документе, «неопластический менингит» относится к опухоли,

распространившейся из первоначального очага опухоли в дуральную и лептоменингеальную оболочки - тонкие тканевые мембраны, покрывающие головной и спинной мозг. В некоторых случаях в процесс могут быть вовлечены соединительнотканые оболочки нервов, которые распространяются от менингов на нервы и в нервы. Неопластический менингит также известен как карциноматозный менингит, лептоменингеальная карцинома, лептоменингеальный карциноматоз, лептоменингеальный метастаз, лептоменингеальная болезнь (ЛМД), лептоменингеальный рак, менингеальный карциноматоз и менингеальный метастаз. В некоторых аспектах неопластический менингит вызван лейкемией. В некоторых аспектах неопластический менингит вызван меланомой, раком молочной железы, легких, желудочно-кишечного тракта или их комбинациями. В некоторых аспектах неопластический менингит вызван глиомой.

**[0699]** Все литературные источники, процитированные выше, а также все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[0700]** Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

#### ПРИМЕРЫ

##### *Пример 1: Анализ in vitro снижения уровня мРНК и/или белка*

**[0701]** Примерные АСО, описанные в настоящем документе, были сконструированные специально для нацеливания на транскрипт *STAT6* (Фиг. 1). Описанные АСО будут протестированы на способность снижать экспрессию мРНК *STAT6* и/или белка *STAT6* в репортерных клеточных линиях, содержащих кодирующую последовательность *STAT6* человека выше от репортера. В качестве положительного контроля будут использовать *STAT6*-специфическую миРНК.

**[0702]** Вкратце, репортерные клеточные линии, экспрессирующие *STAT6*, будут выращены в среде клеточной культуры и высеяны на 96-луночный планшет. Затем клетки обрабатывают различными концентрациями ВВ (*например*, экзосомами), содержащими один или более АСО, описанными в настоящем документе («ВВ-АСО»). Способы получения таких ВВ представлены в других разделах настоящего изобретения. Примерно через 3 дня после обработки ВВ-АСО клетки собирают, и из них выделяют РНК и/или белок. Затем уровни экспрессии мРНК *STAT6* и/или белка *STAT6* в клетках определяют количественно с помощью таких анализов, как кПЦР и Вестерн-блоттинг.

**[0703]** Ведущий АСО будет выбран сначала с помощью *in silico* отбора на основе перекрестной реактивности альтернативных транскриптов, перекрестной реактивности

видов, специфичности для интересующего гена, наличия ОНП в АСО, длины АСО, разнообразия расположения, токсичных фрагментов и прогнозируемой аффинности связывания. Затем АСО проверяют на способность снижать (по меньшей мере на 50% при 2 нМ и менее чем на 20% при снижении GAPDH при 20 нМ) экспрессию целевого гена в клеточных линиях, трансфицированных целевой последовательностью (мРНК *STAT6*). Затем АСО проверяют на способность к снижению активности целевого гена в первичных макрофагах как минимум от двух доноров. Также будут наблюдать стабильность экспрессии конститутивных генов, разнообразие расположения последовательностей и экспрессию предполагаемых побочных эффектов после обработки. Оптимальные АСО, обладающие самой высокой активностью перепрограммирования (изменение экспрессии генов, выработка цитокинов, подавление Т-клеток) в первичных макрофагах, будут выбраны в качестве ведущих АСО.

*Пример 2: Конструирование экзосомы*

**[0704]** Для получения экзосом, описанных в данном документе, будут использовать клеточную линию эмбриональной почки человека (НЕК) (*например*, НЕК293SF). Клетки будут стабильно трансфицированы каркасом X, каркасом Y и/или якорным фрагментом, связанным с интересующим агентом.

**[0705]** После трансфекции клетки НЕК будут выращены до высокой плотности в среде определенного химического состава в течение 7 дней. Затем кондиционированные среды для культивирования клеток собирают и центрифугируют при  $300\text{--}800 \times g$  в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления клеток и крупного клеточного дебриса. В супернатант среды добавляют 1000 Ед/л реагента BENZONASE<sup>®</sup> и инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 1 часа. Супернатант собирают и в течение 30 минут центрифугируют с ускорением  $16\,000 \times g$  при температуре 4 °С для удаления остаточного клеточного дебриса и других крупных загрязнителей. Затем супернатант подвергают ультрацентрифугированию с ускорением  $133\,900 \times g$  в течение 3 часов при 4 °С для осаждения экзосом. Супернатант удаляют, и с помощью аспирации удаляют со дна пробирки все остатки среды. Осадок повторно суспендируют в 200–1000 мкл ФСБ (-Са - Mg).

**[0706]** Для дальнейшего обогащения популяций экзосом осадок обрабатывают с помощью очистки в градиенте плотности (сахароза или OPTIPREP<sup>™</sup>).

**[0707]** Для отделения фракции экзосом градиент центрифугируют при  $200\,000 \times g$  в течение 16 часов при 4 °С в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, помещенной в ротор SW 41 Ti.

[0708] С поверхностного слоя осторожно удаляют слой экзосом, разводят его в ~32,5 мл ФСБ в пробирке Ultra-Clear (344058) на 38,5 мл и снова подвергают ультрацентрифугированию при  $133\,900 \times g$  в течение 3 часов при 4 °С для осаждения очищенных экзосом. Полученный осадок повторно суспендируют в минимальном объеме ФСБ (~ 200 мкл) и хранят при 4 °С.

[0709] Для градиента OPTIPREP™ готовят 3-уровневый стерильный градиент с использованием одинаковых объемов 10%, 30% и 45% реагента OPTIPREP™ в пробирке Ultra-Clear (344059) на 12 мл, для ротора SW 41 Ti. Осадок добавляют к градиенту OPTIPREP™ и ультрацентрифугируют при  $200\,000 \times g$  в течение 16 часов при 4 °С для отделения фракции экзосом. Экзосомный слой затем осторожно собирают из верхних ~ 3 мл из пробирки.

[0710] Фракцию экзосом разводят в ~32 мл ФСБ в 38,5 мл пробирке Ultra-Clear (344058) и ультрацентрифугируют при  $133\,900 g$  в течение 3 часов при 4 °С для осаждения очищенных экзосом. Осажденные экзосомы затем ресуспендируют в минимальном объеме ФСБ (~ 200 мкл) и хранят при 4 °С до возможности использования.

### *Пример 3: Конструирование АСО*

[0711] Мышиные и человеческие АСО были сконструированные для нацеливания на экспрессию *STAT6* (Gene ID No. 6778). Целевые последовательности были выбраны с использованием референсных последовательностей NM\_001178078.2 для *STAT6* человека и NM\_009284.2 для *STAT6* мыши. Список возможных АСО был составлен для каждого гена путем заполнения АСО по всей длине образующегося транскрипта. Были созданы АСО длиной 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных оснований.

[0712] Приоритетность АСО была определена на основе следующих свойств: должны попасть во все формы сплайсинга; низкая энергия самодимеризации (активность в отношении мишени); отсутствие фрагмента GGGG (может вызвать проблемы с синтезом); менее 3 динуклеотидов CpG в олигонуклеотиде (потенциальная иммуностимуляция); менее 8 оснований палиндромной последовательности (потенциальная димеризация и иммуностимуляция); не более 2 несовпадений и не более 17 непрерывных оснований нецелевом попадании в любой ген, включая известные микроРНК и днкРНК, а также как формирующиеся, так и зрелые транскрипты; отсутствие перекрытия с повторяющимися последовательностями; и отсутствие совпадений с ОНП с MAF больше или равным 0,01 в общей популяции. Дополнительные критерии включали прогнозируемую перекрестную реактивность видов (*например*, транскрипты человека, яванского макака, макака-резуса, крысы, мыши); и нецелевой (НЦ) фильтр менее или равный 3 несовпадениям (нс) в зрелых

транскриптах, менее или равный 3 нс в длинных некодирующих транскриптах, менее или равный 3 нс в микроРНК и менее или равный 3 нс в образующихся транскриптах.

*Пример 4: Загрузка АСО в экзосомы*

[0713] АСО, нацеленные на STAT6, были загружены в экзосомы, сверхэкспрессирующие PTGFRN, как показано на ФИГ. 2А. Мышей лечили внутривенно однократной дозой экзосом 2E11, нагруженных репортерным АСО («экзоАСО»), или однократной дозой свободного репортерного АСО («свободный АСО»). Через час после введения наблюдалось повышенное поглощение экзо-АСО в CD11b<sup>+</sup> дендритных клетках, моноцитах и mMDSC в крови (ФИГ. 2B); клетках Купфера в печени (ФИГ. 2C); макрофагах красной пульпы, моноцитах и mMDSC в селезенке (фиг. 2D); и дендритных клетках и mMDSC в опухолевой ткани (ФИГ. 2E-2F), о чем свидетельствует MFI, относительно локализации свободного АСО. Поглощение экзо-АСО также было выше в костном мозге (ФИГ. 2G-2H) по сравнению с поглощением свободного АСО и отрицательных контролей (ФИГ. 2I-2L). ФИГ. 2O показали усиленное поглощение экзоАСО макрофагами M2 и M0 по сравнению со свободным АСО. На ФИГ. 2P показана экспрессия когнатных рецепторов PTGFRN в глиобластоме (GBM) в различных типах клеток с пятью мишенями, причем самая высокая экспрессия наблюдается в миелоидных клетках.

*Пример 5: Экзо-STAT6-АСО способны реполяризовать макрофаги M2*

[0714] Первичные макрофаги человека поляризовали обработкой IL4/IL10/TGFβ и обрабатывали возрастающими концентрациями экзо-STAT6-АСО (см. ФИГ. 2A). *In vitro* обработка первичных макрофагов человека экзо-STAT6-АСО вызывает дозозависимое снижение STAT6 (ФИГ. 3A), соответственно, а также снижение активности гена макрофага M2, CD163 (ФИГ. 3B). Активность была немного выше при использовании экзо-АСО по сравнению со свободными АСО. После обработки экзо-STAT6-АСО активность различных генов M2 была снижена, а активность различных генов M1 - повышена (ФИГ. 4A-4J). Кроме того, получение различных цитокинов было повышено и понижено после стимуляции липополисахаридом (ЛПС) и обработки экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 4K-4N).

[0715] Мышей BALB/c с подкожными опухолями CT26, лечили однократной внутриопухолевой дозой либо экзо-АСО, либо свободного АСО. Через час после введения поглощение экзо-АСО наблюдалось в опухолевых клетках, макрофагах, миелоидных супрессорных клетках и дендритных клетках (ФИГ. 2L-2M).

*Пример 6: Блокирование целевого гена экзо-STAT6-АСО в клетках CD11b.*

[0716] *In vivo*, первичными клетками-реципиентами для экзо-STAT6-АСО являются

клетки CD11b. Для дальнейшего измерения поглощения и эффективности блокирования экзо-АСО мышей обрабатывали экзо-STAT6-АСО и умерщвляли. Затем были выделены и обогащены CD11b<sup>+</sup> клетки (ФИГ. 5A-5F). Хотя это не было конечной точкой, объем опухоли был значительно меньше у мышей, обработанных экзо-STAT6-АСО, по сравнению с мышами, обработанными контролем скремблированным экзоАСО, и у мышей, обработанных экзо-STAT6-АСО, опухоли были меньше, чем у мышей, обработанных STAT6-свободным АСО (ФИГ. 5G). Блокирование целевых генов экзо-АСО было более выражено в клетках, обогащенных CD11b, чем в клетках, не обогащенных CD11b, после обработки экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 6A). Кроме того, экзо-АСО эффективно снижали экспрессию Arg1 в большей степени в клетках, обогащенных CD11b, чем в клетках, не обогащенных CD11b (ФИГ. 6B).

[0717] Клетки, обогащенные CD11b, обработанные экзо-STAT6-АСО, также продемонстрировали перепрограммирование макрофагов, о чем свидетельствует повышение активности различных генов M1 и снижение активности различных генов M2 (ФИГ. 7A-7V).

*Пример 7: Лечение фиброза с помощью экзо-STAT6-АСО.*

[0718] Чрезмерная активация макрофагов M2 приводит к постоянной выработке TGF $\beta$  и факторов роста, которые способствуют пролиферации миофибробластов, активации EMT/EndoMT и отложению внеклеточного матрикса. Макрофаги M2 представляют собой точку разрыва между заживлением раны и обострением профибротического процесса. Чтобы проверить, можно ли использовать экзо-STAT6-АСО для лечения фиброза у человека, первичные человеческие макрофаги M2 были поляризованы с помощью обработки IL-13/TGF $\beta$ , которые являются движущими силами фиброза. Затем клетки подвергали воздействию возрастающих концентраций STAT6-свободного АСО, экзо-STAT6-АСО или скремблированного АСО (ФИГ. 8A и 8B); и анализировали на экспрессию *STAT6* (ФИГ. 8A) или экспрессию *TGF $\beta$ 1* (ФИГ. 8B).

[0719] Чтобы проверить осуществимость доставки экзо-АСО *in vivo* с помощью интраназального введения, 6-недельных мышей обрабатывали блеомицином, чтобы вызвать фиброз легких. Через две недели мышам вводили экзо-АСО-Су5 интраназально, и через 4 часа после введения мышей умерщвляли. Мыши, индуцированные блеомицином, которым вводили экзо-АСО-Су5, показали увеличение общего потока Су5 по сравнению с наивными мышами, которым вводили экзо-АСО-Су5 («IN-наивные») и по сравнению с наивными и обработанными мышами, которым вводили отрицательный контроль PBS («C») (ФИГ. 9).

**[0720]** Наблюдалось поглощение экзосом легочными макрофагами и эндотелиальными клетками легочных капилляров как в нормальном легком, так и в ткани легких с индуцированным легочным фиброзом (ФИГ. 10А-10Н и 11А-11Н).

*Пример 8: Лечение гепатокарциномы в мышинной модели с помощью экзо-STAT6-АСО.*

**[0721]** Мыши Нера1-6 будут использоваться для проверки *in vivo* эффективности экзо-STAT6-АСО для лечения опухоли. Линия Нера1-6 представляет собой ортотопическую мышиную модель гепатокарциномы. Образцы были получены из СРО и проанализированы методом гибридизации *in situ* на экспрессию *STAT6* (ФИГ. 12А-12В и 13А-13F).

*Пример 9: Лечение карциномы толстой кишки в мышинной модели с помощью экзо-STAT6-АСО*

**[0722]** Опухолевые клетки СТ26 имплантировали подкожно в бока мышей BALB/c. Через восемь дней после имплантации мышей обрабатывали интратуморально экзо-STAT6-АСО или STAT6-свободным АСО, или внутрибрюшинно анти-PD1 антителом или анти-CSF1R антителом (n=10 мышей на группу). В качестве контроля две группы мышей получали либо скремблированный экзо-АСО, либо ФСБ. Анализ геометрических средних объемов опухолей показывает, что у мышей, получавших экзо-STAT6-АСО, рост опухоли был очень незначительным в течение 30 дней после имплантации (ФИГ. 17В). Напротив, у мышей, обработанных STAT6-свободным АСО, развились опухоли, сходные по размеру с контрольными мышами, обработанными ФСБ и скремблированным экзо-АСО.

*Пример 10: Лечение мультиформной глиобластомы в мышинной модели с использованием экзо-STAT6-АСО*

**[0723]** Мышей-носителей глиобластомы (ГБМ) интратуморально обрабатывали экзо-STAT6-АСО или STAT6-свободным АСО. В качестве контроля две группы мышей получают либо скремблированный экзо-АСО, либо ФСБ. Геометрические средние объемы опухолей измеряют по меньшей мере в течение 30 дней после имплантации. Проводят мониторинг локализации макрофагов и экспрессии маркерных генов, включая появление опухоль-инфильтрирующих макрофагов.

*Пример 11: Лечение лептоменингеального ракового заболевания (ЛРЗ) в мышинной модели с помощью экзо-STAT6-АСО*

**[0724]** Мышей с лептоменингеальным раковым заболеванием (ЛРЗ) обрабатывают интратуморально экзо-STAT6-АСО или STAT6-свободным АСО. В качестве контроля две

группы мышей получают либо скремблированный экзо-АСО, либо ФСБ. Геометрические средние объемы опухолей измеряют по меньшей мере в течение 30 дней после имплантации. Проводят мониторинг локализации макрофагов и экспрессии маркерных генов, включая появление опухоль-инфильтрирующих макрофагов.

*Пример 12: In Vitro анализ продолжительности дозы экзо-STAT6-АСО*

[0725] Чтобы определить продолжительность дозы экзо-STAT6, человеческие макрофаги M2 от двух доноров обрабатывали либо экзо-STAT6-АСО, либо STAT6-свободным АСО. Снижение мРНК и белка STAT6 (КД) анализировали через 24, 48, 72, 120 и 168 часов. Экспрессия гена STAT6 нормализовали по отношению к конститутивному гену. Максимальное снижение мРНК STAT6 наблюдалось между 3 и 5 днем (ФИГ. 21А-21G). Изменений в жизнеспособности клеток не наблюдалось ни в одной временной точке (данные не показаны). Снижение уровня мРНК STAT6 было дозозависимым, при этом самая высокая доза экзо-STAT6-АСО 2,5 мкМ поддерживала 85% снижения мРНК на 7 день (ФИГ. 22А-22В).

[0726] Снижение белка также зависело от дозы (ФИГ. 23А), а самый высокий уровень снижения белка наблюдался как 70% снижение на 7 день после экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 23В). Уровни белка STAT6 были нормализованы по сравнению с уровнем белка без обработки, конститутивный b-Актин не показал изменений в группах и временных точках

[0727] Повышенная эффективность экзо-STAT6-АСО по сравнению со STAT6-свободным АСО наблюдалась во всех временных точках, кроме 24 часов (ФИГ. 21А-21Е). Полученные данные совпадали у двух доноров.

[0728] Эти результаты показывают, что длительность снижения мРНК и белка дольше, чем обычно измеряется (48 часов). Функциональные эффекты, такие как перепрограммирование, могут быть сильнее в более поздние временные точки.

*Пример 13: In Vivo анализ продолжительности дозы экзо-STAT6-АСО*

[0729] Чтобы определить продолжительность действия дозы экзо-STAT6 *in vitro*, экзо-STAT6-АСО или STAT6-свободный АСО интратуморально вводят мышам модели СТ26. Уровни мРНК и белка STAT6 анализируют в различных временных точках в течение семи дней, например, 7 или более дней. Дозу вводимого экзо-STAT6-АСО титруют. Тестируют конструкции экзо-STAT6-АСО мыши и яванского макака.

*Пример 14: In vivo индукция провоспалительных маркеров M1 после обработки экзоАСО*

[0730] Опухоли YUMM1.7 подвергали интратуморальным микроинъекциям экзо-STAT6-АСО, STAT6-свободного АСО или скремблированного экзоАСО с использованием

платформы Comparative In Vivo Oncology (CIVO®) компании Presage Biosciences. Мышей подвергали эвтаназии через 24 часа после однократной дозы (n=6 мышей в группе). Экспрессия TNF $\alpha$  (ФИГ. 24А-24С, открытый треугольник), CD11b (ФИГ. 24D-24F, открытый треугольник), iNOS (ФИГ. 24G-24I, открытый треугольник), и F4/80 (ФИГ. 24J-24L, открытый треугольник) показана с помощью гибридизации *in situ* для опухолевых клеток, обработанных скремблированным экзоАСО (ФИГ. 24А, 24D, 24G и 24J), STAT6-свободным АСО (ФИГ. 24В, 24Е, 24Н и 24К) и экзо-STAT6-АСО (ФИГ. 24С, 24F, 24I и 24L). Каждый ряд графиков - это разные места инъекций на одной и той же опухоли. Флуоресцентный маркер слежения (ФМС; стрелки) обозначает место инъекции. Эти данные свидетельствуют об устойчивой индукции провоспалительных маркеров М1 после внутриопухолевого введения экзо-STAT6-АСО.

*Пример 15: Эффективность in vivo экзо-STAT6-АСО, вводимого мышам путем внутрибрюшинной инъекции*

**[0731]** Для проверки *in vivo* эффективности внутрибрюшинного введения экзо-STAT6-АСО использовали мышиную модель протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Мышам с опухолью вводили дозу (i) 2E11 модифицированных экзосом, содержащих каркас X и нагруженных экзо-STAT6-АСО, (ii) гемцитабина (гем; стандарт лечения), (iii) скремблированного АСО (Scr) или (iv) ФСБ в 15, 18 и 20 день после инокуляции (ФИГ. 25А-25D). Образцы рандомизировали путем первого ультразвукового исследования в день 14. Повторное ультразвуковое исследование и забор материала были проведены в день 22. Эти предварительные результаты показывают, что у мышей, получавших монотерапию экзо-STAT6-АСО, опухоль была меньше по размеру (ФИГ. 25В-25С) и весу (ФИГ. 25D) по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ и Скр) и стандартным лечением (Гем).

**[0732]** Выживание также наблюдалось у мышей с опухолями, получавших монотерапию экзо-STAT6-АСО. Мышей набирали путем повторной операции и измерения опухоли. Мышам вводили всего шесть доз (3 р/нед x2) (i) экзо-STAT6-АСО или (ii) скремблированного экзоАСО, в дозе 2E11 (7 мкг) экзоАСО/инъекция, или четыре дозы (2 р/нед x2) 100 мг/кг гемцитабина в течение 2 недель (ФИГ. 26А). Затем наблюдали за выживаемостью мышей. Мыши, получавшие экзо-STAT6-АСО, имели более высокую выживаемость по сравнению с ФСБ и экзо-скремблированным контролем (ФИГ. 26В-26D), и не наблюдалось разницы в процентной выживаемости мышей, получавших монотерапию экзо-STAT6-АСО, по сравнению с мышами, получавшими гемцитабин (ФИГ. 26В-26С).

## **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

**[0733]** 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**

**[0734]** 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 (АСО), который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6* (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3).
2. Внеклеточная везикула по п. 1, в которой АСО не является TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 89).
3. Внеклеточная везикула по п. 1 или 2, которая нацелена на клетку, выбранную из группы, состоящей из макрофага, супрессорной клетки миелоидного происхождения (MDSC), моноцита, базофила, нейтрофила, эозинофила и любой их комбинации.
4. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-3, где АСО содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2056 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидов 2059-3963 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.
5. Внеклеточная везикула по п. 4, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6*.
6. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-5, в которой АСО способен снижать экспрессию белка STAT6 в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок STAT6.
7. Внеклеточная везикула по п. 6, в которой экспрессия белка STAT6 снижена по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка STAT6 в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.
8. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-7, в которой АСО способен снижать уровень мРНК *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка

человека экспрессирует мРНК *STAT6*.

9. Внеклеточная везикула по п. 8, в которой уровень мРНК *STAT6* снижен по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.

10. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-9, в которой АСО представляет собой гэдмер, миксмер или тоталмер.

11. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-10, в которой АСО содержит один или более нуклеозидных аналогов.

12. Внеклеточная везикула по п. 11, в которой один или более из нуклеозидных аналогов 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 (АНК); 2'-фтор-АНК или бициклический нуклеозидный аналог.

13. Внеклеточная везикула по п. 11 или 12, в которой один или более нуклеозидных аналогов представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром.

14. Внеклеточная везикула по п. 13, в которой нуклеозид с модифицированным сахаром, представляет собой увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром.

15. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11-14, в которой один или более нуклеозидных аналогов включает нуклеозид, содержащий бициклический сахар.

16. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11-14, в которой один или более нуклеозидных аналогов включают заблокированную нуклеиновую кислоту (ЗНК).

17. Внеклеточная везикула по любому из пп. 11-16, в которой один или более нуклеотидных аналогов выбран из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ),  $\alpha$ -L-ЗНК,  $\beta$ -D-ЗНК, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-ЗНК, окси-ЗНК, тио-ЗНК и любой их комбинации.

18. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-17, в которой АСО содержит одно или

более нуклеотидных оснований 5'-метил-цитозина.

19. Внеклеточная везикула по любому из пп. 4-18, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) 5' нетранслируемой области (UTR); (ii) кодирующей области или (iii) 3' UTR транскрипта *STAT6*.

20. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-19, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей (i) нуклеотиды 1–700 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотиды 1000-1500 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотиды 1500-2000 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотиды 2000–2500 из SEQ ID NO: 3; (v) 2500–3000 из SEQ ID NO: 3; (vi) 3000–3700 из SEQ ID NO: 3, (vii) нуклеотиды 413–803 из SEQ ID NO: 3; (viii) нуклеотиды 952-1688 из SEQ ID NO: 3; (ix) нуклеотиды 1726-2489 из SEQ ID NO: 3; (x) нуклеотиды 2682–2912 из SEQ ID NO: 3; (xi) 2970–3203 из SEQ ID NO: 3; (xii) 3331–3561 из SEQ ID NO: 3; (xiii) нуклеотиды 463–753 из SEQ ID NO: 3; (xiv) нуклеотиды 1002-1638 из SEQ ID NO: 3; (xv) нуклеотиды 1776-2439 из SEQ ID NO: 3; (xvi) нуклеотиды 2682–2862 из SEQ ID NO: 3; (xvii) 3020–3153 из SEQ ID NO: 3; (xviii) 3381–3511 из SEQ ID NO: 3; (xix) нуклеотиды 503–713 из SEQ ID NO: 3; (xx) нуклеотиды 1042-1598 из SEQ ID NO: 3; (xxi) нуклеотиды 1816-2399 из SEQ ID NO: 3; (xxii) нуклеотиды 2722–2822 из SEQ ID NO: 3; (xxiii) 3060–3113 из SEQ ID NO: 3 или (xxiv) 3421–3471 из SEQ ID NO: 3.

21. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-20, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах (i) нуклеотидов 513-703 из SEQ ID NO: 3; (ii) нуклеотидов 1052-1588 из SEQ ID NO: 3; (iii) нуклеотидов 1826-2389 из SEQ ID NO: 3; (iv) нуклеотидов 2732-2812 из SEQ ID NO: 3; (v) 3070-3103 из SEQ ID NO: 3 или (vi) 3431-3461 из SEQ ID NO: 3.

22. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-21, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности, выбранной из последовательностей на ФИГ. 1.

23. Внеклеточная везикула по любому из пп. 14-22, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность полностью комплементарна нуклеотидной последовательности в пределах транскрипта *STAT6*.

24. Внеклеточная везикула по любому из пп. 13-31, в которой АСО содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91-193, с одним или двумя ошибками спаривания нуклеотидов.

25. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-24, в которой АСО имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкции на ФИГ. 1, где заглавная буква обозначает нуклеозид с модифицированным сахаром, а строчная буква обозначает ДНК.
26. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-25, в которой длина АСО составляет от 14 до 20 нуклеотидов.
27. Внеклеточная везикула по любому из пп. 4-26, в которой непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.
28. Внеклеточная везикула по п. 35, в которой одна или более модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатную связь.
29. Внеклеточная везикула по п. 27 или 28, в которой по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы.
30. Внеклеточная везикула по п. 29, в которой каждая из межнуклеозидных связей в АСО представляет собой фосфоротиоатную связь.
31. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-30, которая дополнительно содержит якорный фрагмент.
32. Внеклеточная везикула по п. 31, в которой АСО связан с якорным фрагментом.
33. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-32, дополнительно содержащая экзогенный нацеливающий фрагмент.
34. Внеклеточная везикула по п. 33, в которой 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 34, в которой экзогенный нацеливающий фрагмент содержит пептид.
36. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-35, в которой экзогенный нацеливающий фрагмент содержит микропротеин, сконструированный белок с анкириновым повтором (darpin), антикалин, аднектин, аптамер, молекулу пептидомиметика, природный лиганд для рецептора, верблюжьей нанотела или любую их комбинацию.
37. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-36, в которой экзогенный нацеливающий фрагмент содержит полноразмерное антитело, антитело с одним доменом,

антитело, содержащее только тяжелую цепь (V<sub>HH</sub>), одноцепочечное антитело, антитело, содержащее только тяжелую цепь, полученное из акул (VNAR), scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или любую их комбинацию.

38. Внеклеточная везикула по п. 37, в которой антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

39. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-38, в которой экзогенный 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.

40. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-39, в которой экзогенный нацеливающий фрагмент нацеливает экзосому на опухолевую клетку, дендритную клетку, Т-клетку, В-клетку, макрофаг, нейрон, гепатоцит, клетку Купфера, клетку миелоидной линии (*например*, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, гемопоэтические стволовые клетки, МКС (*например*, моноцитарные МКС или гранулоцитарные МКС)) или любую их комбинацию.

41. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-40, в которой ВВ включает каркасный фрагмент, связывающий экзогенный нацеливающий фрагмент с ВВ.

42. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-41, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас X.

43. Внеклеточная везикула по любому из пп. 33-41, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой каркас Y.

44. Внеклеточная везикула по п. 42, в которой каркас X представляет собой каркасный белок, который способен закреплять АСО на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.

45. Внеклеточная везикула по п. 42 или 44, в которой каркас X выбран из группы, состоящей из отрицательного регулятора рецептора простагландина F<sub>2</sub> (белок PTGFRN); базигина (белок BSG); члена суперсемейства иммуноглобулинов 2 (белок IGSF2); члена суперсемейства иммуноглобулинов 3 (белок IGSF3); члена суперсемейства иммуноглобулинов 8 (белок IGSF8); интегрин бета-1 (белок ITGB1); интегрин альфа-4 (белок ITGA4); тяжелой цепи антигена клеточной поверхности 4F2 (белок SLC3A2); класса белков-переносчиков АТФ (белки АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4); их функционального фрагмента и любой их комбинации.

46. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-45, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент представляет собой белок PTGFRN или его функциональный фрагмент.
47. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-46, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 302.
48. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-47, в которой якорный фрагмент и/или каркасный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 301.
49. Внеклеточная везикула по п. 43, в которой каркас Y представляет собой каркасный белок, который способен закреплять АСО на поверхности просвета ВВ и/или на внешней поверхности ВВ.
50. Внеклеточная везикула по п. 43 или 49, в которой каркас Y выбран из группы, состоящей из миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы С (белок MARCKS); миристоилированного богатого аланином субстрата протеинкиназы С типа 1 (белок MARCKSL1); кислоторастворимого белка головного мозга 1 (белок BASP1), их функционального фрагмента и любой их комбинации.
51. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43, 49 и 50, в которой каркас Y представляет собой белок BASP1 или его функциональный фрагмент.
52. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43, 49-51, в которой каркас Y содержит N-концевой домен (НД) и эффекторный домен (ЭД), при этом НД и/или ЭД связаны с поверхностью просвета ВВ.
53. Внеклеточная везикула по п. 52, в которой НД связан с поверхностью просвета экзосомы посредством миристоилирования.
54. Внеклеточная везикула по п. 52 или 53, в которой ЭД связан с поверхностью просвета экзосомы посредством ионного взаимодействия.
55. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52-53, в которой ЭД 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, в которой 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, в которой ЭД включает 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, в которой НД содержит аминокислотную последовательность, указанную в G:X<sub>2</sub>:X<sub>3</sub>:X<sub>4</sub>:X<sub>5</sub>:X<sub>6</sub>, где G представляет собой Gly; где «:» представляет собой пептидную связь; при этом каждый из X<sub>2</sub>–X<sub>6</sub> независимо представляет собой аминокислоту; и X<sub>6</sub> включает основную аминокислоту.

59. Внеклеточная везикула по п. 58, в которой:

- (i) X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (ii) X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- (iii) X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из Lys, Arg и His; или
- (v) любой комбинации из (i)-(iv).

60. Внеклеточная везикула по любому из пп. 52-59, в которой НД содержит аминокислотную последовательность G:X<sub>2</sub>:X<sub>3</sub>:X<sub>4</sub>:X<sub>5</sub>:X<sub>6</sub>, где

- (i) G обозначает Gly;
- (ii) «:» обозначает пептидную связь;
- (iii) X<sub>2</sub> обозначает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser;
- (iv) X<sub>3</sub> обозначает аминокислоту;
- (v) X<sub>4</sub> обозначает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Gln и Met;
- (vi) X<sub>5</sub> обозначает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Pro, Gly, Ala и Ser; и

- (vii) X6 обозначает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg и His.
61. Внеклеточная везикула по любому из пп. 58-60, в которой 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, в которой НД и ЭД соединены посредством линкера.
63. Внеклеточная везикула по п. 62, в которой линкер содержит одну или более аминокислот.
64. Способ по любому из пп. 52-63, в котором НД 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, в которой НД 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, в которой НД содержит аминокислотную последовательность GGKLSKK (SEQ ID NO: 411).
67. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43 и 49-66, в которой каркас Y имеет длину по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 105, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по

меньшей мере около 200 аминокислот.

68. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49-67, в которой каркас Y содержит (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSSG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

69. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49-68, в которой каркас Y состоит из (i) GGKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 446), (ii) GAKLSKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 447), (iii) GGKQSKKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 448), (iv) GGKLAKKKKGYNVN (SEQ ID NO: 449), (v) GGKLSKKKKGYSSG (SEQ ID NO: 450), (vi) GGKLSKKKKGSGGS (SEQ ID NO: 451), (vii) GGKLSKKKKSGGSG (SEQ ID NO: 452), (viii) GGKLSKKKSGGSGG (SEQ ID NO: 453), (ix) GGKLSKKSGGSGGS (SEQ ID NO: 454), (x) GGKLSKSGGSGGSV (SEQ ID NO: 455) или (xi) GAKKSKKRFSFKKS (SEQ ID NO: 456).

70. Внеклеточная везикула по пп. 43 и 49-69, в которой каркас Y не содержит Met на N-конце.

71. Внеклеточная везикула по любому из пп. 43 и 49-70, в которой каркас Y содержит миристоилированный аминокислотный остаток на N-конце каркасного белка.

72. Внеклеточная везикула по п. 71, в которой аминокислотный остаток на N-конце каркаса Y представляет собой Gly.

73. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-72, в которой АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на внешней поверхности ВВ.

74. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-73, в которой АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом на поверхности просвета ВВ.

75. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-74, в которой якорный фрагмент включает стерин, GM1, липид, витамин, низкомолекулярное вещество, пептид или их комбинацию.

76. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-74, в которой якорный фрагмент включает холестерин.

77. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-74, в которой якорный фрагмент включает фосфолипид, лизофосфолипид, жирную кислоту, витамин (например, витамин D

и/или витамин Е) или любую их комбинацию.

78. Внеклеточная везикула по любому из пп. 31-77, в которой АСО связан с якорным фрагментом и/или каркасным фрагментом посредством линкера.

79. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-78, в которой АСО связан с ВВ посредством линкера.

80. Внеклеточная везикула по п. 78 или 79, в которой линкер представляет собой полипептид.

81. Внеклеточная везикула по п. 78 или 79, в которой линкер представляет собой неполипептидный фрагмент.

82. Внеклеточная везикула по п. 78 или 79, в которой линкер включает этиленгликоль.

83. Внеклеточная везикула по п. 82, в которой линкер включает ГЭГ, ТЭГ, ПЭГ или любую их комбинацию.

84. Внеклеточная везикула по п. 78 или 79, в которой линкер включает акриловый фосфорамидит (например, ACRYDITE™), аденилирование, азид (NHS-эфир), дигоксигенин (NHS-эфир), холестерин-ТЭГ, I-LINKER™, модификатор аминогруппы (например, аминомодификатор С6, аминомодификатор С12, аминомодификатор С6 dТ или аминомодификатор Uni-Link™), алкин, 5'-гексинил, 5-октадиинил dU, биотинилирование (например, биотин, биотин (азид), биотин dТ, биотин-ТЭГ, двойной биотин, РС-биотин или дестиобиотин), тиольную модификацию (тиоловый модификатор С3 S-S, дитиоловый или тиоловый модификатор С6 S-S), или любую их комбинацию.

85. Внеклеточная везикула по любому из пп. 78-84, в котором линкер представляет собой расщепляемый линкер.

86. Внеклеточная везикула по п. 85, в которой линкер содержит валин-аланин-пара-аминобензилкарбамат или валин-цитруллин-пара-аминобензилкарбамат.

87. Внеклеточная везикула по любому из пп. 78-86, в которой 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, в которой ВВ представляет собой экзосому.

89. Антисмысловой олигонуклеотид (АСО), содержащий непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6* (SEQ ID NO: 1

или SEQ ID NO: 3).

90. АСО по п. 89, который не является TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO: 89).

91. АСО по п. 89 или 90, который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах нуклеотидов 1-2056 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, нуклеотидов 2059-3963 транскрипта *STAT6*, соответствующего нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.

92. АСО по п. 91, в котором его непрерывная нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта *STAT6*.

93. АСО по любому из пп. 89-92, который способен снижать экспрессию белка *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует белок *STAT6*.

94. АСО по п. 93, в котором экспрессия белка *STAT6* снижена по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% по сравнению с экспрессией белка *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию АСО.

95. АСО по любому из пп. 89-94, который способен снижать уровень мРНК *STAT6* в клетке человека (*например*, иммунной клетке), при этом клетка человека экспрессирует мРНК *STAT6*.

96. АСО по п. 95, в котором уровень мРНК *STAT6* снижен по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или на около 100% по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке человека, не подвергавшейся воздействию

АСО.

97. АСО по любому из пп. 91-96, который представляет собой гэтамер, миксмер или тоталмер.

98. АСО по любому из пп. 91-97, который содержит один или более нуклеозидных аналогов.

99. АСО по п. 98, в котором один или более из нуклеозидных аналогов 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 (АНК); 2'-фтор-АНК или бициклический нуклеозидный аналог (ЗНК).

100. АСО по п. 98 или 99, в котором один или более нуклеозидных аналогов представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром.

101. АСО по п. 100, в котором нуклеозид с модифицированным сахаром, представляет собой увеличивающий аффинность нуклеозид с 2'-модифицированным сахаром.

102. АСО по любому из пп. 97-101, в котором один или более нуклеозидных аналогов включает нуклеозид, содержащий бициклический сахар.

103. АСО по любому из пп. 97-102, в котором один или более нуклеозидных аналогов включают ЗНК.

104. АСО по п. 103, в котором ЗНК выбрана из группы, состоящей из затрудненного этилового нуклеозида (сEt), 2',4'-затрудненного 2'-О-метоксиэтила (сМОЕ),  $\alpha$ -L-ЗНК,  $\beta$ -D-ЗНК, нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА), амино-ЗНК, окси-ЗНК, тио-ЗНК и любой их комбинации.

105. АСО по любому из пп. 89-104, который содержит одно или более нуклеотидных оснований 5'-метил-цитозина.

106. АСО по любому из пп. 89-105, в котором АСО содержит любую из последовательностей от SEQ ID NO: 194 до SEQ ID NO: 206.

107. АСО по любому из пп. 89-106, в которой АСО имеет конструкцию, выбранную из группы, состоящей из конструкций на ФИГ. 1, где заглавная буква обозначает нуклеозид с модифицированным сахаром, а строчная буква обозначает ДНК.

108. АСО по любому из пп. 89-107, в котором длина АСО составляет от 14 до 20 нуклеотидов.

109. АСО по любому из пп. 89-108, в котором непрерывная нуклеотидная

последовательность содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.

110. АСО по п. 109, в котором одна или более модифицированных межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатную связь.

111. АСО по п. 109 или 110, в котором по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% межнуклеозидных связей модифицированы.

112. АСО по п. 111, в котором каждая из межнуклеозидных связей в АСО представляет собой фосфоротиоатную связь.

113. Конъюгат, содержащий АСО по любому из пп. 89-112, в котором АСО ковалентно присоединен по меньшей мере к одному нуклеотидному или непонуклеотидному фрагменту.

114. Конъюгат по п. 113, в котором нуклеотидный или непонуклеотидный фрагмент включает белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

115. Внеклеточная везикула, содержащая АСО по любому из пп. 89-112 или конъюгат по п. 113 или 114.

116. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточную везикулу по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, или конъюгат по п. 113 или 114, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.

117. Фармацевтическая композиция по п. 116, в которой фармацевтически приемлемая соль включает натриевую соль, калиевую соль, аммониевую соль или любую их комбинацию.

118. Фармацевтическая композиция по п. 116 или 117, которая дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

119. Фармацевтическая композиция по п. 118, в которой дополнительным терапевтическим агентом является антагонист STAT6.

120. Фармацевтическая композиция по п. 119, в которой антагонист STAT6 представляет собой химическое соединение, миРНК, кшРНК, антисмысловый олигонуклеотид, белок или любую их комбинацию.

121. Фармацевтическая композиция по п. 119 или 120, в которой антагонист STAT6 представляет собой антитело против STAT6 или его фрагмент.

122. Фармацевтическая композиция по п. 119 или 120, в которой антагонист STAT6 включает антисмысловой олигонуклеотид (АСО).
123. Набор, содержащий внеклеточную везикулу по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгат по п. 113 или 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, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгат по п. 113 или 114, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 116-122, и инструкции по применению.
125. Способ ингибирования или снижения экспрессии белка STAT6 в клетке, включающий введение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122 в клетку, экспрессирующую белок STAT6, при этом экспрессия белка STAT6 в клетке ингибируется или снижается после введения.
126. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122.
127. Применение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122 в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.
128. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгат по п. 113 или 114 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 116-122 для применения в лечении рака у субъекта, нуждающегося в этом.
129. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122, где заболевание или расстройство выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, метаболического расстройства/CVD и любой их комбинации.
130. Применение внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или

расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание или расстройство выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, метаболического расстройства/CVD и любой их комбинации.

131. Внеклеточная везикула по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгат по п. 113 или 114 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 116-122 для применения в лечении заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание или расстройство выбрано из фиброза, воспаления, нейродегенеративного заболевания, метаболического расстройства/CVD и любой их комбинации.

132. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или 130, или композиции для применения по п. 128 или 131, где АСО ингибирует или снижает экспрессию мРНК *STAT6* в клетке после введения.

133. Способ, применение или композиция для применения по п. 132, где уровень мРНК *STAT6* снижается по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или на около 100% после введения по сравнению с уровнем мРНК *STAT6* в клетке, не подвергавшейся воздействию АСО.

134. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или 130, или композиции для применения по п. 128 или 131, где экспрессия белка *STAT6* снижается по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% после введения по сравнению с экспрессией белка *STAT6* в клетке, не подвергавшейся воздействию АСО.

135. Способ по любому из пп. 125, 126 и 129, применение по п. 127 или 130, или композиция для применения по п. 128 или 131, где внеклеточную везикулу, АСО, конъюгат или фармацевтическую композицию вводят интракардиально, перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, пульморально, локально или внутрижелудочно.

136. Способ по п. 126, применение по п. 127 или композиция для применения по п. 128, где рак выбран из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы,

лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака простаты, плоскоклеточного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, лимфомы, лейкемии, рака печени, глиобластомы, меланомы, миеломы, базальноклеточного рака, аденокарциномы, рака потовых желез, рака сальных желез, папиллярного рака, папиллярных аденокарцином, цистаденокарциномы, медуллярного рака, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, рака желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбрионального рака, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака яичка, рака легкого, мелкоклеточного рака легких, рака мочевого пузыря, эпителиального рака, глиомы, глиобластомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы Ходжкина, В-клеточной лимфомы, а также любой их комбинации.

137. Способ по п. 129, применение по п. 130 или композиция для применения по п. 131, где заболевание или расстройство включает фиброз.

138. Способ по п. 129, применение по п. 130 или композиция для применения по п. 131, где заболевание или расстройство включает фиброз, выбранный из группы, состоящей из фиброза печени (NASH), цирроза, легочного фиброза, муковисцидоза, хронического язвенного колита/IBD, фиброза мочевого пузыря, фиброза почек, CAPS (синдрома Макла-Уэллса), фиброза предсердий, эндомикардиального фиброза, перенесённого инфаркта миокарда, глиального рубца, артериальной ригидности, артрофиброза, болезни Крона, контрактуры Дюпюитрена, келоидного фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, болезни Пейрони, нефрогенного системного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, ретроперитонеального фиброза, склеродермии/системного склероза, адгезивного капсулита, а также любой их комбинации.

139. Способ активации менингеальных макрофагов у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122.

140. Способ лечения рака центральной нервной системы у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122.

141. Способ индуцирования M1-поляризации менингеальных макрофагов у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122.

142. Способ индуцирования инфильтрации менингеальных макрофагов опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества внеклеточной везикулы по любому из пп. 1-88 и 115, АСО по любому из пп. 89-112, конъюгата по п. 113 или 114 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-122.

Фиг. 1

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15мерный гэпмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1053	CTGGTGACGAGGGTT	91	15	CbsTbsGbsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsdGsGbsTbsTb	1053	1067
ASO-STAT6-1359	CGCTCACACCGCTTG	92	15	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sTbsTbsGb	1359	1373
ASO-STAT6-1890	AGGCTAGTAACGTAC	93	15	AbsGbsGbs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsTbsAbsCb	1890	1904
ASO-STAT6-1892	GAAGGCTAGTAACGT	94	15	GbsAbsAbsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAsCbsGbsTb	1892	1906
ASO-STAT6-1915	GGTCCGTCGGGCTC	95	15	GbsGbsTbsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsdGsCbsTbsCb	1915	1929
ASO-STAT6-1916	AGGTTCCGTCGGGCT	96	15	AbsGbsGbsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsGbsCbsTb	1916	1930
ASO-STAT6-1917	AAGGTTCCGTCGGGC	97	15	AbsAbsGbsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsGbsCb	1917	1931
ASO-STAT6-1918	AAAGGTTCCGTCGGG	98	15	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGbsGbsGb	1918	1932
ASO-STAT6-1919	GAAAGGTTCCGTCGG	99	15	GbsAbsAbsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	1919	1933
ASO-STAT6-1920	AGAAAGGTTCCGTCG	100	15	AbsGbsAbsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsTbsCbsGb	1920	1934
ASO-STAT6-1937	AGTCGCTGAAGCGGA	101	15	AbsGbsTbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsdGs(5MdC)sGbsGbsAb	1937	1951
ASO-STAT6-1938	GAGTCGCTGAAGCGG	102	15	GbsAbsGbsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsdGsCbsGbsGb	1938	1952
ASO-STAT6-2061	CGGATTCGGTCCCC	103	15	CbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)sCbsCbsCb	2061	2075
ASO-STAT6-2062	CCGGATTCGGTCCCC	104	15	CbsCbsGbsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sCbsCbsCb	2062	2076
ASO-STAT6-2063	CCCGGATTCGGTCCC	105	15	CbsCbsCbsdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTsCbsCbsCb	2063	2077
ASO-STAT6-2064	TCCCGGATTCGGTCC	106	15	TbsCbsCbs(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsTbsCbsCb	2064	2078
ASO-STAT6-2066	GATCCCGGATTCGGT	107	15	GbsAbsTbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2080

Фиг. 1 (Продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (НТ)	15мерный гэпмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-2067	AGATCCCGGATTCGG	108	15	AbsGbsAbsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTsCbsGbsGb	2067	2081
ASO-STAT6-2068	AAGATCCCGGATTCG	109	15	AbsAbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTsCbsGbsGb	2068	2082
ASO-STAT6-2352	TGATACGGGGGGATG	110	15	TbsGbsAbsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2352	2366
ASO-STAT6-3073	CGTGTGCGCGCTGCA	111	15	CbsGbsTbsdGsdTsdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsGbsCbsAb	3073	3087
ASO-STAT6-1053	ACTGGTGACGAGGGTT	112	16	AbsCbsTbsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsdGsGbsTbsTb	1053	1068
ASO-STAT6-1054	AACTGGTGACGAGGGT	113	16	AbsAbsCbsdTsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsGbsGbsTb	1054	1069
ASO-STAT6-1356	CTCACACCGCTTGATC	114	16	CbsTbsCbsdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsdGsAbsTbsCb	1356	1371
ASO-STAT6-1847	CGGTCAGACCAGTAGC	115	16	CbsGbsGbsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsdTsAbsGbsCb	1847	1862
ASO-STAT6-1886	CTAGTAACGTAAGTGT	116	16	CbsTbsAbsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsGbsTbsTb	1886	1901
ASO-STAT6-1887	GCTAGTAACGTAAGTGT	117	16	GbsCbsTbsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sTbsGbsTb	1887	1902
ASO-STAT6-1888	GGCTAGTAACGTAAGTGT	118	16	GbsGbsCbsdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAsCbsTbsGb	1888	1903
ASO-STAT6-1889	AGGCTAGTAACGTAAGTGT	119	16	AbsGbsGbs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsdTsAbsCbsTb	1889	1904
ASO-STAT6-1890	AAGGCTAGTAACGTAAGTGT	120	16	AbsAbsGbsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sdGsTbsAbsCb	1890	1905
ASO-STAT6-1893	AAGAAGGCTAGTAACG	121	16	AbsAbsGbsdAsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsAbsCbsGb	1893	1908
ASO-STAT6-1917	AAAGGTTCCGTCGGGC	122	16	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsGbsCb	1917	1932
ASO-STAT6-1919	AGAAAGGTTCCGTCGG	123	16	AbsGbsAbsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsCbsGbsGb	1919	1934
ASO-STAT6-2056	TTCGGTCCCCCAGTGA	124	16	TbsTbsCbsdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsTbsGbsAb	2056	2071

Фиг. 1 (Продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15мерный гэпмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-2060	CGGATTCGGTCCCCCA	125	16	CbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sCbsCbsAb	2060	2075
ASO-STAT6-2066	AGATCCCGGATTCGGT	126	16	AbsGbsAbsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2081
ASO-STAT6-2070	AGCAAGATCCCGGATT	127	16	AbsGbsCbsdAsdAsdGsdAsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAbsTbsTb	2070	2085
ASO-STAT6-2351	TGATACGGGGGGATGG	128	16	TbsGbsAbsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2351	2366
ASO-STAT6-2352	TTGATACGGGGGGATG	129	16	TbsTbsGbsdAsdTsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2352	2367
ASO-STAT6-2359	AGAGGCCCTTGATACGG	130	16	AbsGbsAbsdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsdAsCbsGbsGb	2359	2374
ASO-STAT6-3633	GGGTTAGCATATGTCA	131	16	GbsGbsGbsdTsdTsdAsdGs(5MdC)sdAsdTsdAsdTsdGsTbsCbsAb	3633	3648
ASO-STAT6-673	TGGATCTCCCCTACTCG	132	17	TbsGbsGbsdAsdTsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sTbsCbsGb	673	689
ASO-STAT6-1052	ACTGGTGACGAGGGTTC	133	17	AbsCbsTbsdGsdGsdTsdGsdAs(5MdC)sdGsdAsdGsdGsdGsTbsTbsCb	1052	1068
ASO-STAT6-1356	GCTCACACCGCTTGATC	134	17	GbsCbsTbs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsdGsAbsTbsCb	1356	1372
ASO-STAT6-1357	CGCTCACACCGCTTGAT	135	17	CbsGbsCbsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGbsAbsTb	1357	1373
ASO-STAT6-1359	TCCGCTCACACCGCTTG	136	17	TbsCbsCbsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sTbsTbsGb	1359	1375
ASO-STAT6-1360	TTCCGCTCACACCGCTT	137	17	TbsTbsCbs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGsCbsTbsTb	1360	1376
ASO-STAT6-1839	ACCAGTAGCTCCGGAGA	138	17	AbsCbsCbsdAsdGsdTsdAsdGs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAbsGbsAb	1839	1855
ASO-STAT6-1848	GCCGGTCAGACCAGTAG	139	17	GbsCbsCbsdGsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsTbsAbsGb	1848	1864
ASO-STAT6-1849	AGCCGGTCAGACCAGTA	140	17	AbsGbsCbs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsGbsTbsAb	1849	1865
ASO-STAT6-1891	AGAAGGCTAGTAACGTA	141	17	AbsGbsAbsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sGbsTbsAb	1891	1907

Фиг. 1 (Продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15мерный гэпмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1915	AAGGTTCCGTCGGGCTC	142	17	AbsAbsGbsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsdGsCbsTbsCb	1915	1931
ASO-STAT6-1916	AAAGGTTCCGTCGGGCT	143	17	AbsAbsAbsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsdGsGbsCbsTb	1916	1932
ASO-STAT6-1917	GAAAGGTTCCGTCGGGC	144	17	GbsAbsAbsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sdGsGbsGbsCb	1917	1933
ASO-STAT6-1938	CTGAGTCGCTGAAGCGG	145	17	CbsTbsGbsdAsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsdGsCbsGbsGb	1938	1954
ASO-STAT6-1939	TCTGAGTCGCTGAAGCG	146	17	TbsCbsTbsdGsdAsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdGsdAsdAsGbsCbsGb	1939	1955
ASO-STAT6-2063	ATCCCGGATTCGGTCCC	147	17	AbsTbsCbs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsdTsCbsCbsCb	2063	2079
ASO-STAT6-2064	GATCCCGGATTCGGTCC	148	17	GbsAbsTbs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsdGsTbsCbsCb	2064	2080
ASO-STAT6-2065	AGATCCCGGATTCGGTC	149	17	AbsGbsAbsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sdGsGbsTbsCb	2065	2081
ASO-STAT6-2066	AAGATCCCGGATTCGGT	150	17	AbsAbsGbsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsdTs(5MdC)sGbsGbsTb	2066	2082
ASO-STAT6-2068	GCAAGATCCCGGATTCG	151	17	GbsCbsAbsdAsdGsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsTbsCbsGb	2068	2084
ASO-STAT6-2187	CGGTCATCTTGATGGTA	152	17	CbsGbsGbsdTs(5MdC)sdAsdTs(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsdGsGbsTbsAb	2187	2203
ASO-STAT6-2350	TGATACGGGGGGATGGA	153	17	TbsGbsAbsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsGbsGbsAb	2350	2366
ASO-STAT6-2351	TTGATACGGGGGGATGG	154	17	TbsTbsGbsdAsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsTbsGbsGb	2351	2367
ASO-STAT6-2352	CTTGATACGGGGGGATG	155	17	CbsTbsTbsdGsdAsdTsAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsAbsTbsGb	2352	2368
ASO-STAT6-2357	GAGGCCTTGATACGGGG	156	17	GbsAbsGbsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsAs(5MdC)sdGsGbsGbsGb	2357	2373
ASO-STAT6-513	GGGGGTCCCTCTGATATATG	157	20	GbsGbsGbsGmsGmsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdTs(5MdC)sdTsdGsdAsdTsAmsTmsAbsTbsGb	513	532
ASO-STAT6-671	GTGGATCTCCCTACTCGGT	158	20	GbsTbsGbsGmsAmsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdTsdAs(5MdC)sTmsCmsGbsGbsTb	671	690

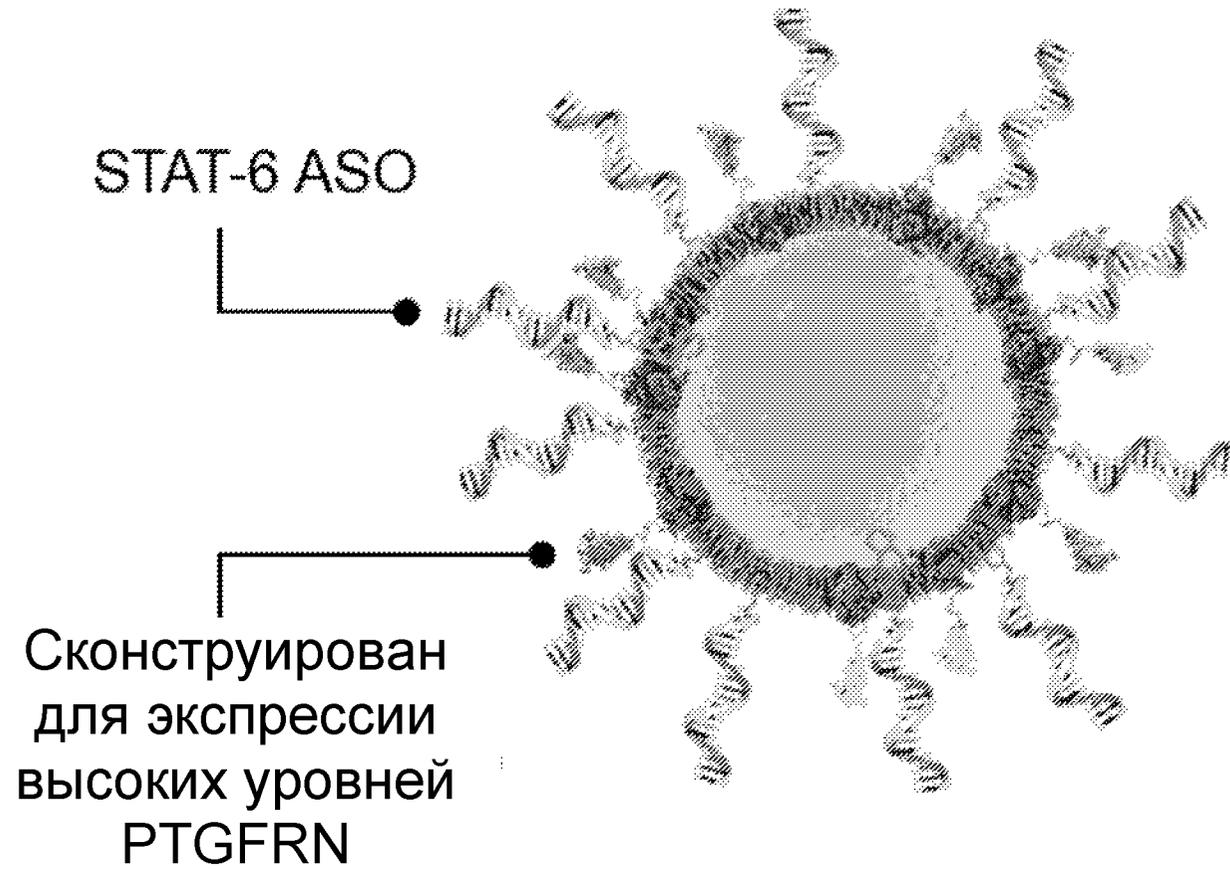
Фиг. 1 (Продолжение)

Description1	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15мерный гепмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1131	AGCCCAACAGGAATCGAAC T	159	20	AbsGbsCbsCmsCmsdAsdAs(5MdC)sdAsdGsdGsdAsdAsdTs(5MdC)sGmsAmsAbsCbsTb	1131	1150
ASO-STAT6-1354	CGCTCACACCGCTTGATCT T	160	20	CbsGbsCbsTmsCmsdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGsAmsTmsCbsTbsTb	1354	1373
ASO-STAT6-1355	CCGCTCACACCGCTTGATC T	161	20	CbsCbsGbsCmsTms(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsdTsGmsAmsTbsCbsTb	1355	1374
ASO-STAT6-1356	TCCGCTCACACCGCTTGAT C	162	20	TbsCbsCbsGmsCmsdTs(5MdC)sdAs(5MdC)sdAs(5MdC)s(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsTmsGmsAbsTbsCb	1356	1375
ASO-STAT6-1432	AGTTTGCCGGGGCCAAGTG T	163	20	AbsGbsTbsTmsTmsdGs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sdAsAmsGmsTbsGbsTb	1432	1451
ASO-STAT6-1555	AAGGGCACGCGGTCCATCT C	164	20	AbsAbsGbsGmsGms(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)sAmsTmsCbsTbsCb	1555	1574
ASO-STAT6-1556	AAAGGGCACGCGGTCCATC T	165	20	AbsAbsAbsGmsGmsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sCmsAmsTbsCbsTb	1556	1575
ASO-STAT6-1557	CAAAGGGCACGCGGTCCAT C	166	20	CbsAbsAbsAmsGmsdGsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsdTsCmsCmsAbsTbsCb	1557	1576
ASO-STAT6-1558	ACAAAGGGCACGCGGTCCA T	167	20	AbsCbsAbsAmsAmsdGsdGsdGs(5MdC)sdAs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGsdGsTmsCmsCbsAbsTb	1558	1577
ASO-STAT6-1826	CCGGAGACAGCGTTTGGTG A	168	20	CbsCbsGbsGmsAmsdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsdTsdTsGmsGmsTbsGbsAb	1826	1845
ASO-STAT6-1827	TCCGGAGACAGCGTTTGGT G	169	20	TbsCbsCbsGmsGmsdAsdGsdAs(5MdC)sdAsdGs(5MdC)sdGsdTsdTsTmsGmsGbsTbsGb	1827	1846
ASO-STAT6-1833	AGTAGCTCCGGAGACAGCG T	170	20	AbsGbsTbsAmsGms(5MdC)sdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdGsdAs(5MdC)sAmsGmsCbsGbsTb	1833	1852
ASO-STAT6-1843	CGGTCAGACCAGTAGCTCC G	171	20	CbsGbsGbsTmsCmsdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsdTsdAsdGsCmsTmsCbsCbsGb	1843	1862
ASO-STAT6-1846	AGCCGGTCAGACCAGTAGC T	172	20	AbsGbsCbsCmsGmsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsdGsTmsAmsGbsCbsTb	1846	1865
ASO-STAT6-1847	CAGCCGGTCAGACCAGTAG C	173	20	CbsAbsGbsCmsCmsdGsdGsdTs(5MdC)sdAsdGsdAs(5MdC)s(5MdC)sdAsGmsTmsAbsGbsCb	1847	1866
ASO-STAT6-1883	GCTAGTAACGTACTGTTTG C	174	20	GbsCbsTbsAmsGmsdTsAsdAs(5MdC)sdGsdTsdAs(5MdC)sdTsdGsTmsTmsTbsGbsCb	1883	1902
ASO-STAT6-1889	AAGAAGGCTAGTAACGTAC T	175	20	AbsAbsGbsAmsAmsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAs(5MdC)sGmsTmsAbsCbsTb	1889	1908

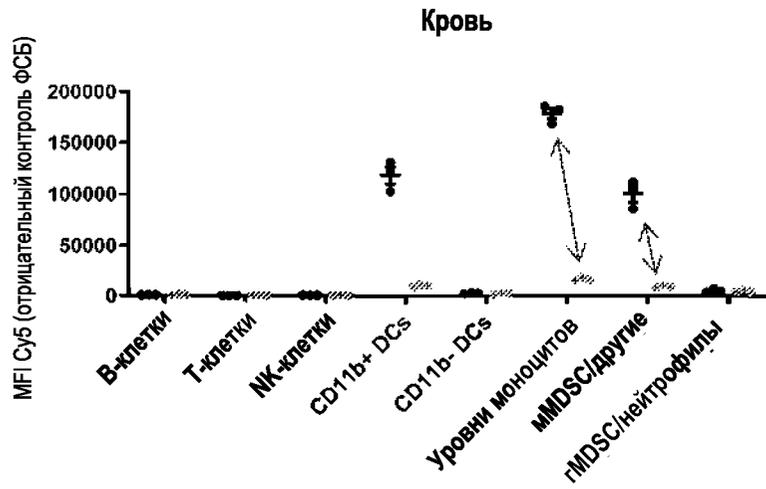
Фиг. 1 (Продолжение)

Описание	Последовательность	SEQ ID NO	Длина (HT)	15мерный гэлмер ЗНК (3-9-3), 5'-3' (номенклатура Axolab)	Положение транскрипта (SEQ ID NO: 3)	
					Начало	Стоп
ASO-STAT6-1890	GAAGAAGGCTAGTAACGTA C	176	20	GbsAbsAbsGmsAmsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsdAsCmsGmsTbsAbsCb	1890	1909
ASO-STAT6-1891	AGAAGAAGGCTAGTAACGT A	177	20	AbsGbsAbsAmsGmsdAsdAsdGsdGs(5MdC)sdTsdAsdGsdTsdAsAmsCmsGbsTbsAb	1891	1910
ASO-STAT6-1916	GAGAAAGGTTCCGTCGGGC T	178	20	GbsAbsGbsAmsAmsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTs(5MdC)sGmsGmsGbsCbsTb	1916	1935
ASO-STAT6-1917	GGAGAAAGGTTCCGTCGGG C	179	20	GbsGbsAbsGmsAmsdAsdAsdGsdGsdTsdTs(5MdC)s(5MdC)sdGsdTsCmsGmsGbsGbsCb	1917	1936
ASO-STAT6-2056	CGGATTCGGTCCCCCAGTG A	180	20	CbsGbsGbsAmsTmsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sAmsGmsTbsGbsAb	2056	2075
ASO-STAT6-2057	CCGGATTCGGTCCCCCAGT G	181	20	CbsCbsGbsGmsAmsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sCmsAmsGbsTbsGb	2057	2076
ASO-STAT6-2060	ATCCC GGATTCGGTCCCC A	182	20	AbsTbsCbsCmsCmsdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdGsdGsdTs(5MdC)sCmsCmsCbsCbsAb	2060	2079
ASO-STAT6-2062	AGATCCC GGATTCGGTCCC C	183	20	AbsGbsAbsTmsCms(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdGsdGsTmsCmsCbsCbsCb	2062	2081
ASO-STAT6-2063	AAGATCCC GGATTCGGTCC C	184	20	AbsAbsGbsAmsTms(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTs(5MdC)sdGsGmsTmsCbsCbsCb	2063	2082
ASO-STAT6-2065	GCAAGATCCC GGATTCGGT C	185	20	GbsCbsAbsAmsGmsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsdAsdTsCmsGmsGbsTbsCb	2065	2084
ASO-STAT6-2068	TGAGCAAGATCCC GGATTC G	186	20	TbsGbsAbsGmsCmsdAsdAsdGsdAsdTs(5MdC)s(5MdC)s(5MdC)sdGsdGsAmsTmsTbsCbsGb	2068	2087
ASO-STAT6-2347	TGATACGGGGGGATGGAGT G	187	20	TbsGbsAbsTmsAms(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsGsGmsAmsGbsTbsGb	2347	2366
ASO-STAT6-2348	TTGATACGGGGGGATGGAG T	188	20	TbsTbsGbsAmsTmsdAs(5MdC)sdGsdGsdGsdGsdGsdGsdAsdTsGmsGmsAbsGbsTb	2348	2367
ASO-STAT6-2358	GGGAGAGGCCTTGATACGG G	189	20	GbsGbsGbsAmsGmsdAsdGsdGs(5MdC)s(5MdC)sdTsdTsdGsdAsdTsAmsCmsGbsGbsGb	2358	2377
ASO-STAT6-2782	GATCACC AACTGGGTTGG C	190	20	GbsAbsTbsCmsAms(5MdC)s(5MdC)sdAsdAs(5MdC)sdTsdGsdGsdGsTmsTmsGbsGbsCb	2782	2801
ASO-STAT6-3070	TGC GTGTGC GCGCTGCAGG T	191	20	TbsGbsCbsGmsTmsdGsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsGsCmsAmsGbsGbsTb	3070	3089
ASO-STAT6-3071	GTGCGTGTGC GCGCTGCAG G	192	20	GbsTbsGbsCmsGmsdTs(5MdC)sdGs(5MdC)sdGs(5MdC)sdTsGsCmsAmsAbsGbsGb	3071	3090
ASO-STAT6-3431	GCCCTTGACTTTTGCATAG	193	20	GbsCbsCbsCmsTmsdTs(5MdC)sdTs(5MdC)sdTs(5MdC)sdTsGsCmsAmsTbsAbsGb	3431	3450

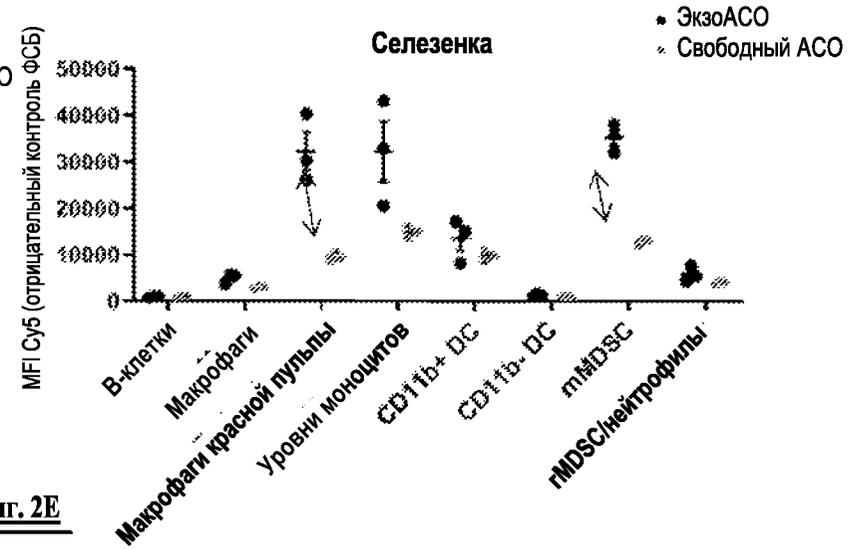
Фиг. 2А



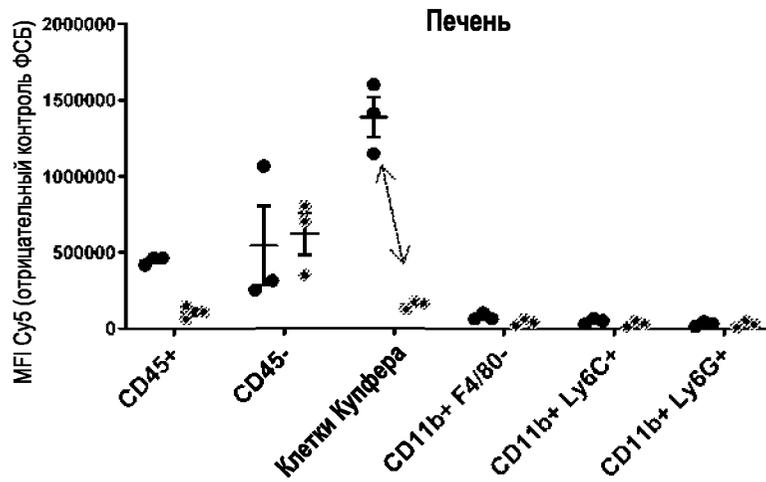
**Фиг. 2В**



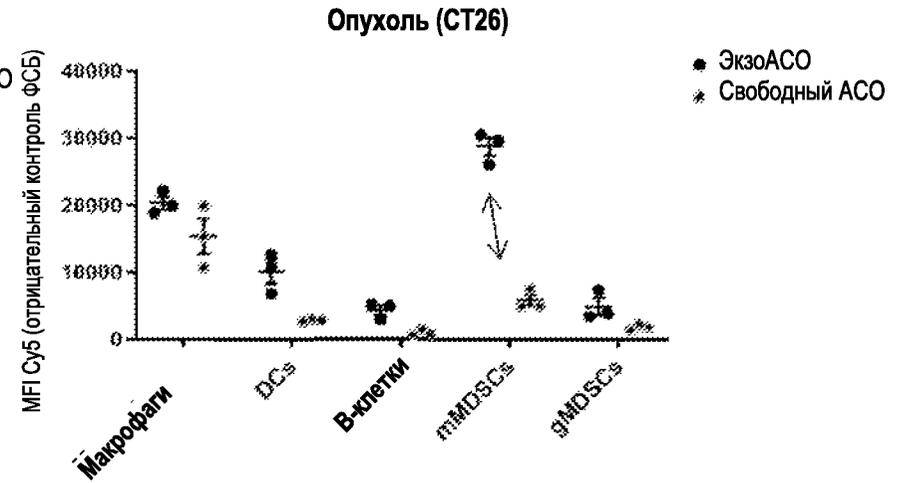
**Фиг. 2D**



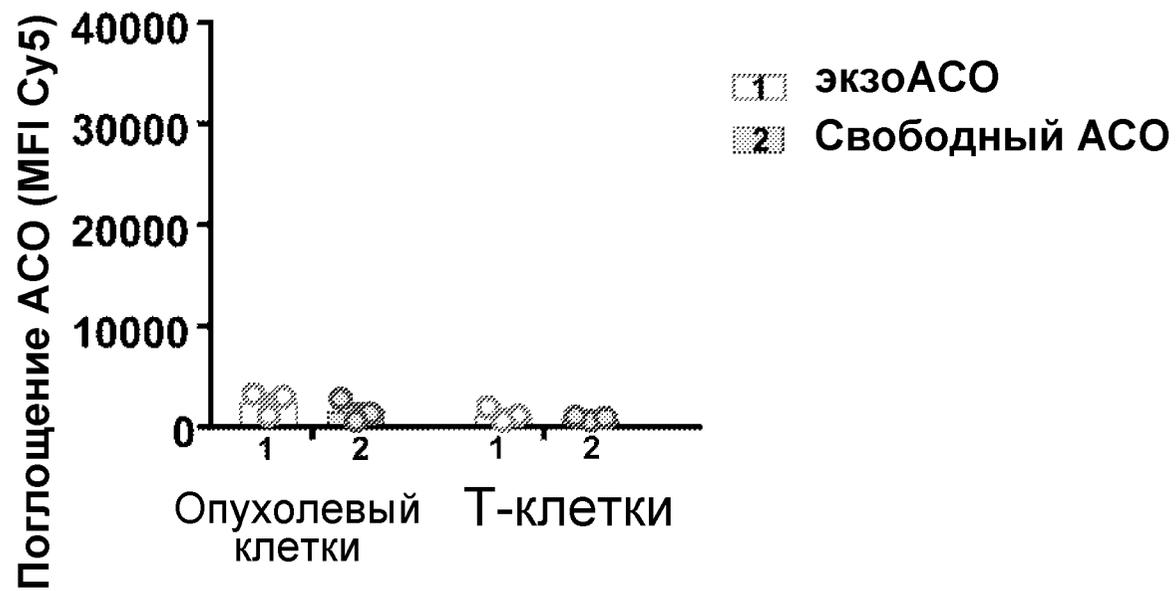
**Фиг. 2С**



**Фиг. 2Е**



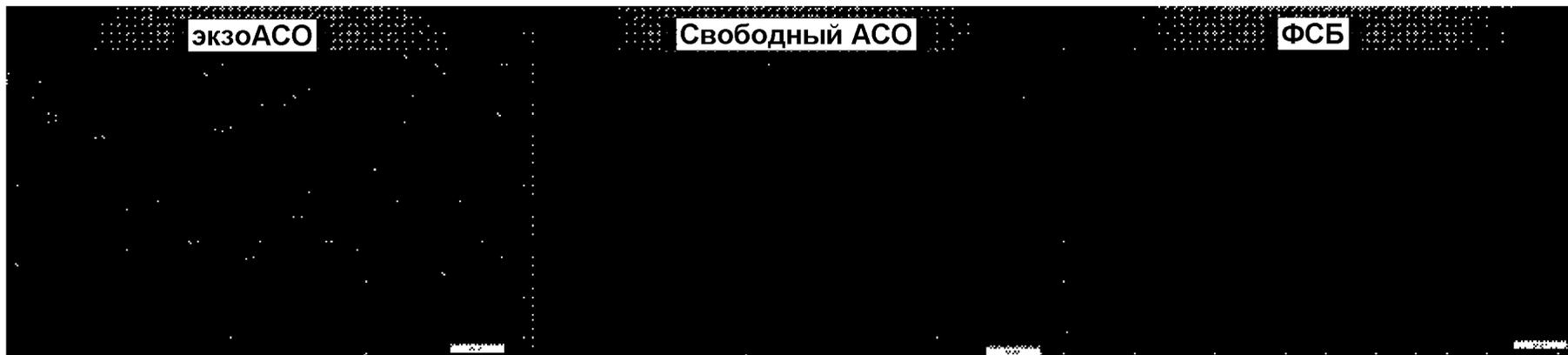
Фиг. 2F



Фиг. 2G

Фиг. 2I

Фиг. 2K



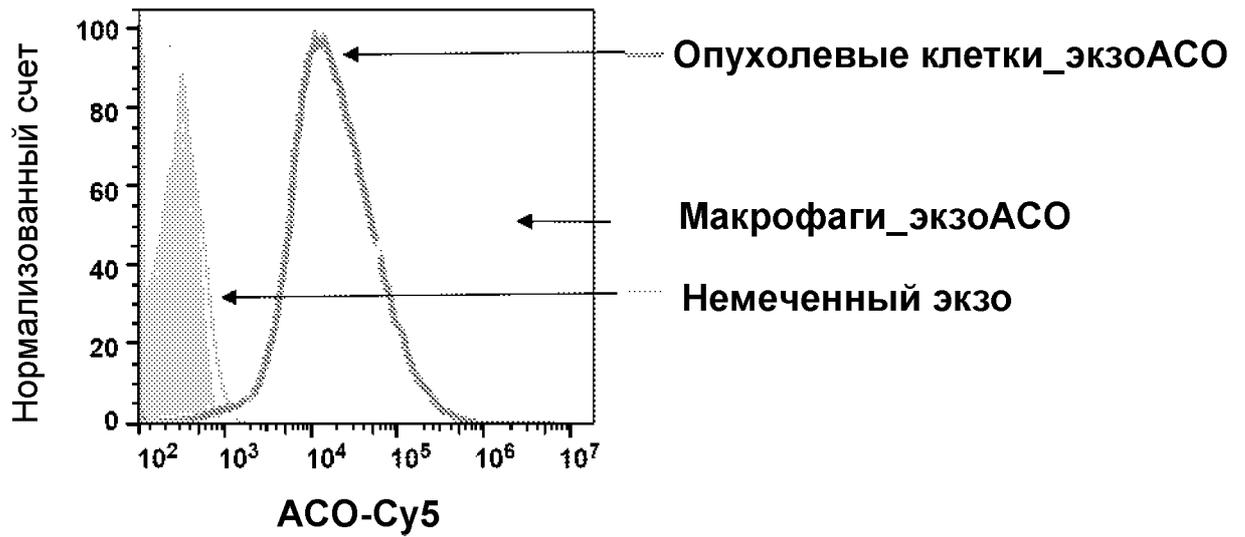
Фиг. 2H

Фиг. 2J

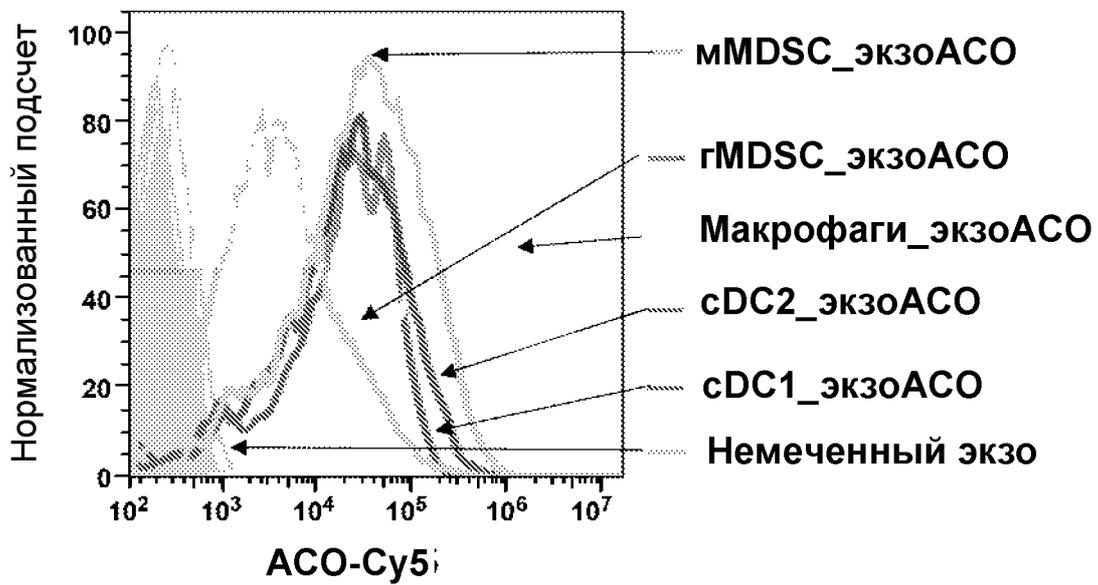
Фиг. 2L



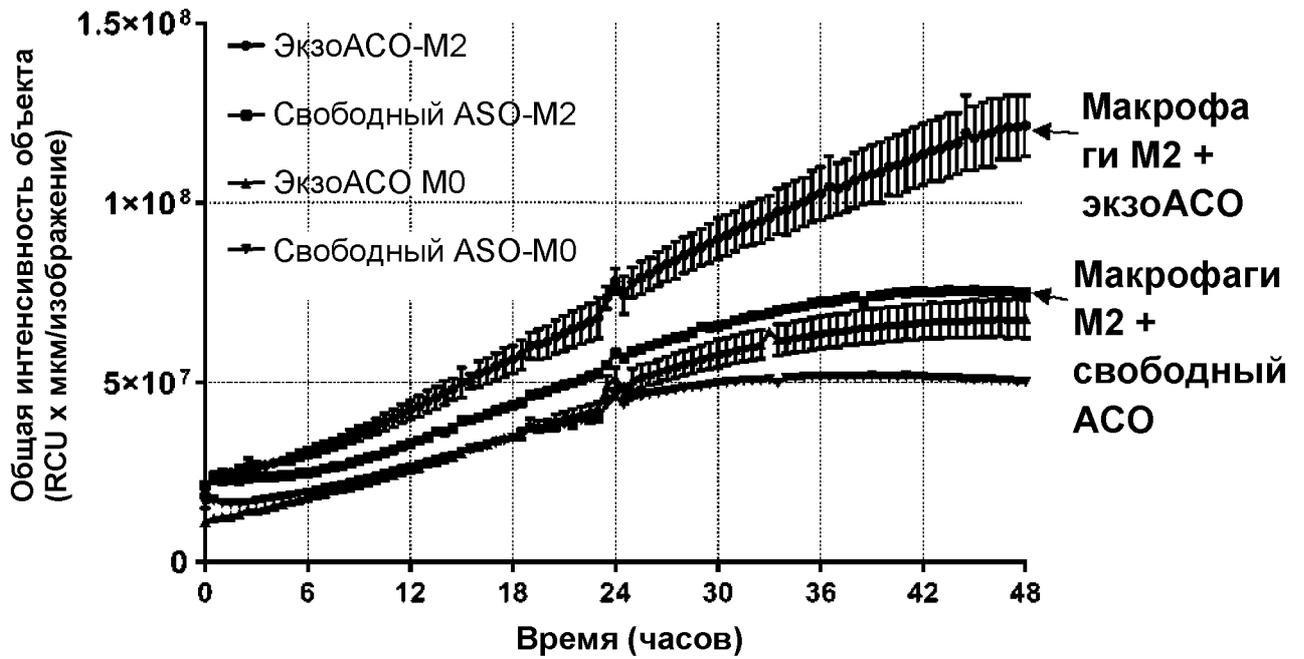
Фиг. 2М



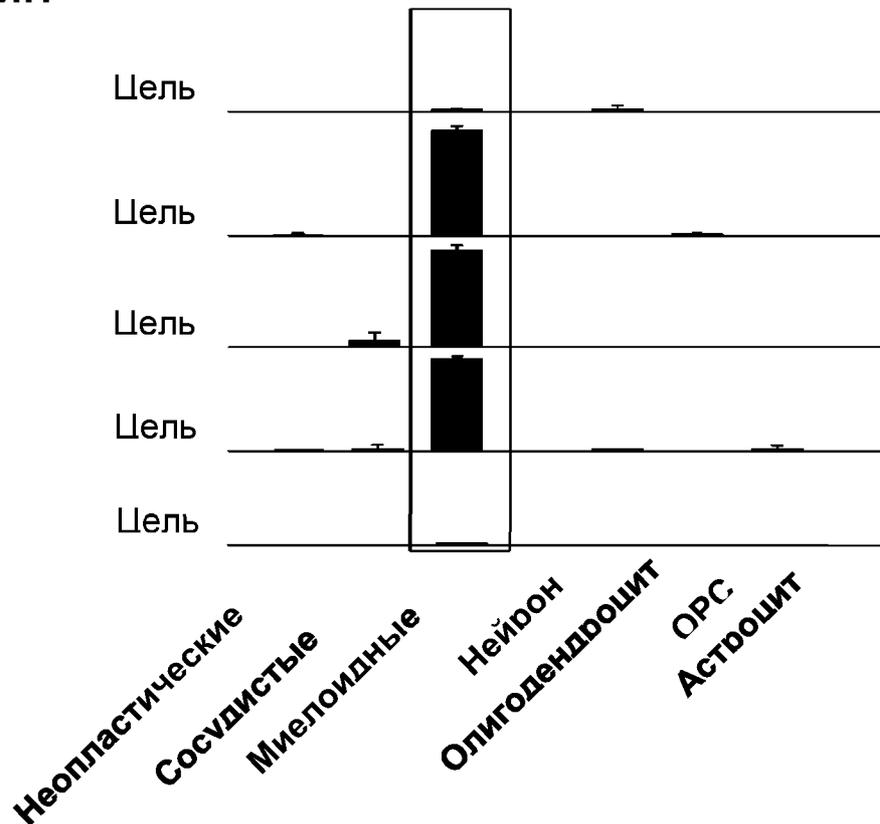
Фиг. 2N



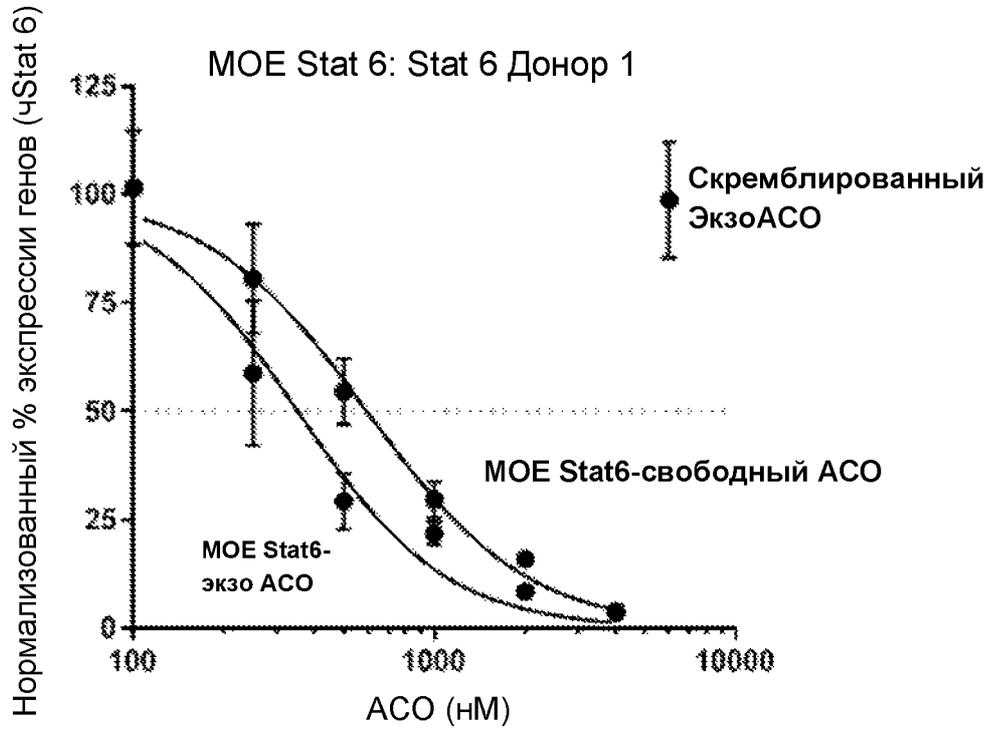
Фиг. 20



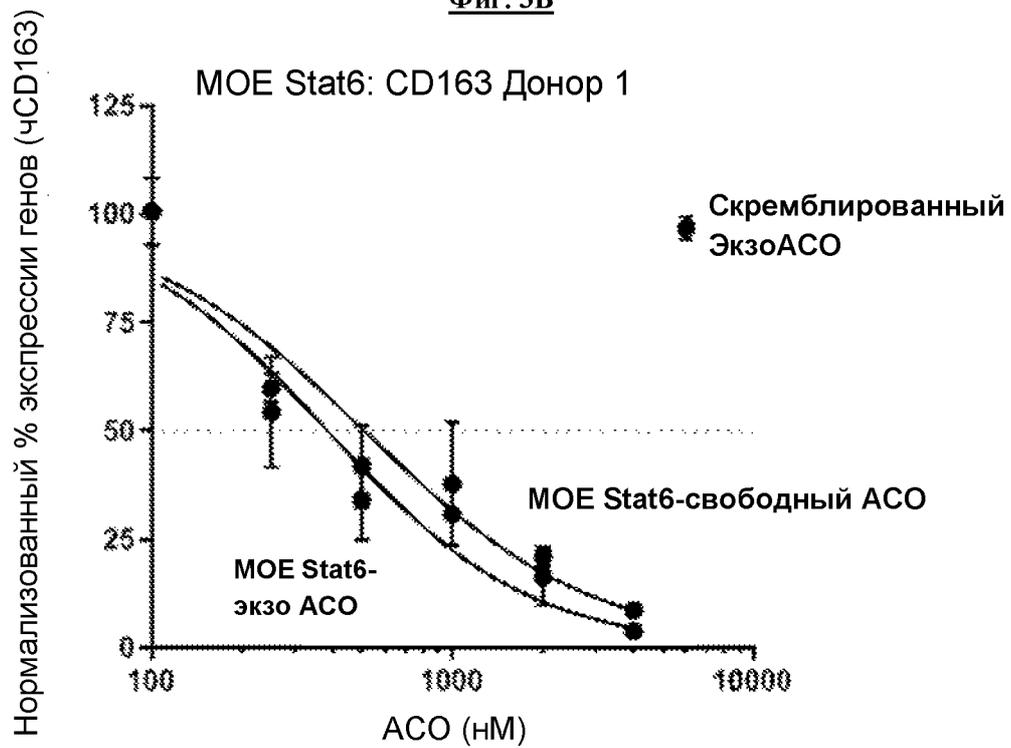
Фиг.



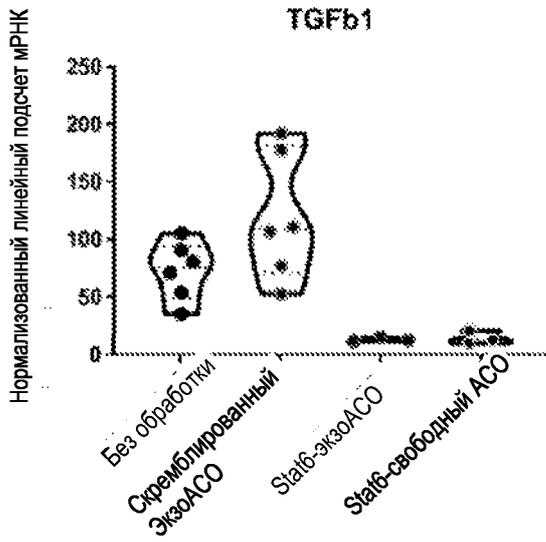
Фиг. 3А



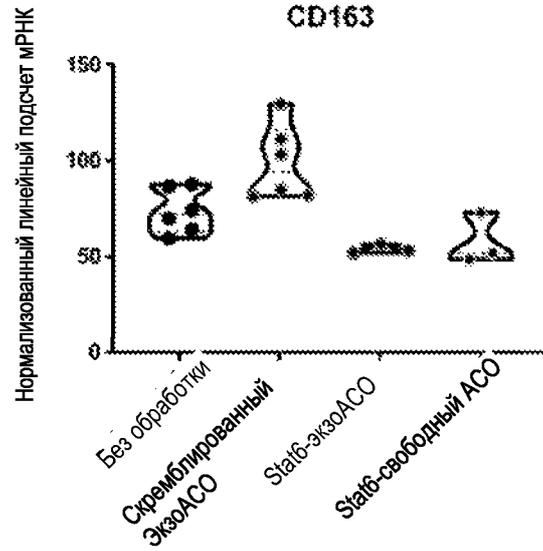
Фиг. 3В



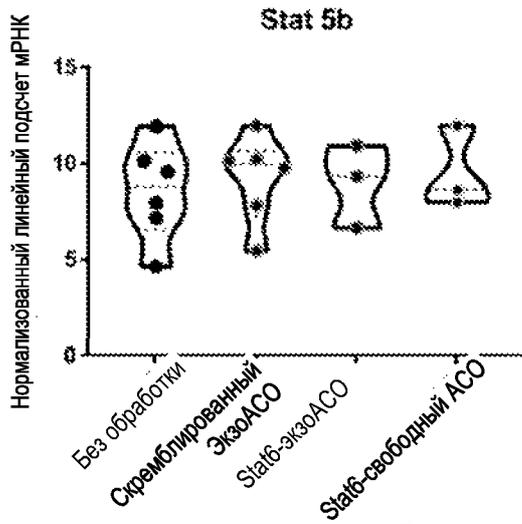
**Фиг. 4А**



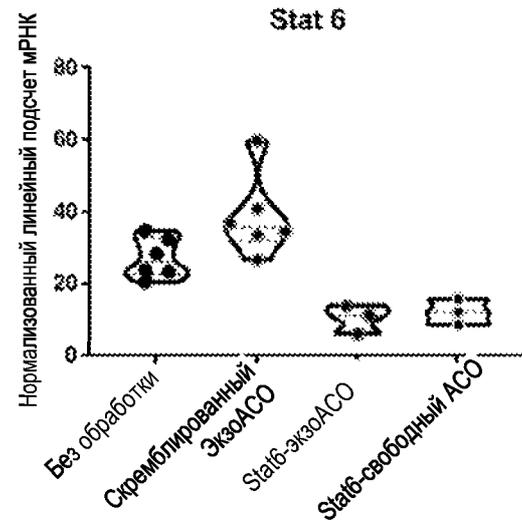
**Фиг. 4В**



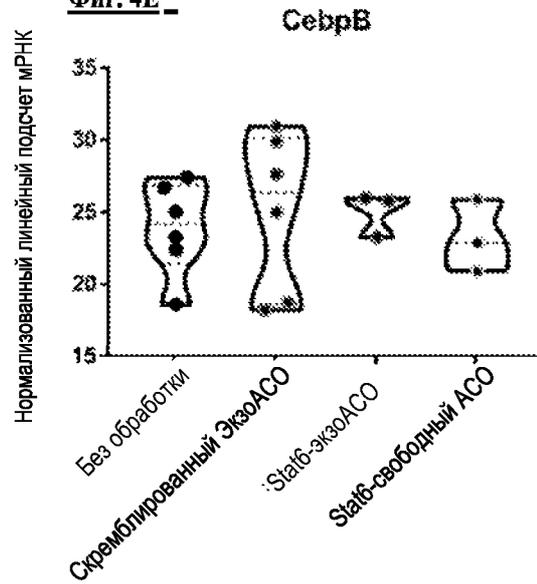
**Фиг. 4С**

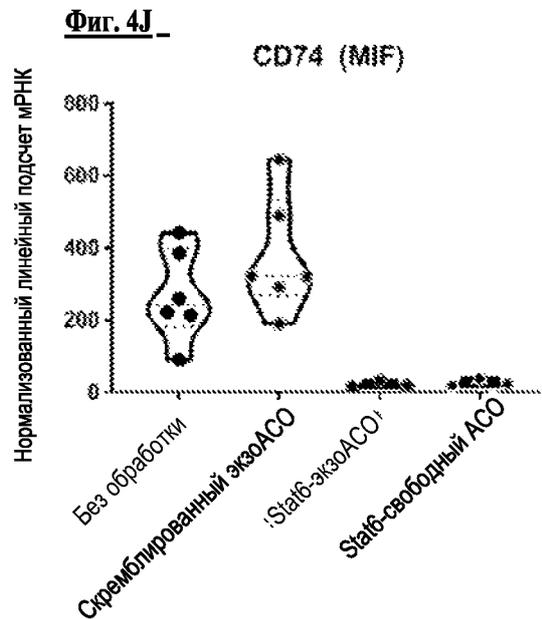
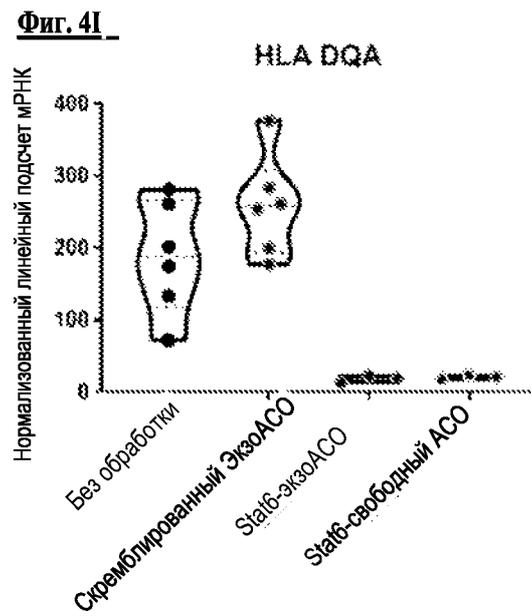
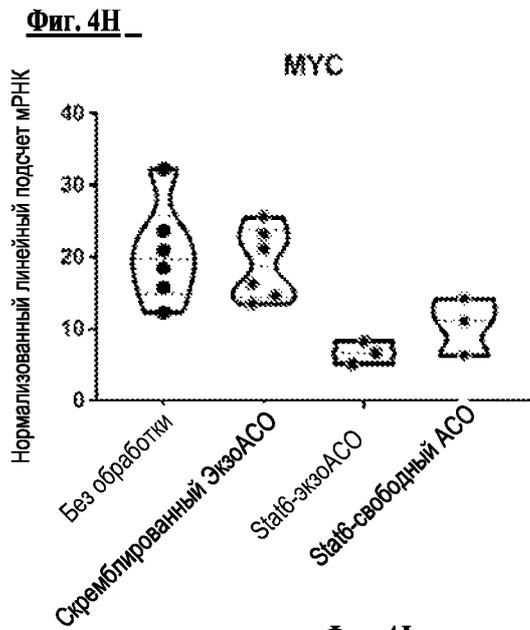
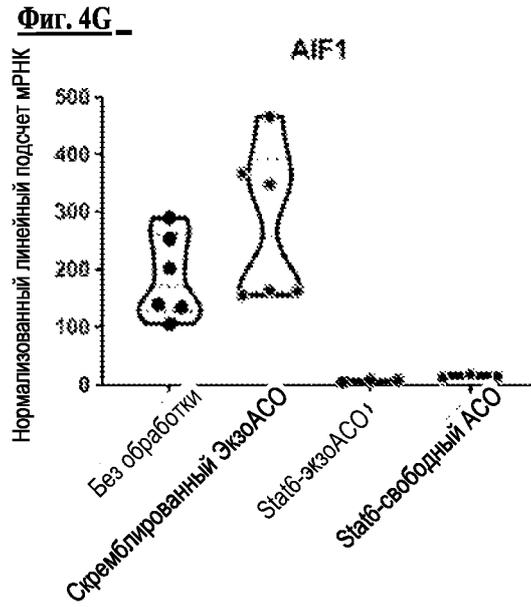
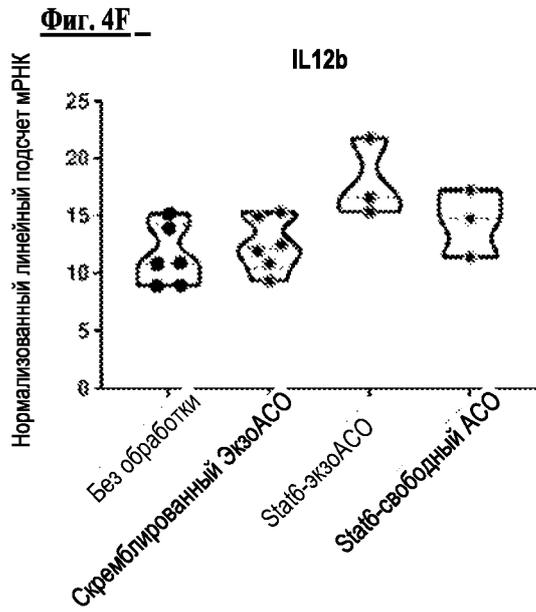


**Фиг. 4Д**

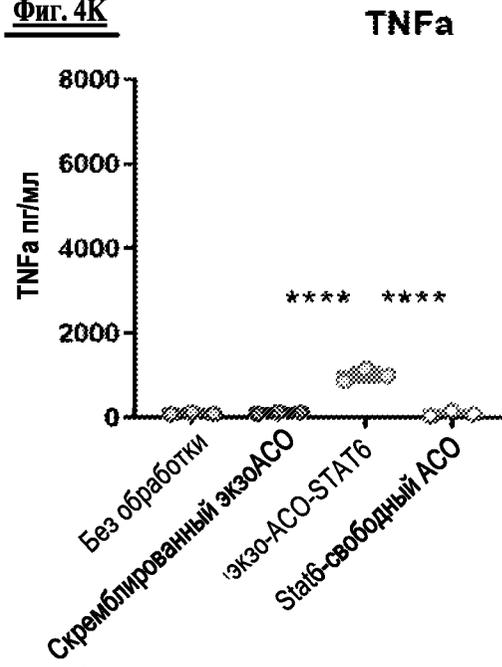


**Фиг. 4Е**

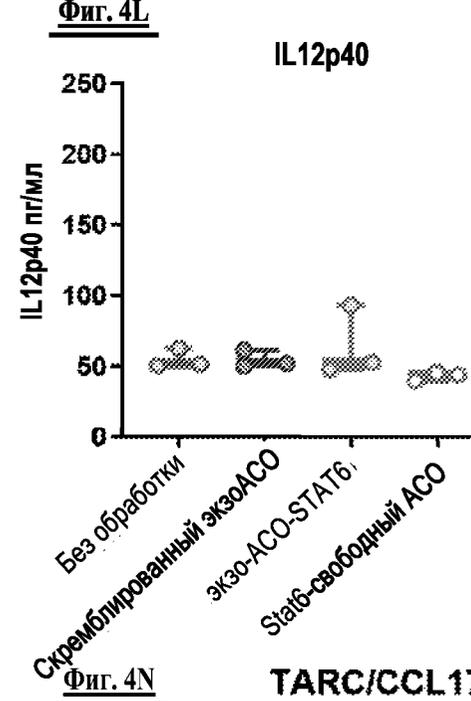




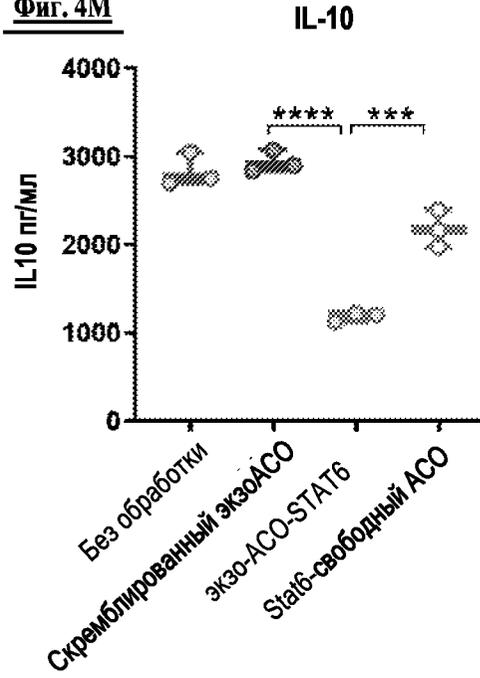
**Фиг. 4К**



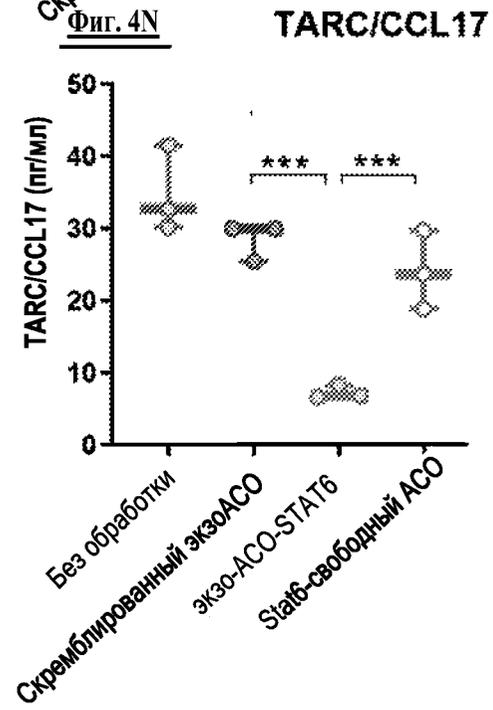
**Фиг. 4Л**



**Фиг. 4М**

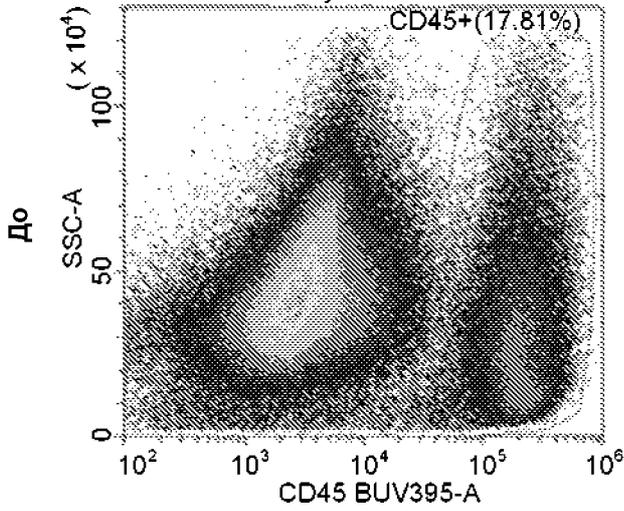


**Фиг. 4N**



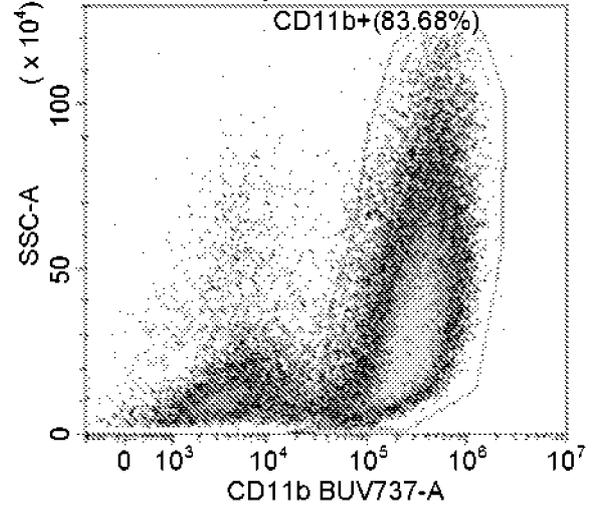
**Фиг. 5А**

01-лунка-B1: P3



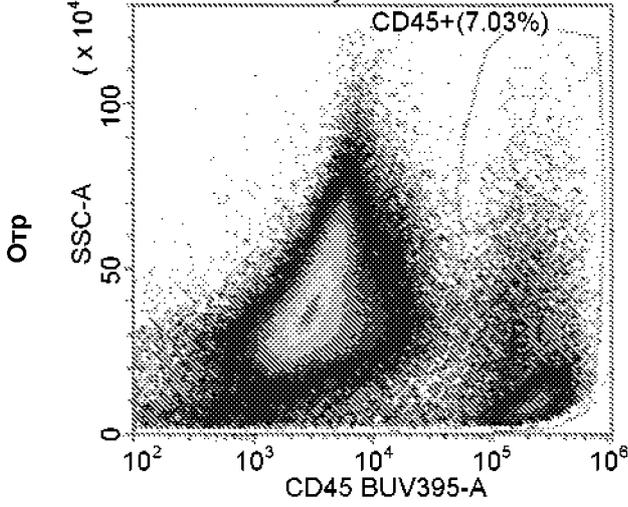
**Фиг. 5D**

01-лунка-B1; CD45+



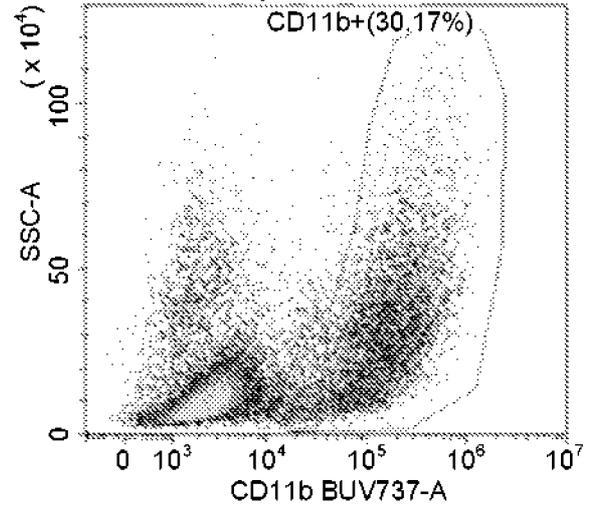
**Фиг. 5B**

01-лунка-C5: P3



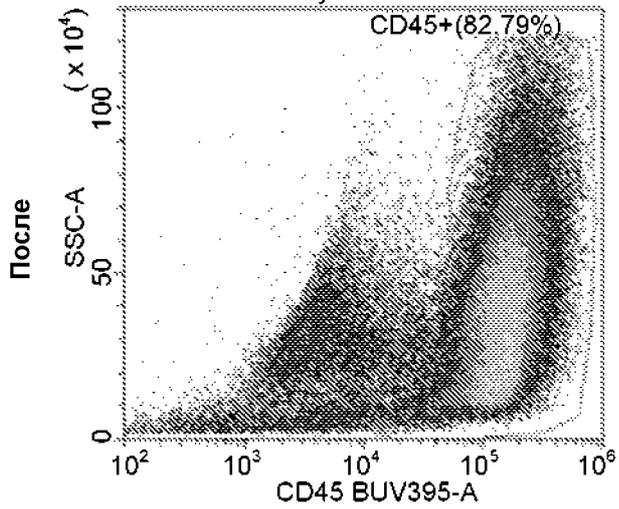
**Фиг. 5E**

01-лунка-C5: CD45+



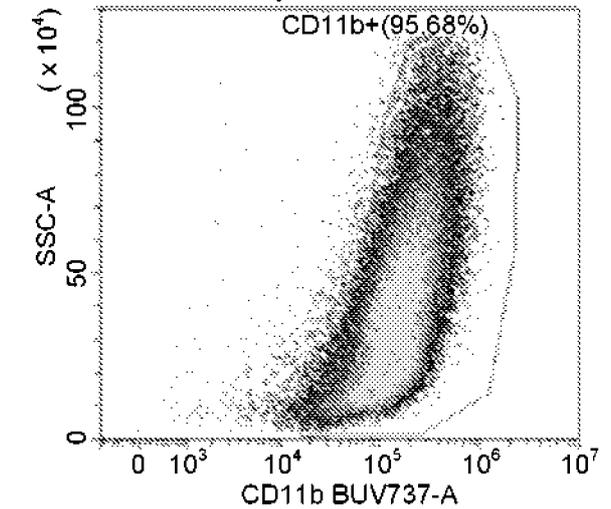
**Фиг. 5C**

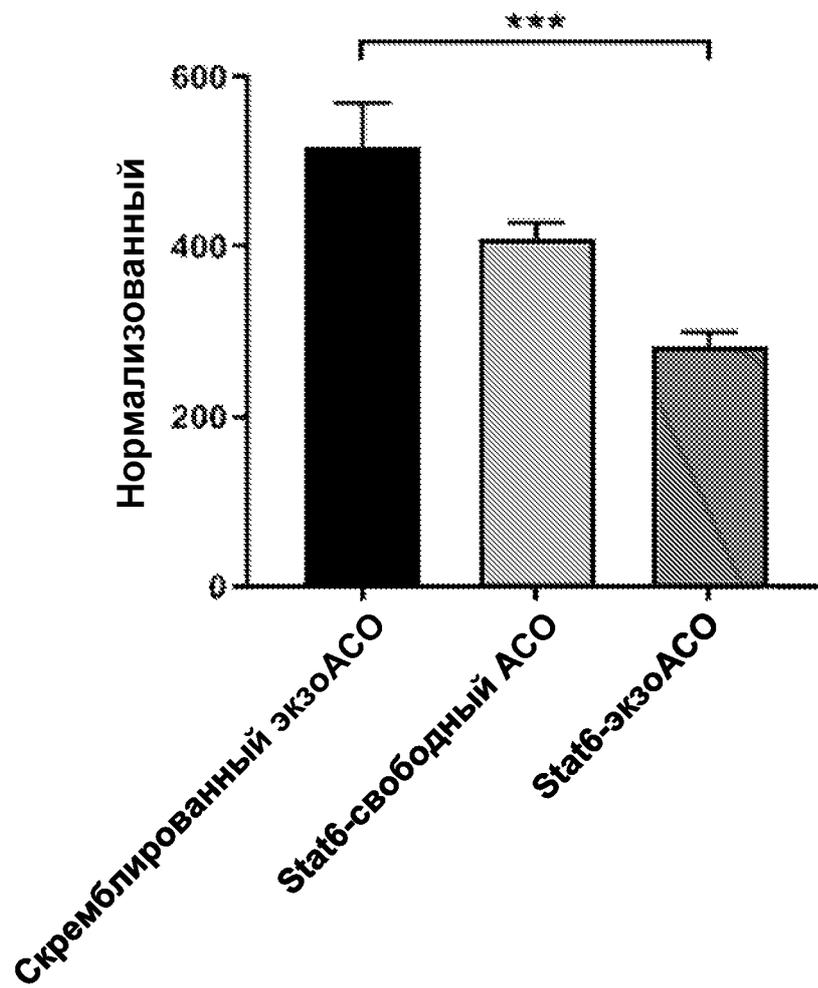
01-лунка-D6: P3



**Фиг. 5F**

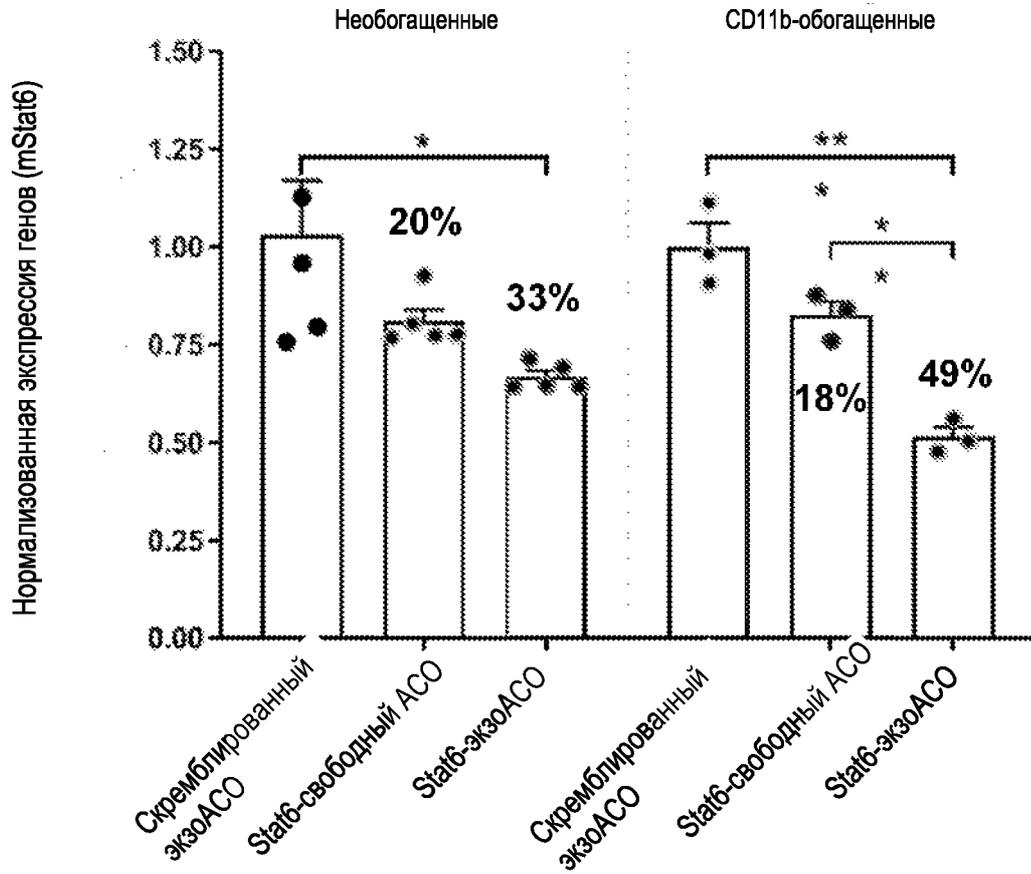
01-лунка-D6: CD45+



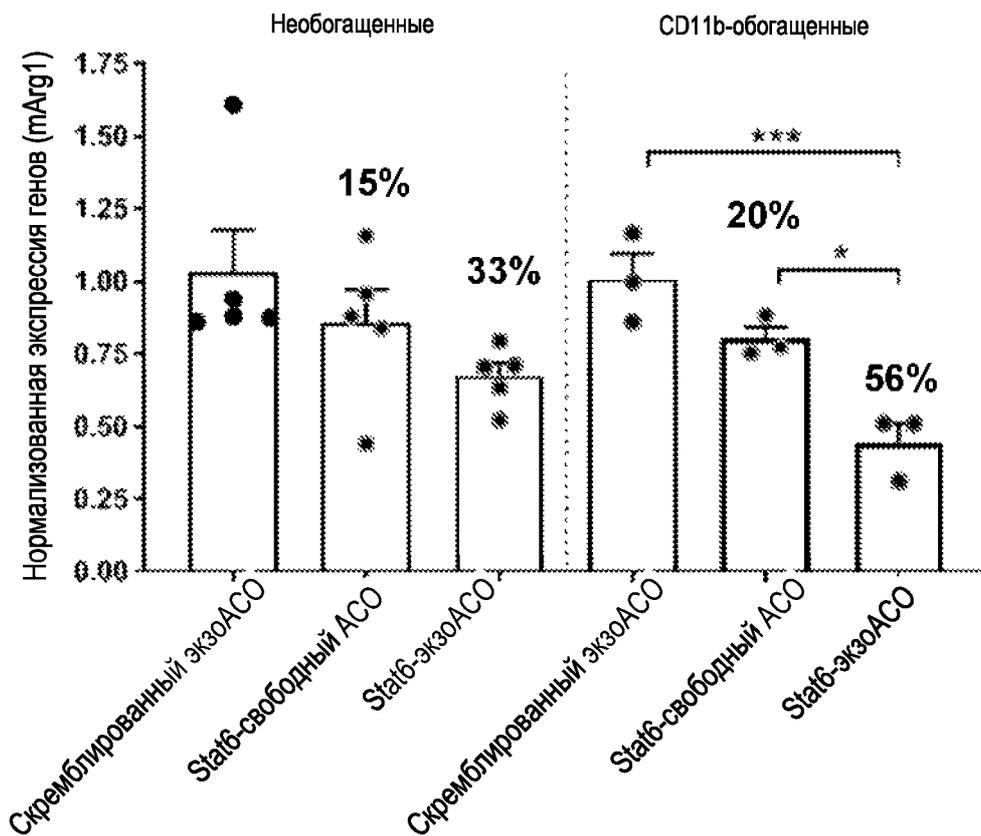
**Фиг. 5G**

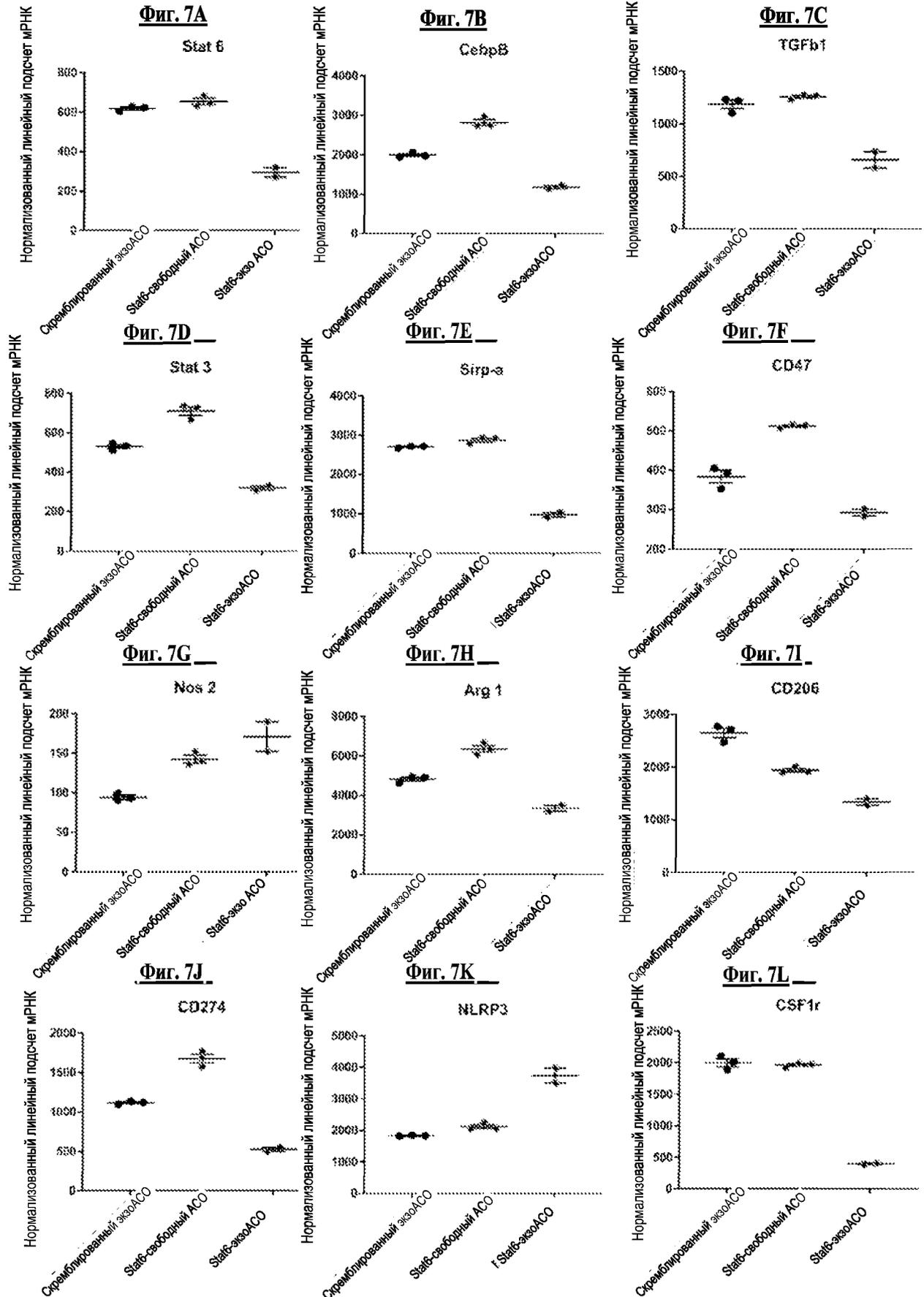
**Фиг. 6А**

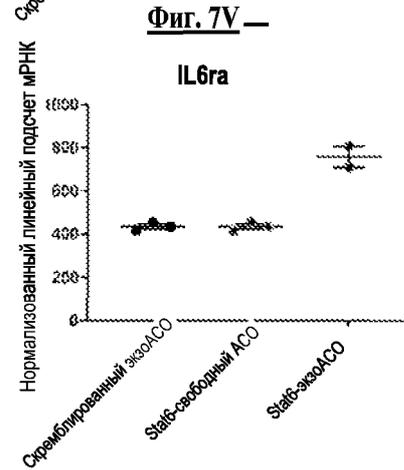
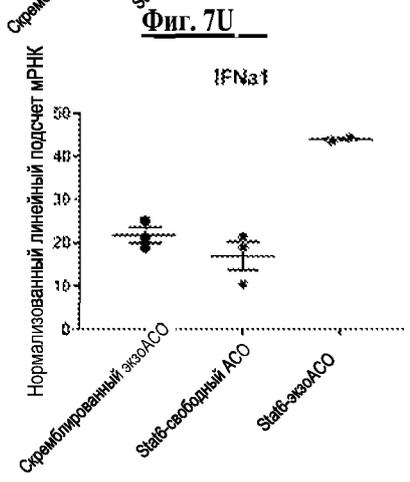
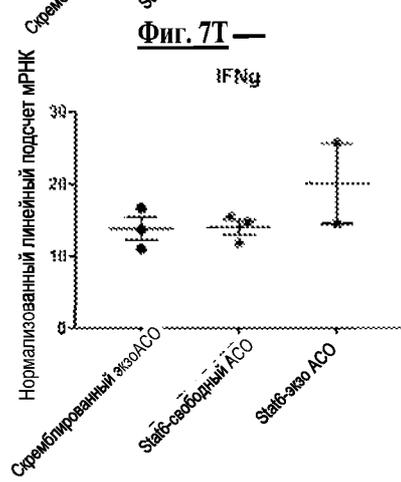
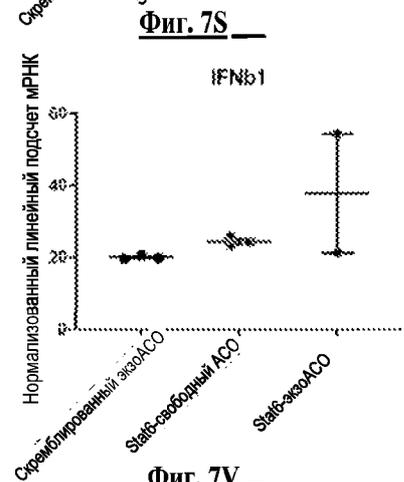
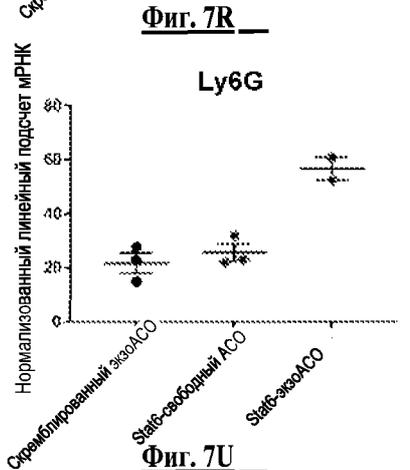
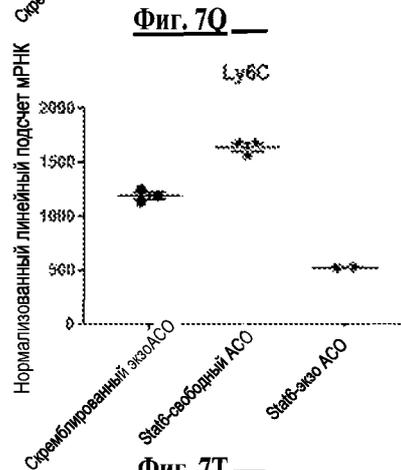
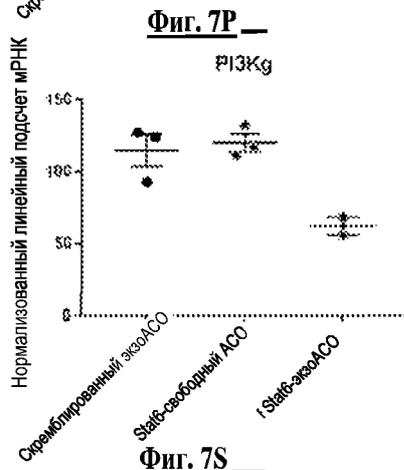
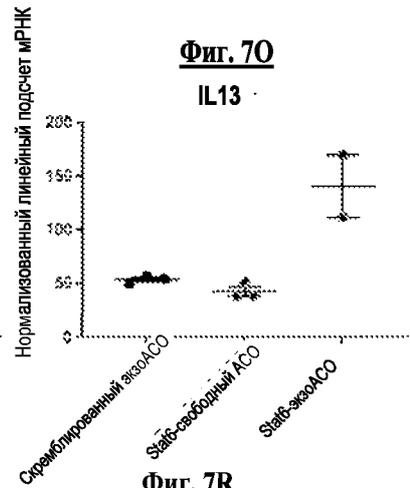
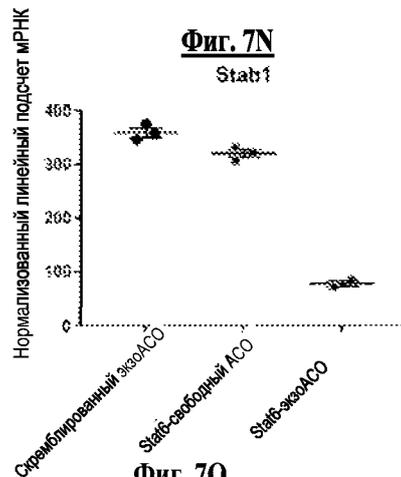
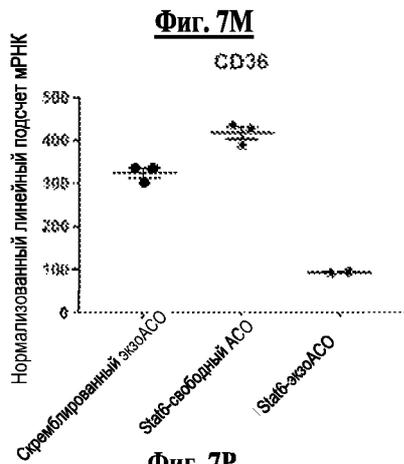
**Stat 6**



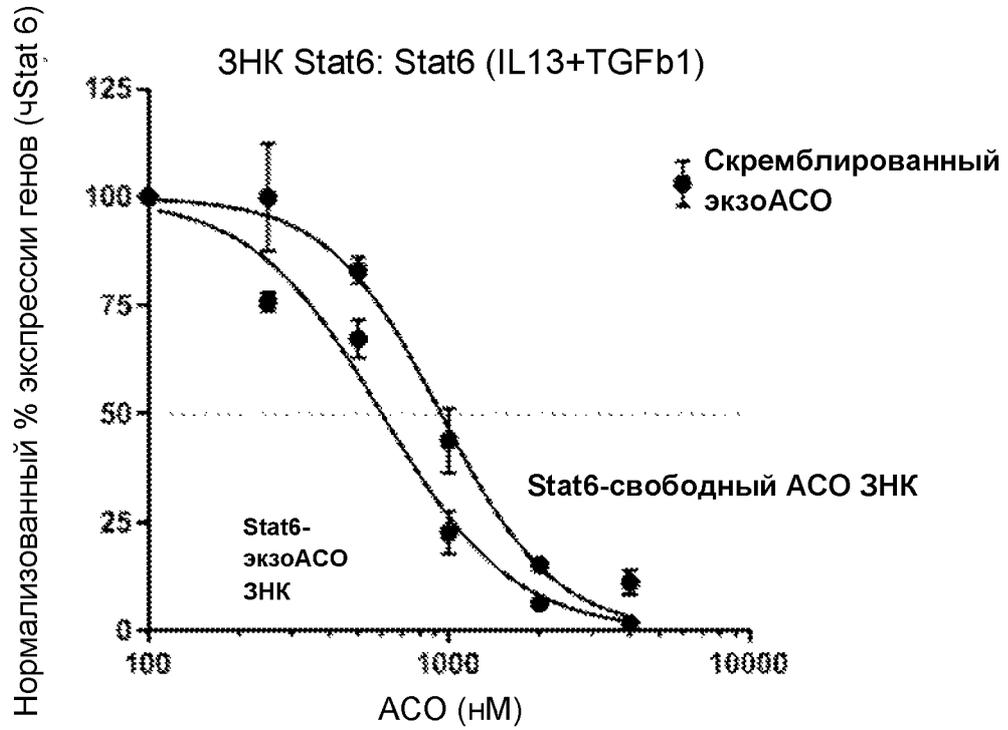
**Фиг. 6В**



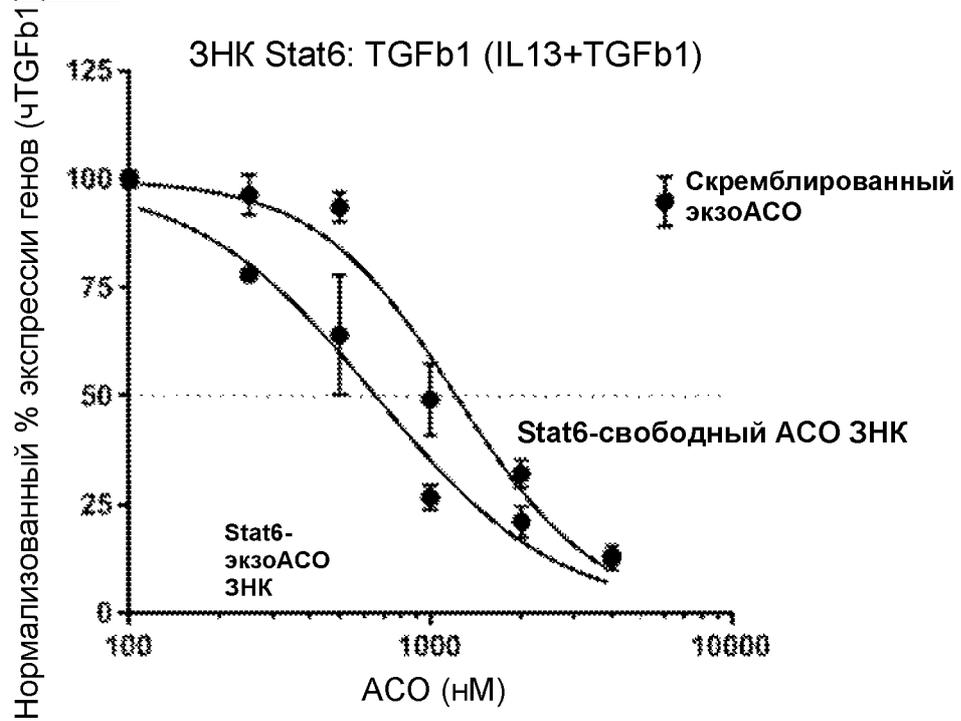




Фиг. 8А

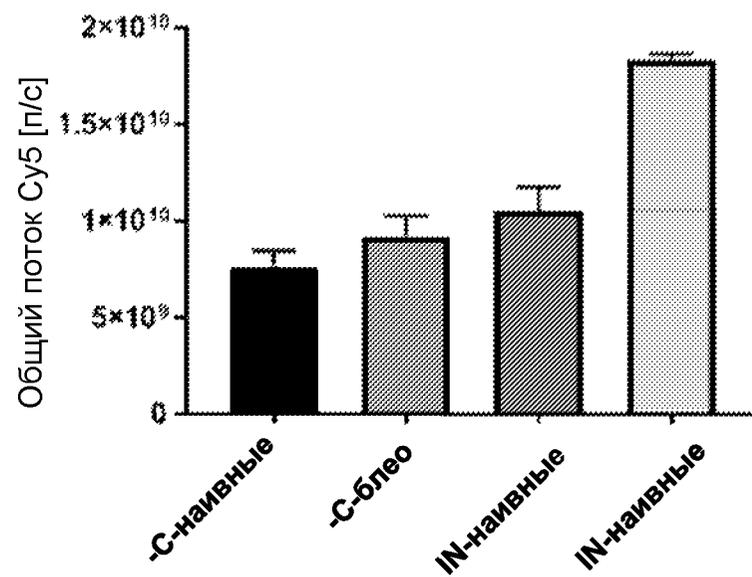


Фиг. 8В



**Фиг. 9**

Интраназальные экзосомы  
для легких TD2 и  
собственные

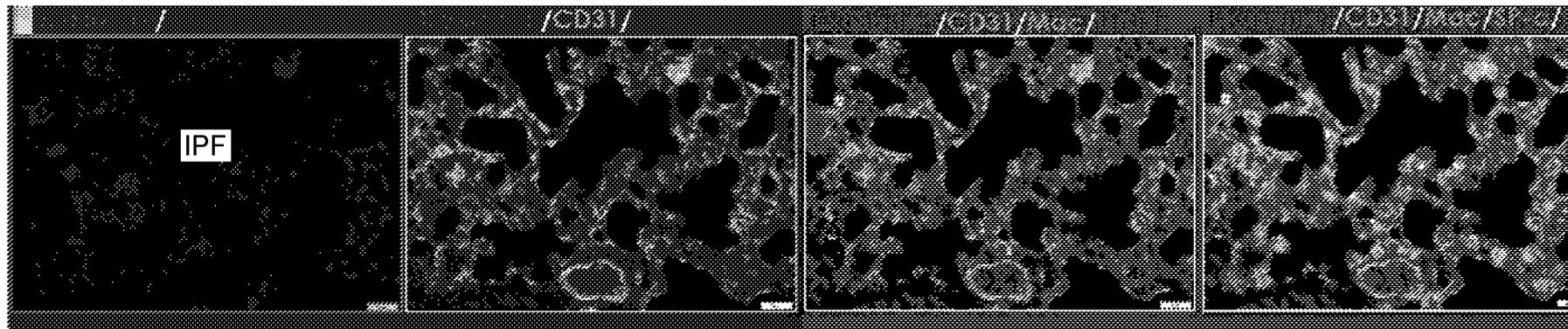


Фиг. 10А

Фиг. 10В

Фиг. 10С

Фиг. 10D

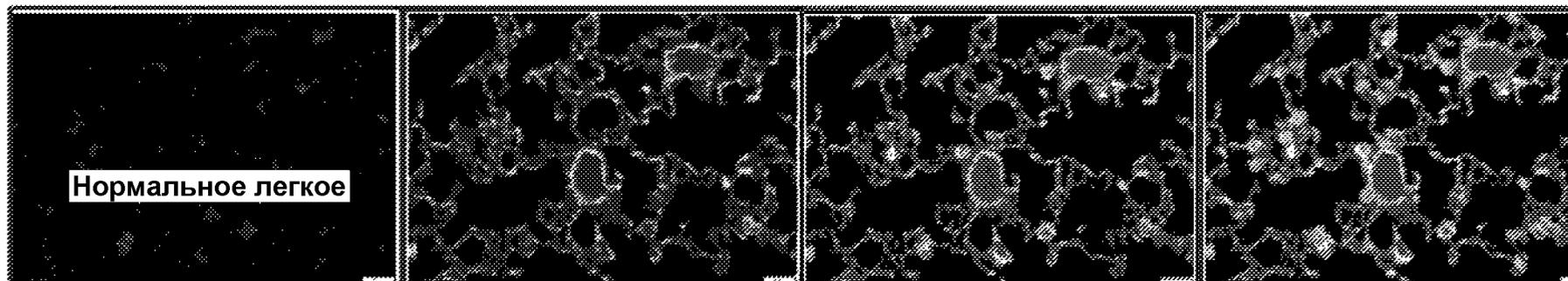


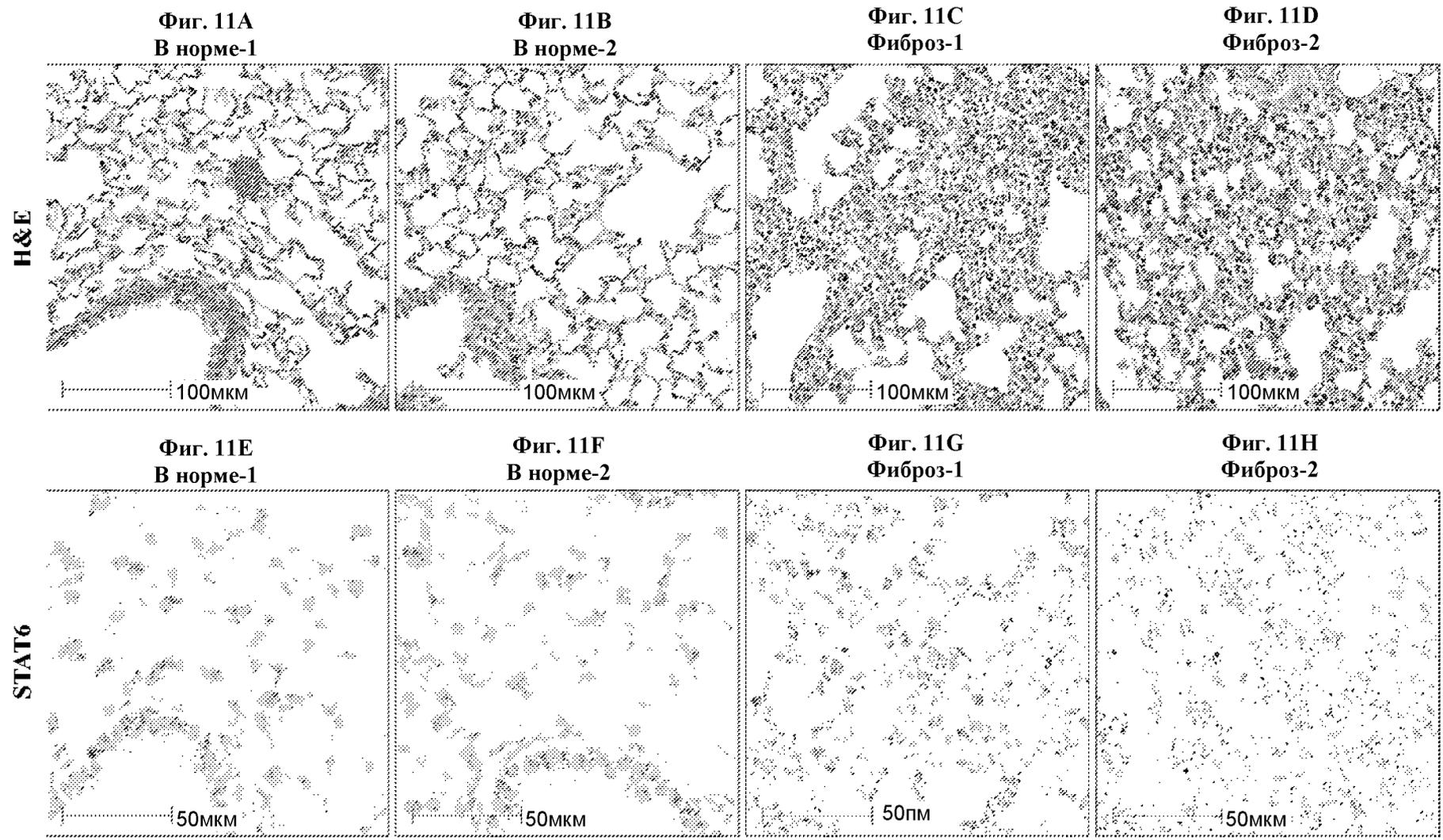
Фиг. 10Е

Фиг. 10F

Фиг. 10G

Фиг. 10H

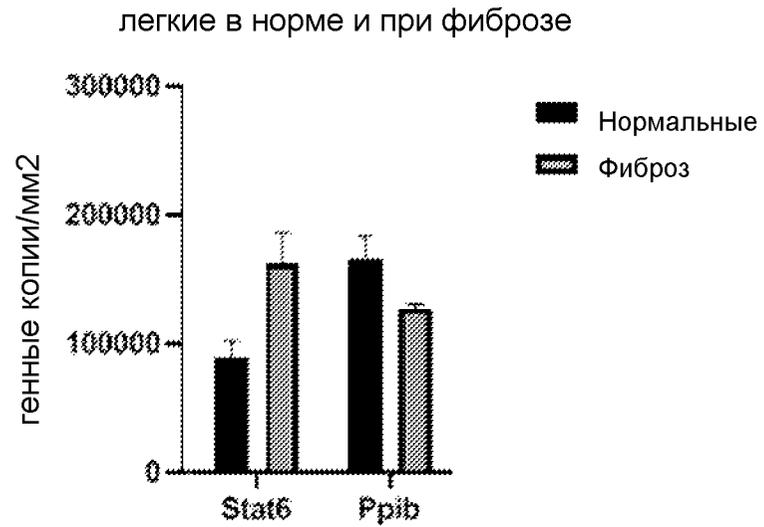




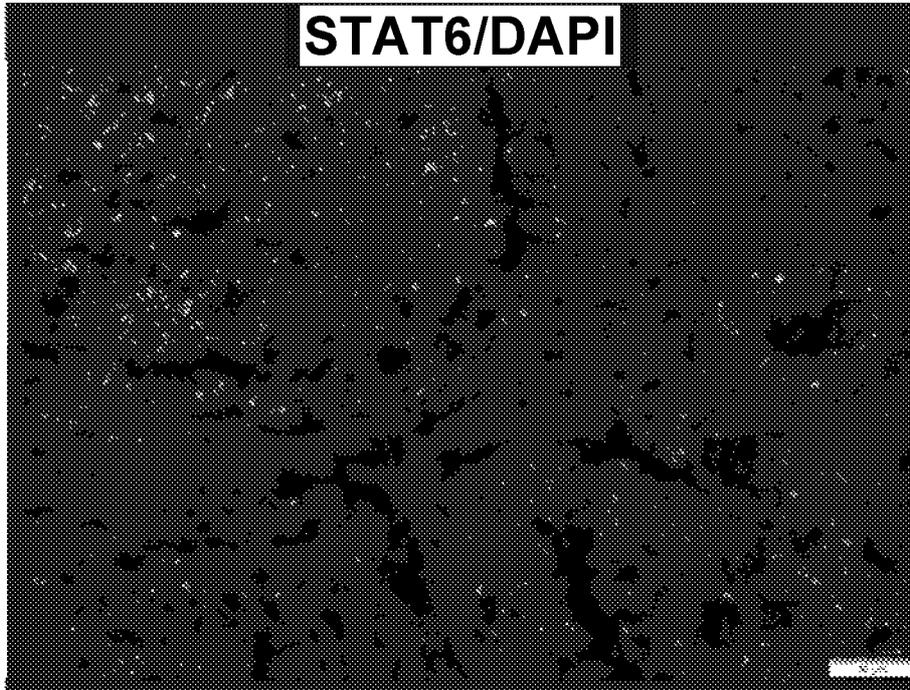
Фиг. 11I

Оценка клеток

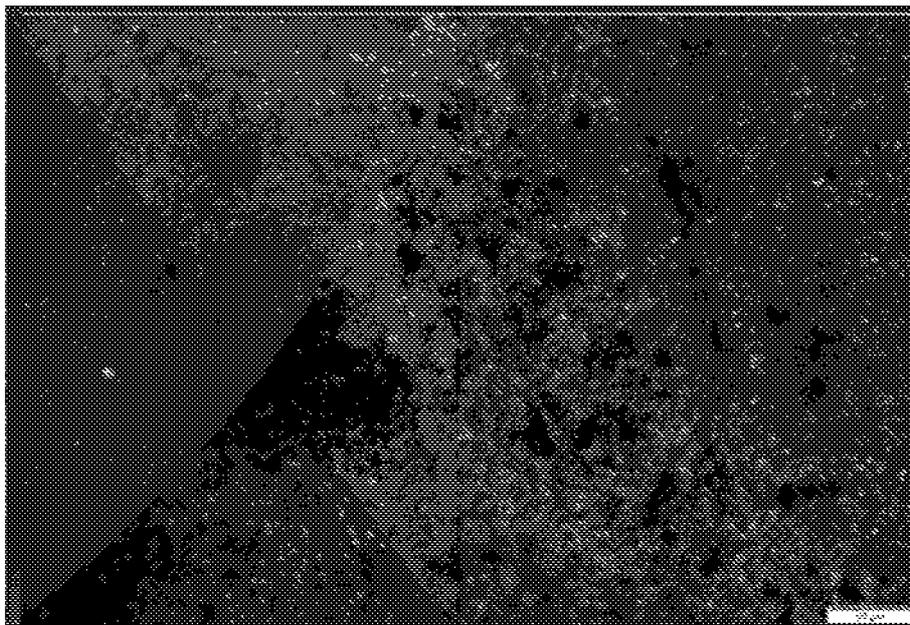
0 точек  
1+  $\geq 1$   
2+  $\geq 4$   
3+  $\geq 10$   
4+  $\geq 16$



Фиг. 12А

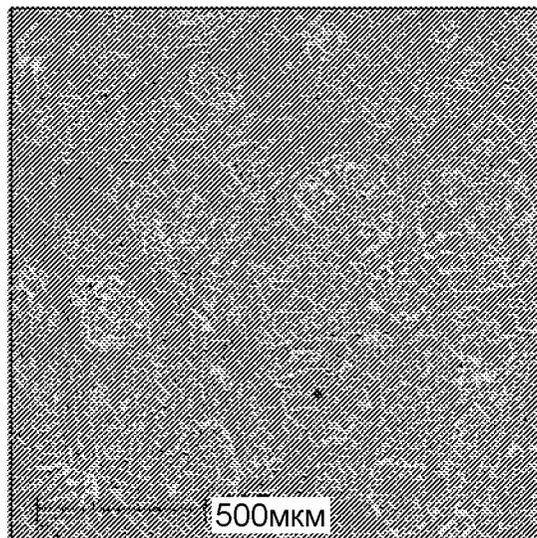


Фиг. 12В

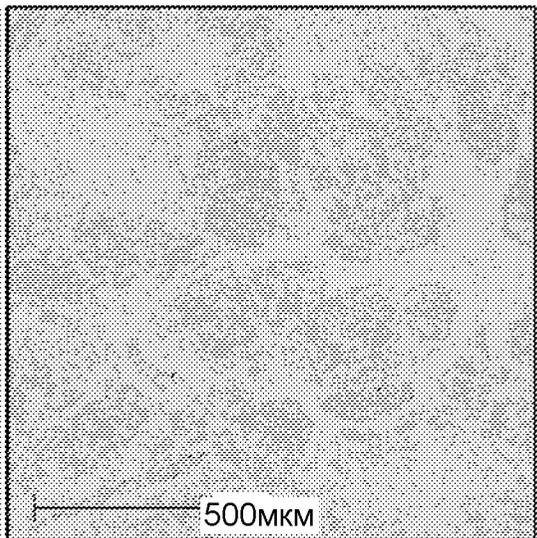


МАЛОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

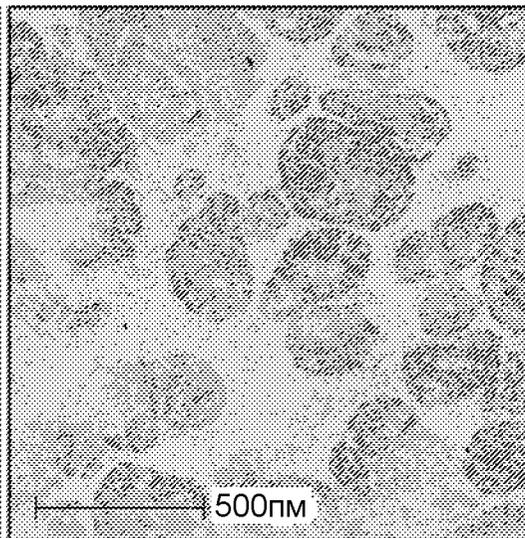
Фиг. 13А  
H&E



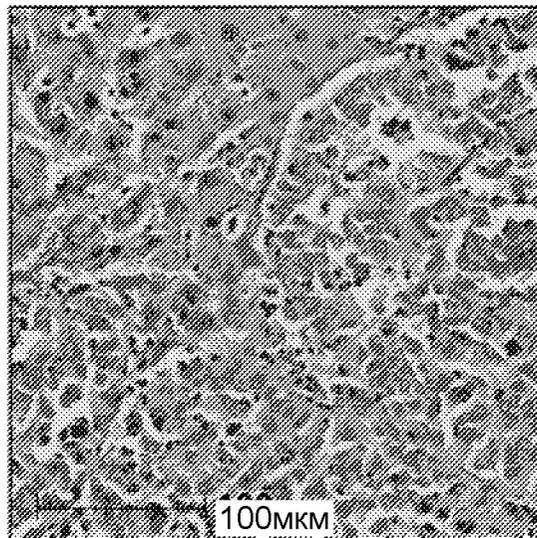
Фиг. 13В  
STAT6



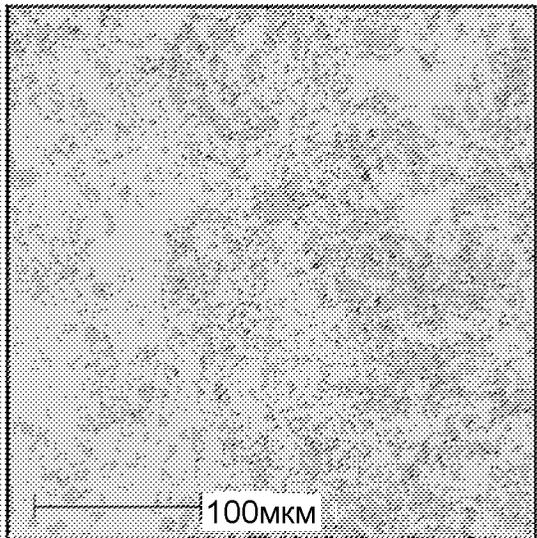
Фиг. 13С  
PPIB (+)



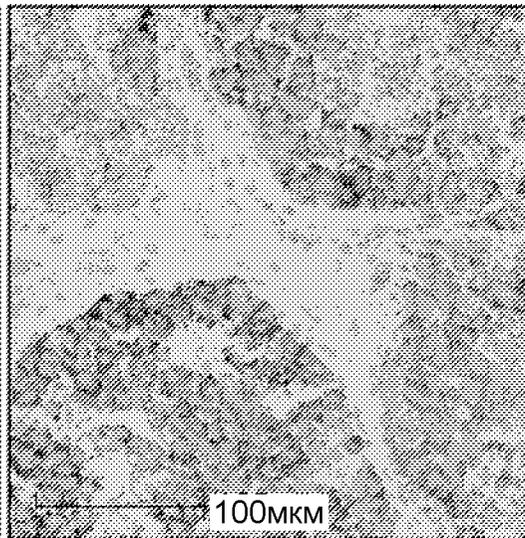
Фиг. 13D  
H&E



Фиг. 13Е  
STAT6

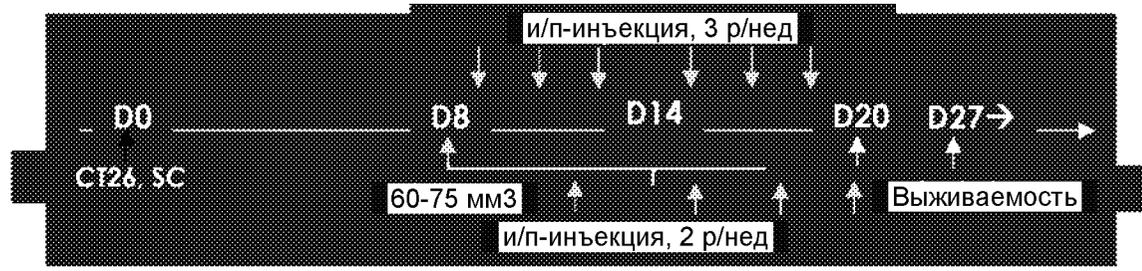


Фиг. 13F  
PPIB (+)

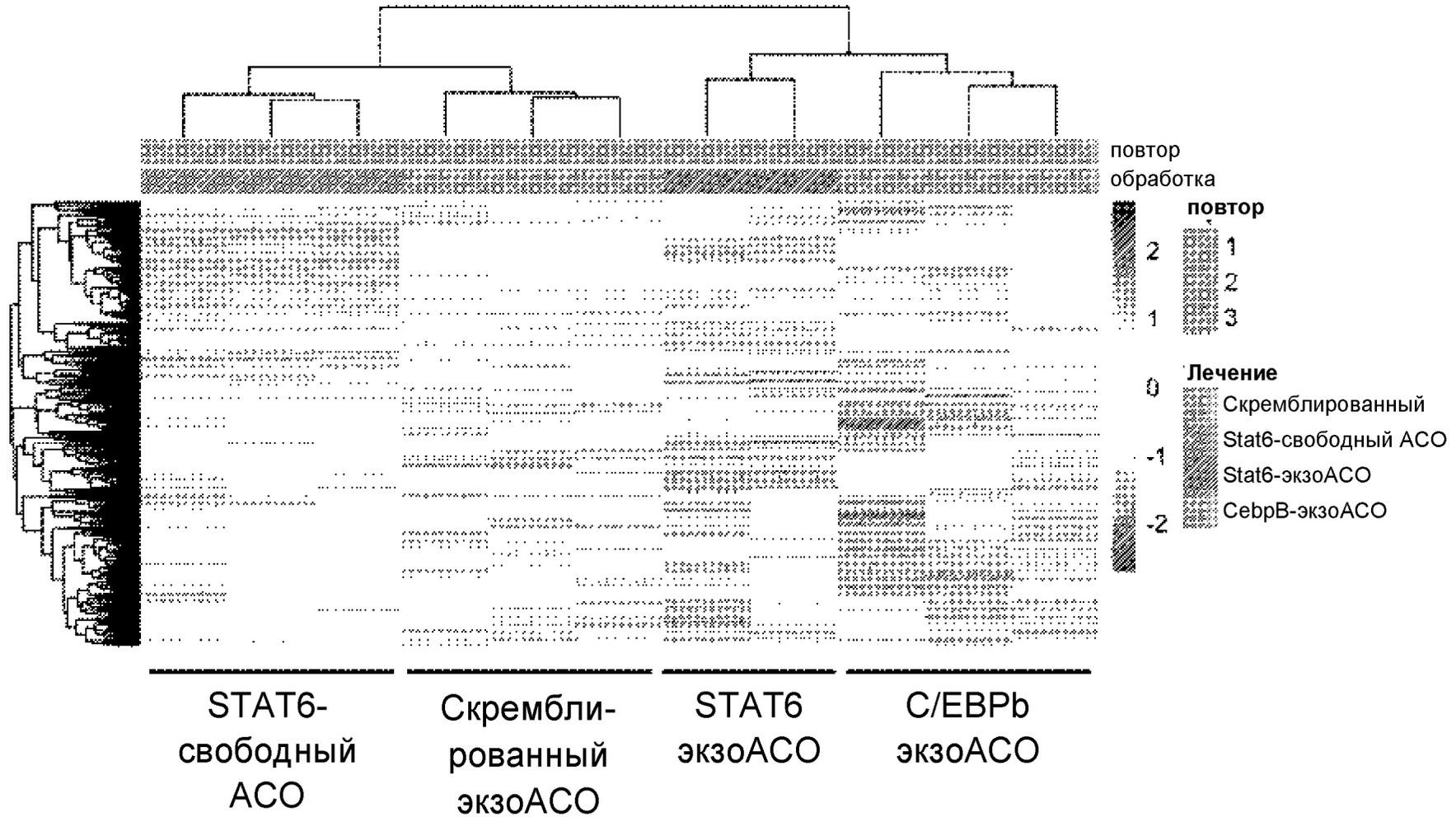


БОЛЬШОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

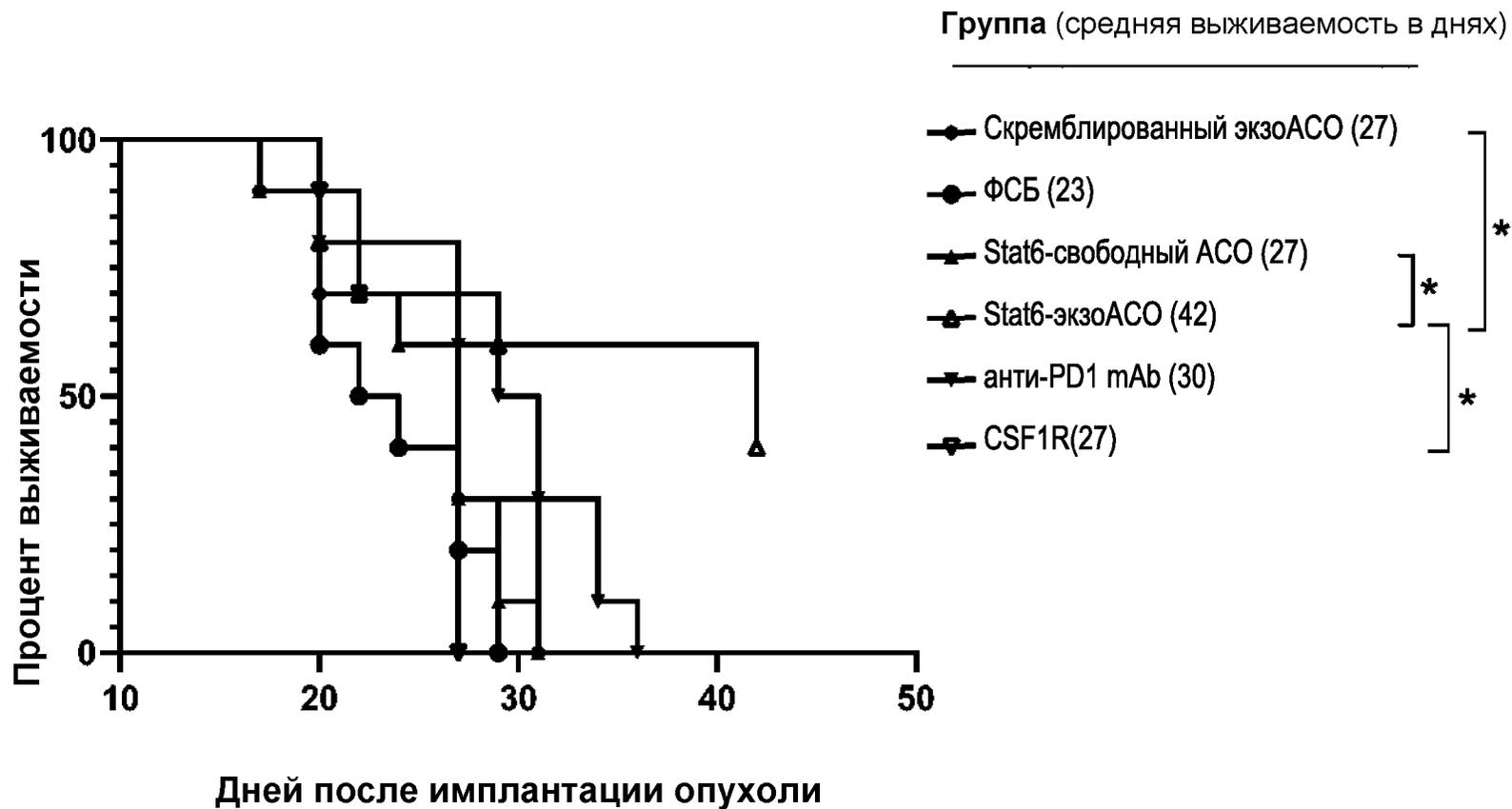
Фиг. 14А



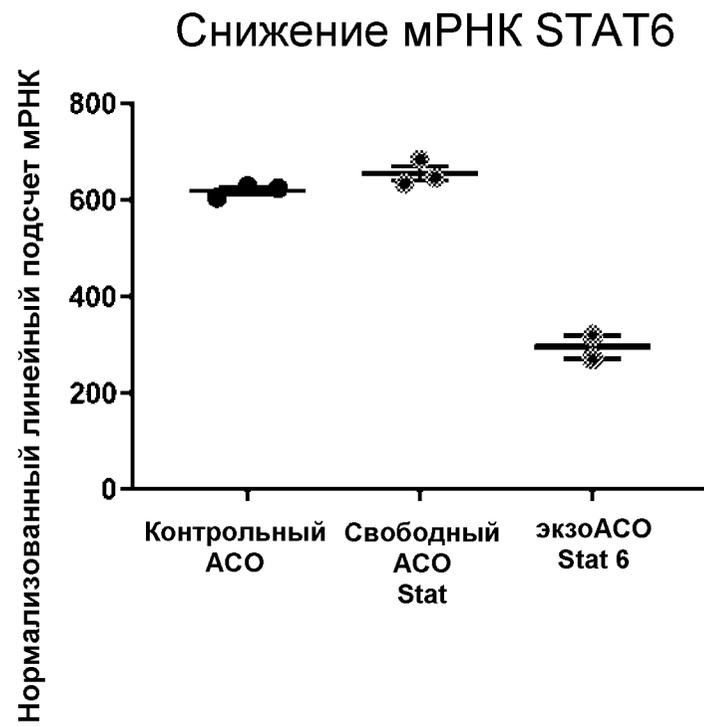
Фиг. 14В



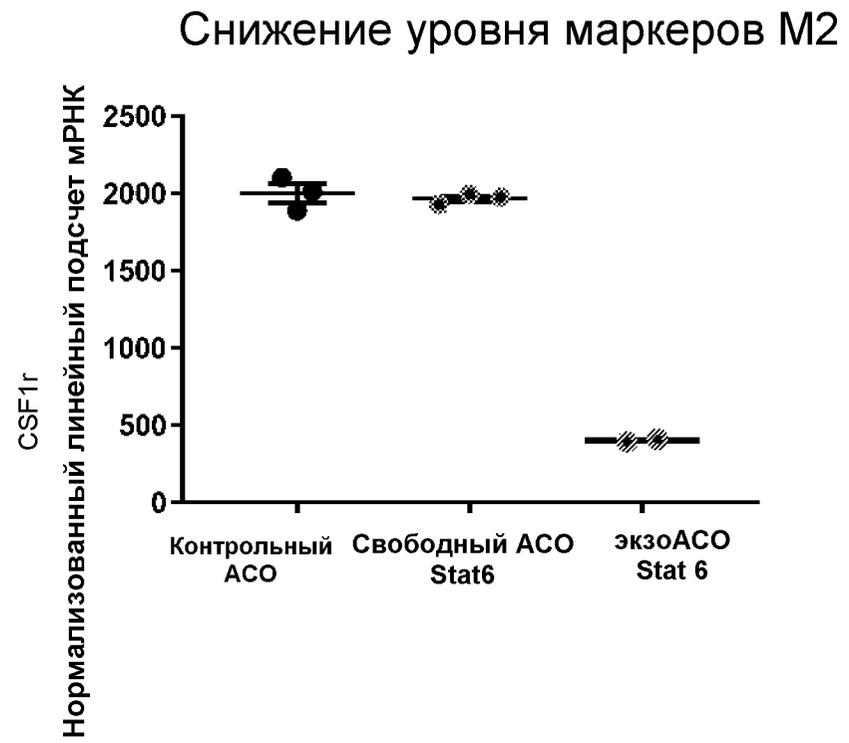
Фиг. 15



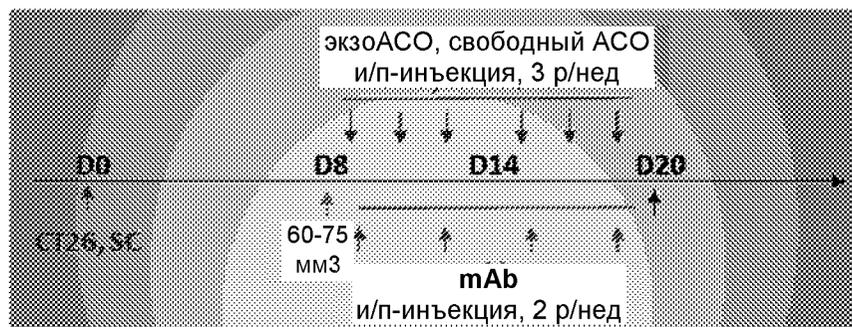
Фиг. 16А



Фиг. 16В



Фиг. 17А

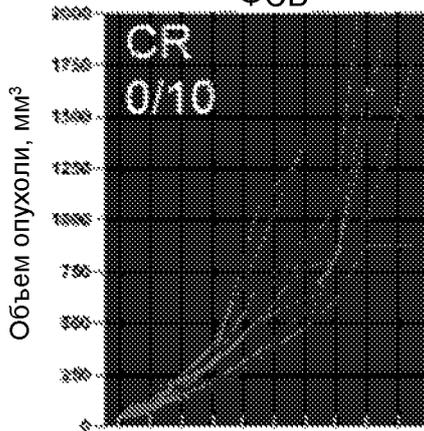


Фиг. 17В



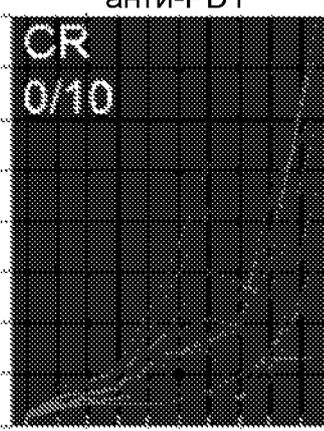
Фиг. 17С

ФСБ



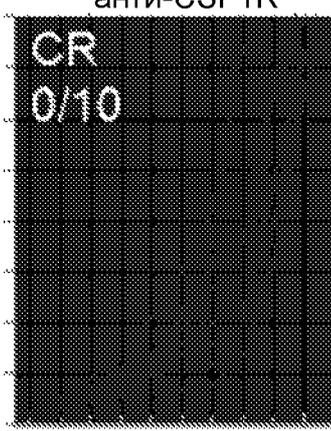
Фиг. 17D

анти-PD1

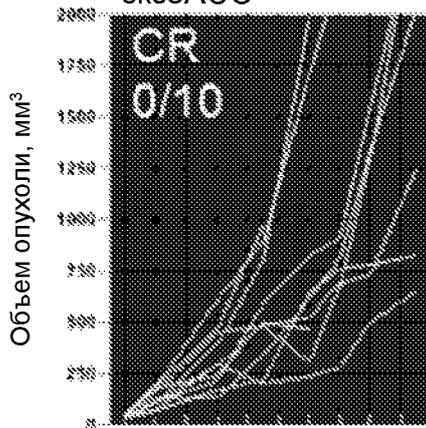


Фиг. 17E

анти-CSF1R

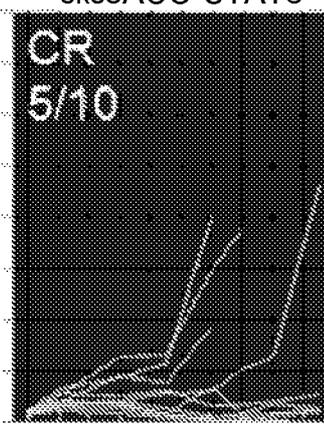


Фиг. 17F

Скремблированный  
экзоАСО

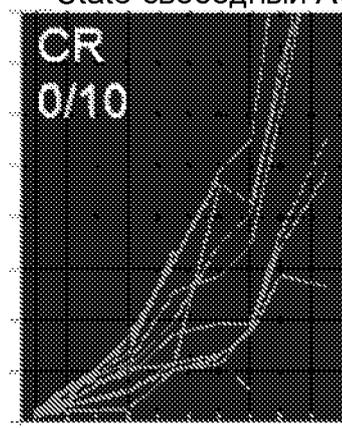
Фиг. 17G

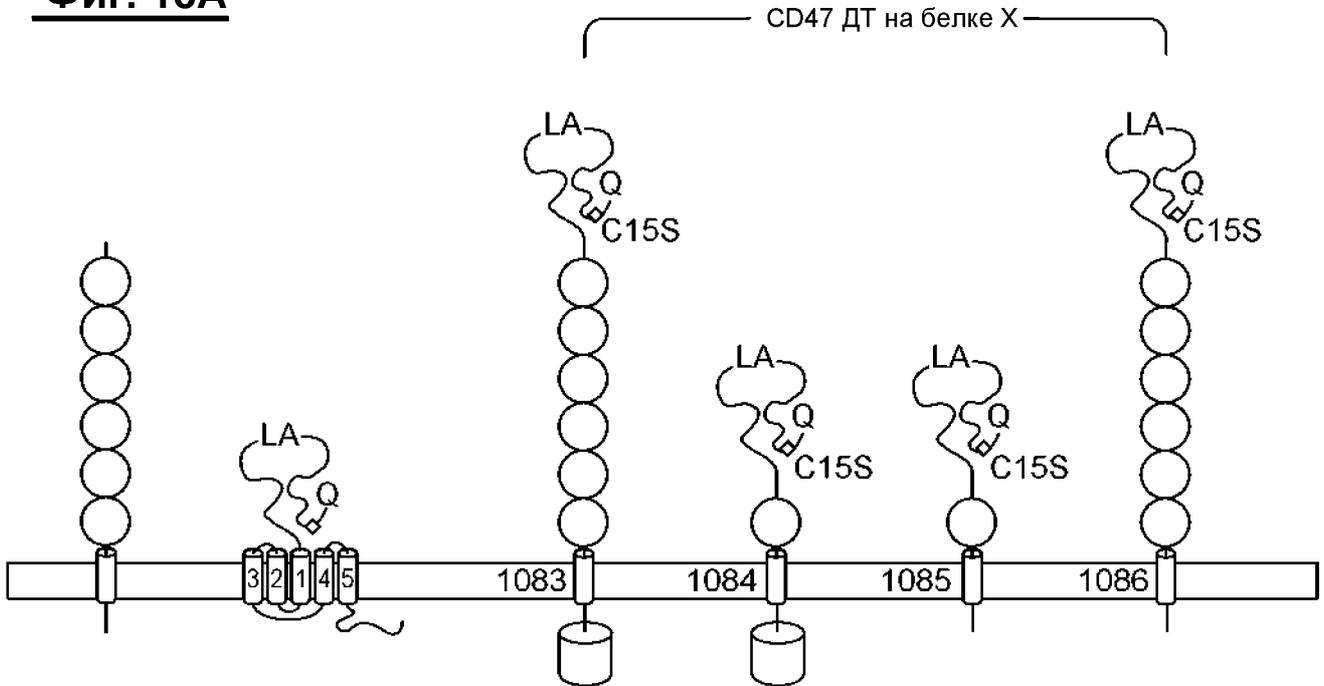
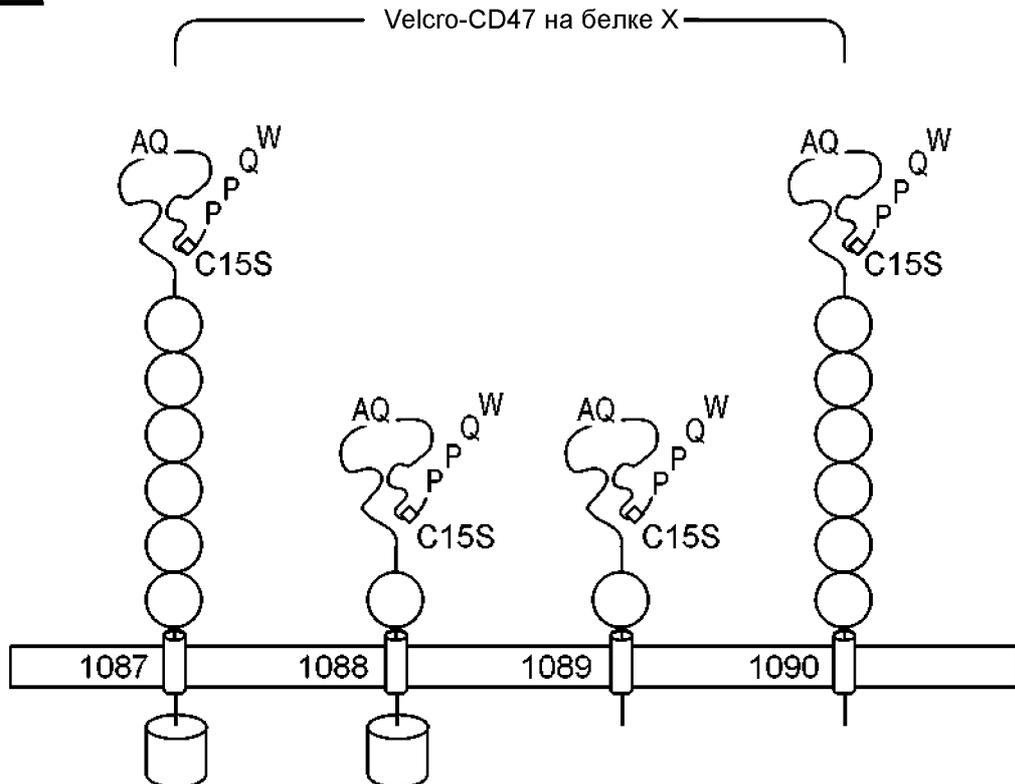
экзоАСО-STAT6

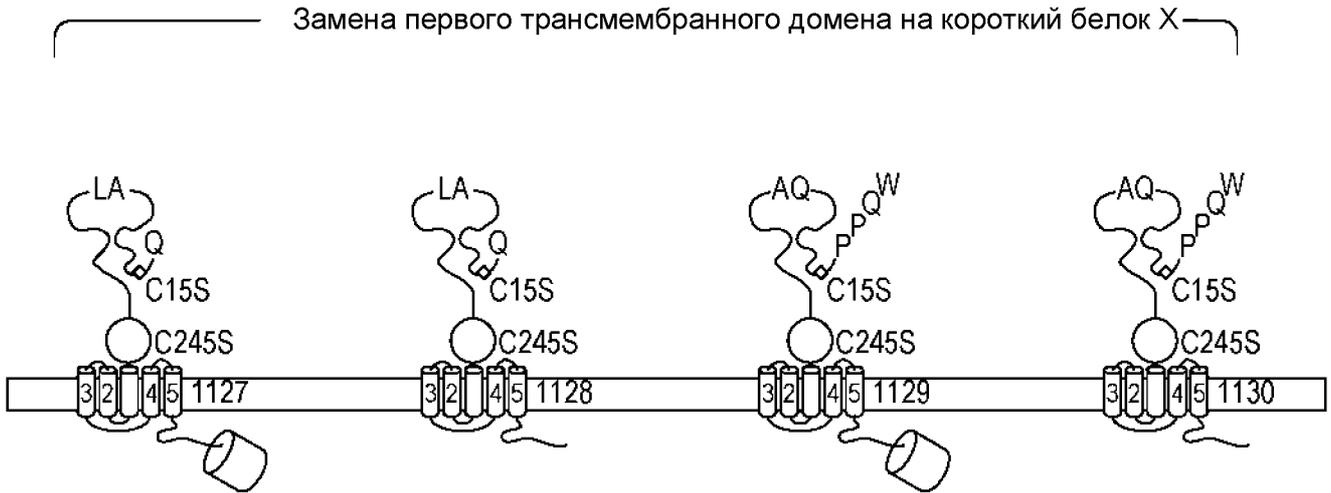
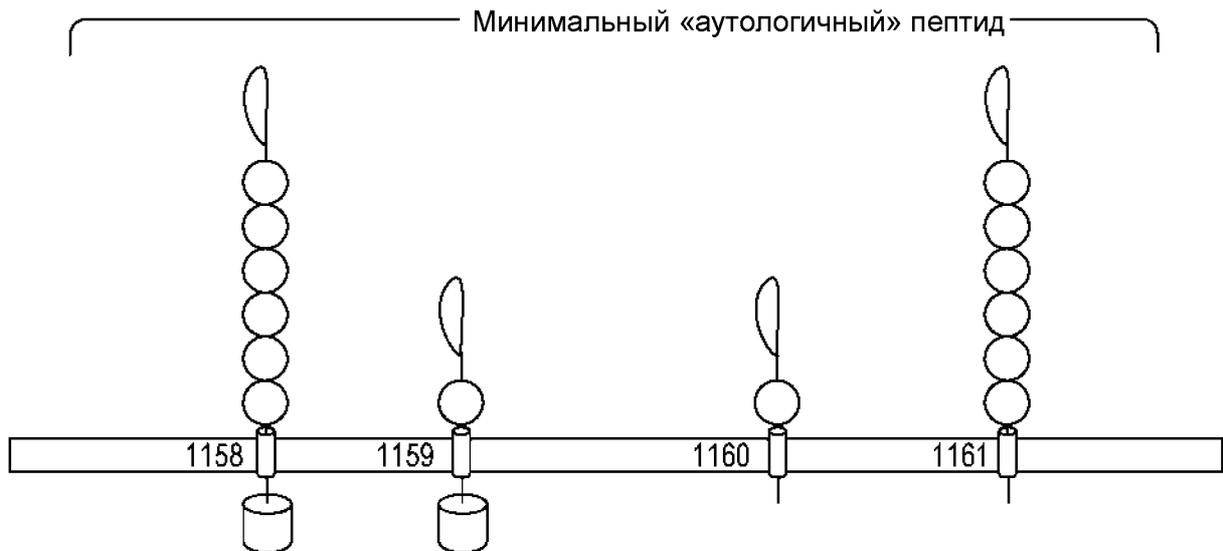


Фиг. 17H

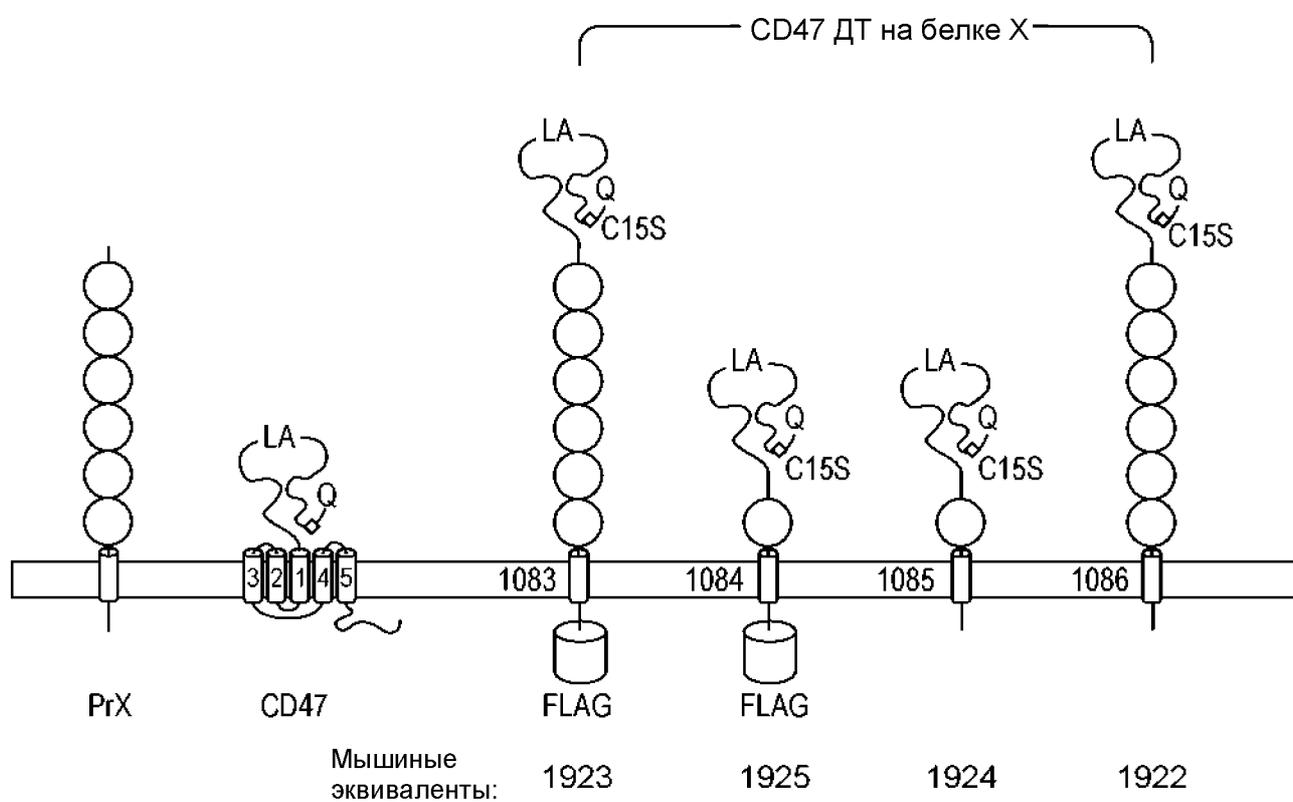
Stat6-свободный АСО



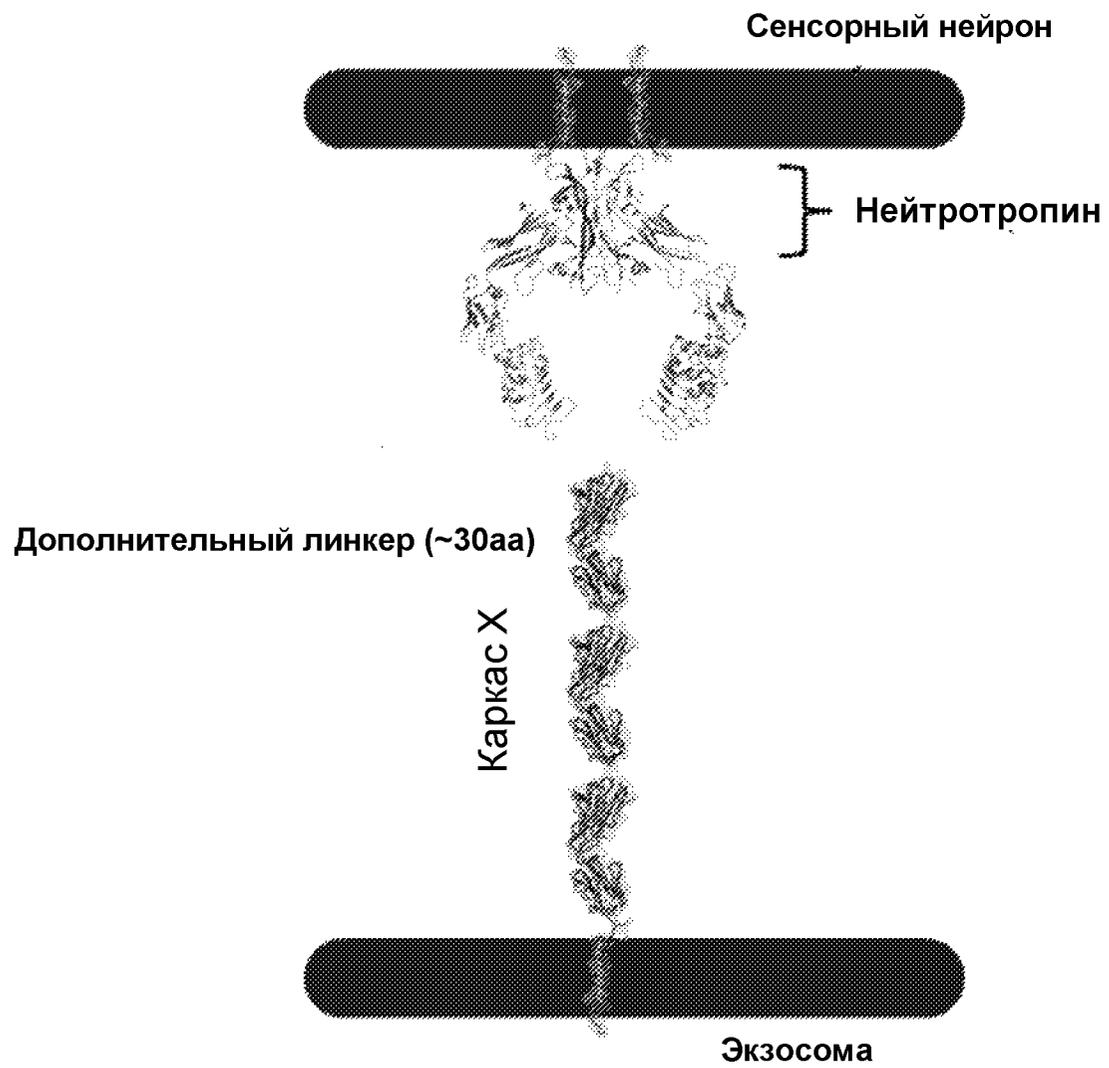
**Фиг. 18А****Фиг. 18В**

**Фиг. 18С****Фиг. 18D**

Фиг. 19



Фиг. 20А

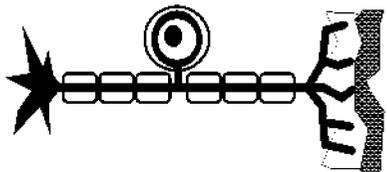


Фиг. 20В

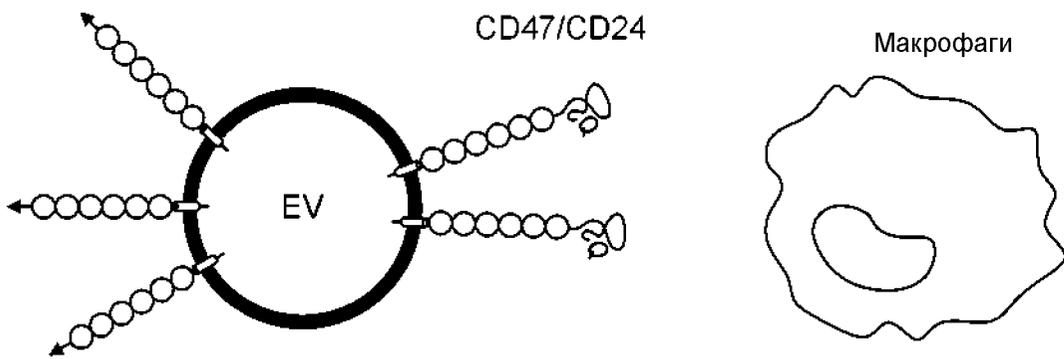
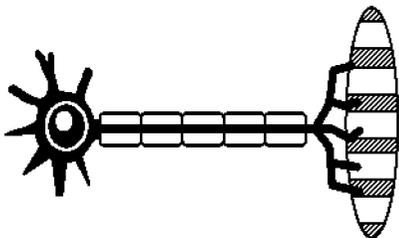
Дифференциация клеток Шванна



Восстановление сенсорных нейронов



Выживание моторных нейронов



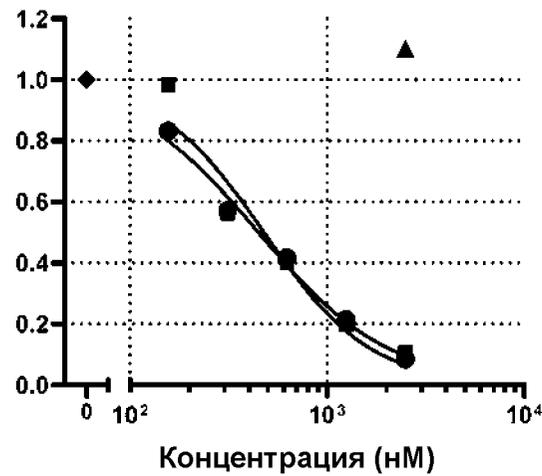
Молекулы нейротропизмов:

- Трансферрин
- RVG
- TAxI



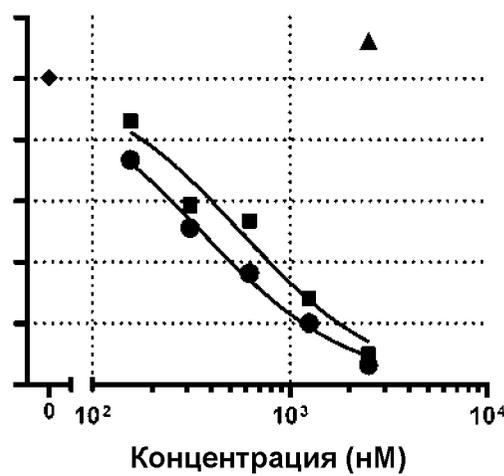
Фиг. 21А

24 ч



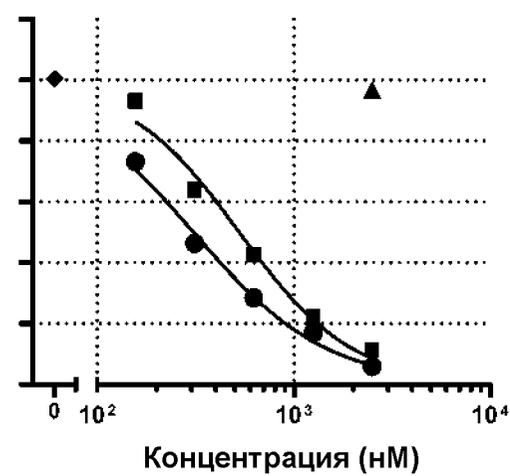
Фиг. 21В

48 ч



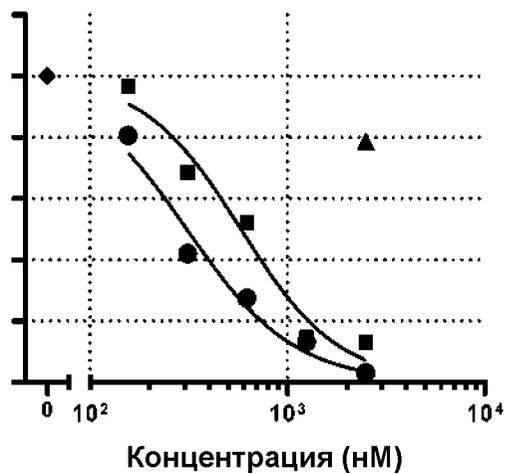
Фиг. 21С

72 ч



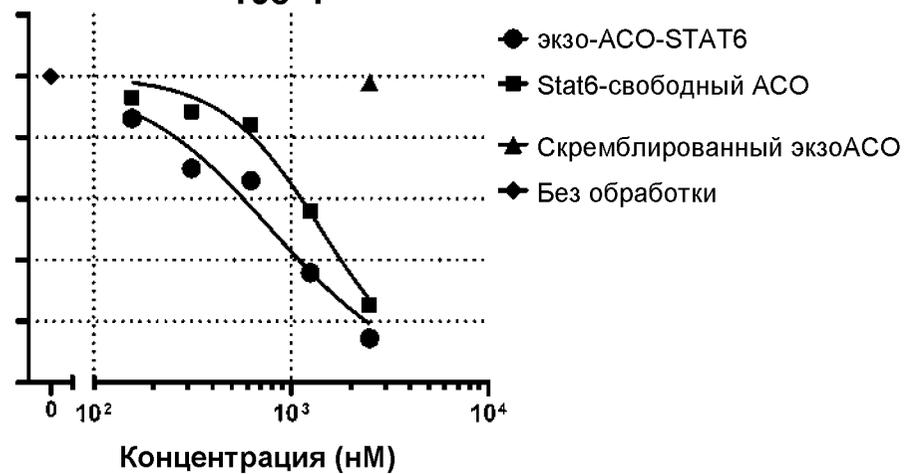
Фиг. 21D

120 ч

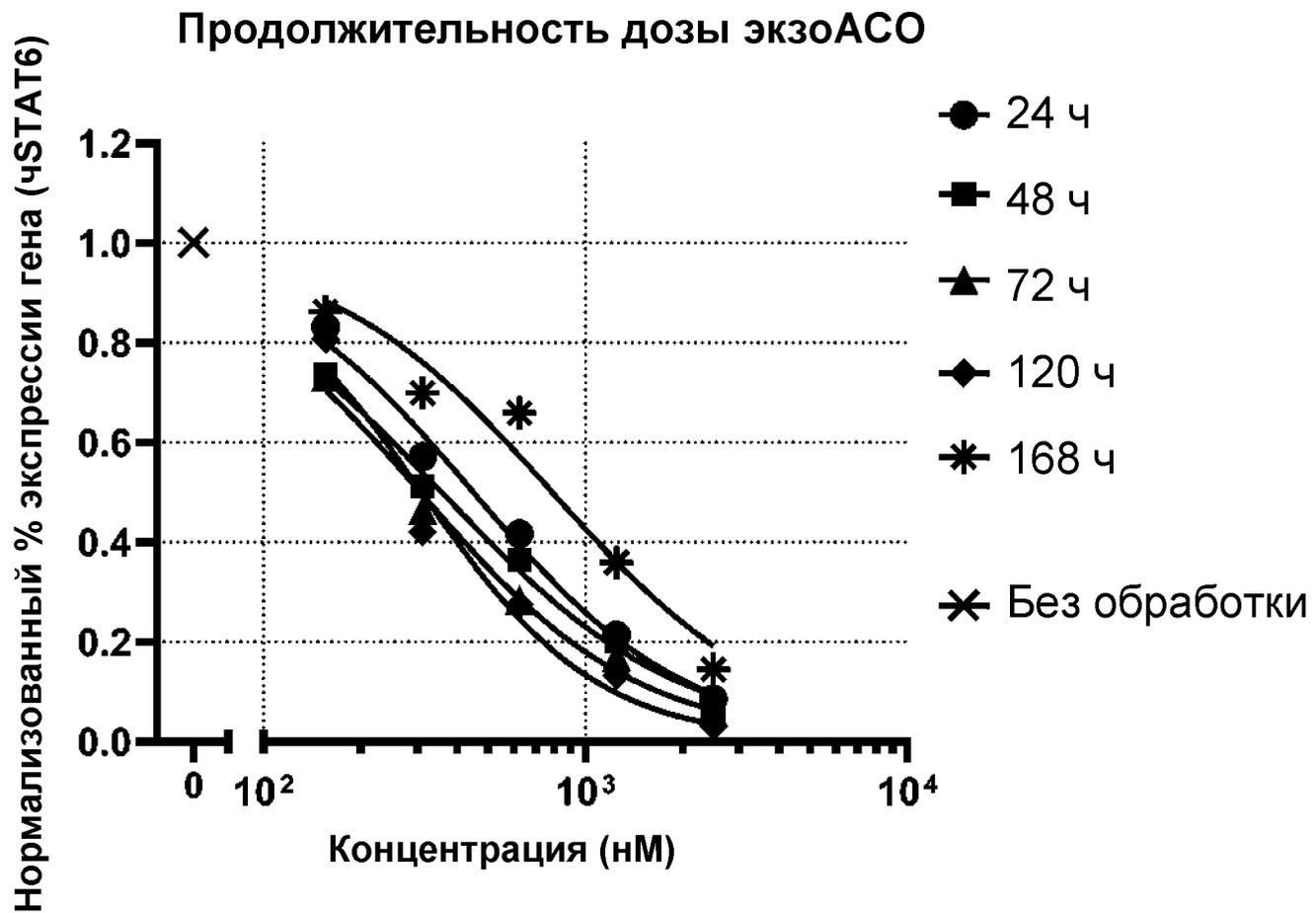


Фиг. 21Е

168 ч

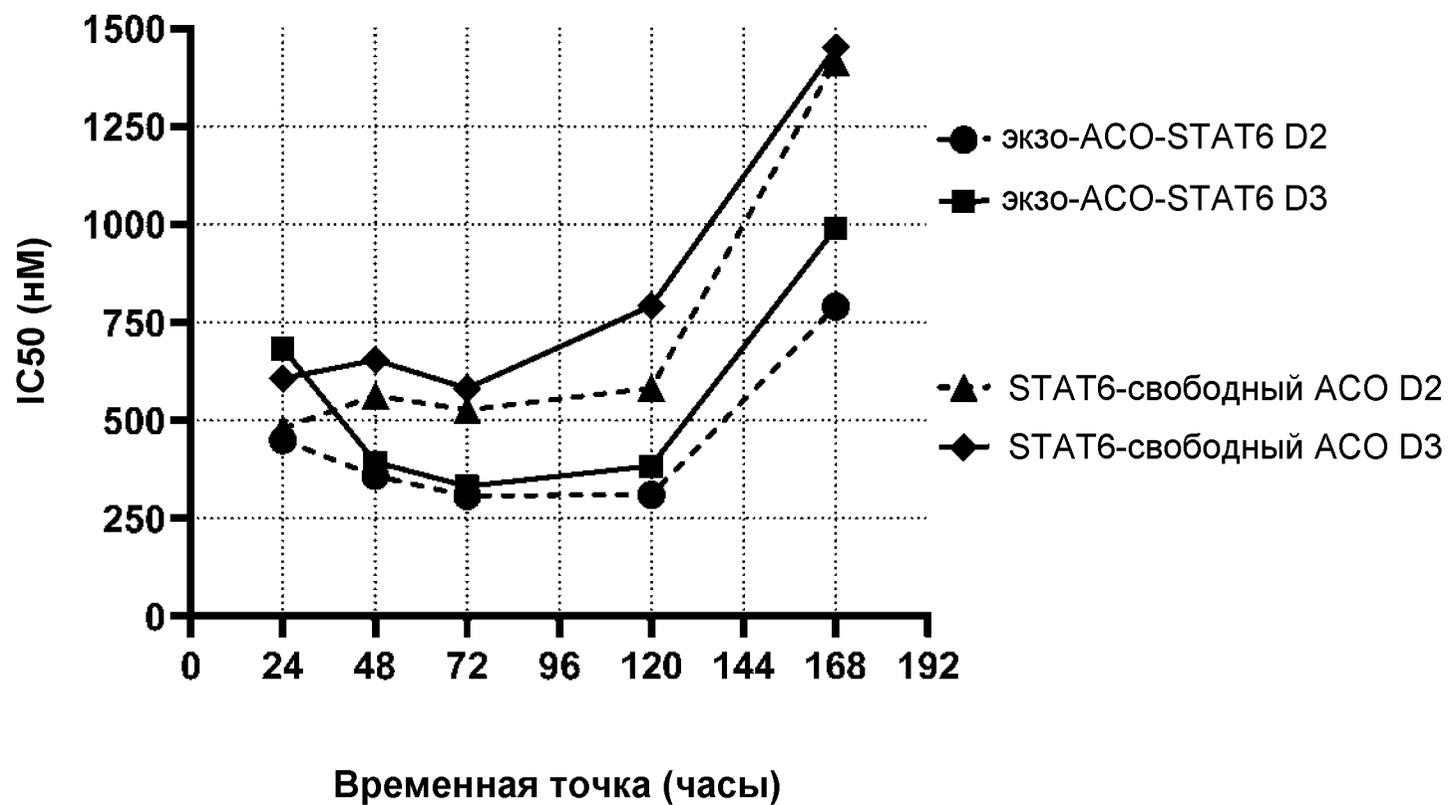


Фиг. 21F



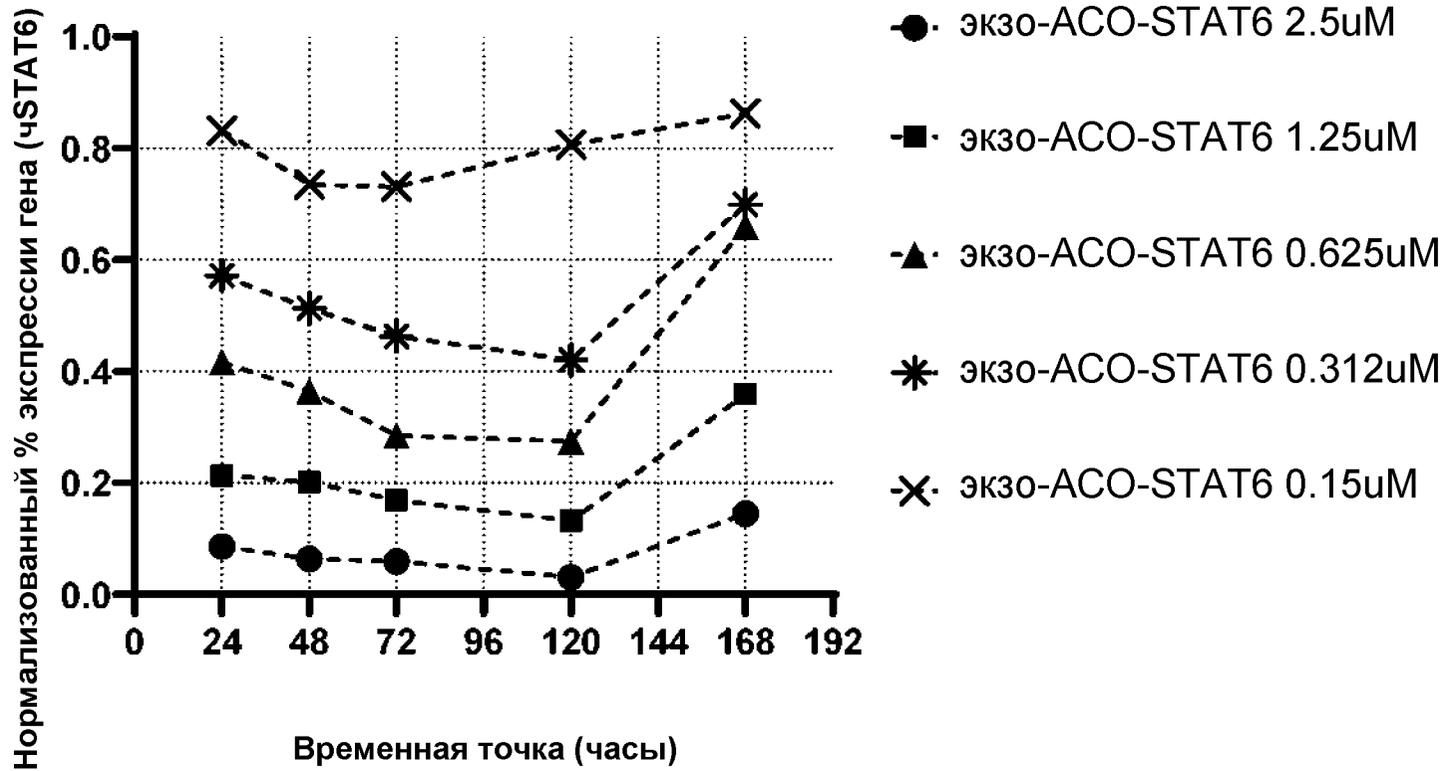
Фиг. 21G

### Продолжительность дозы: Сравнение IC50



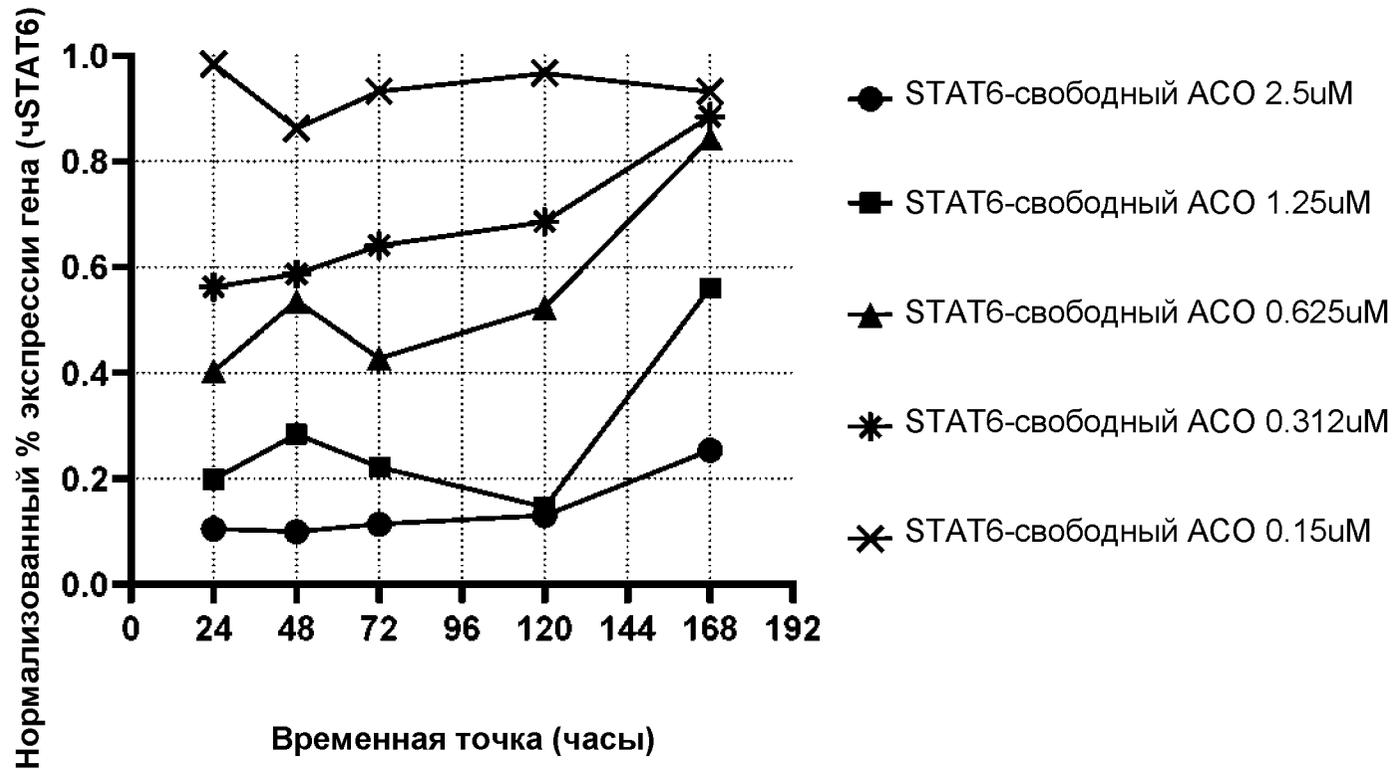
Фиг. 22А

Продолжительность дозы: Сравнение КД

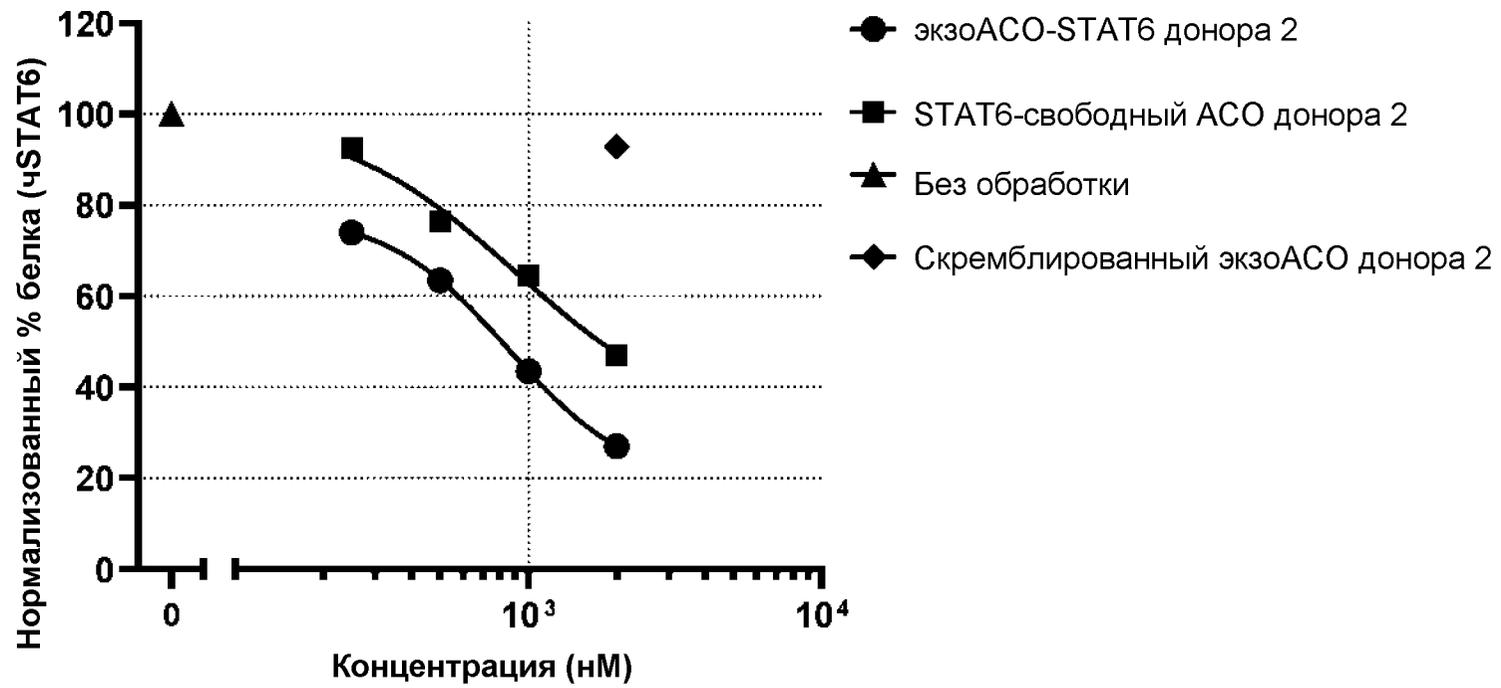


Фиг. 22В

Продолжительность дозы: Сравнение КД

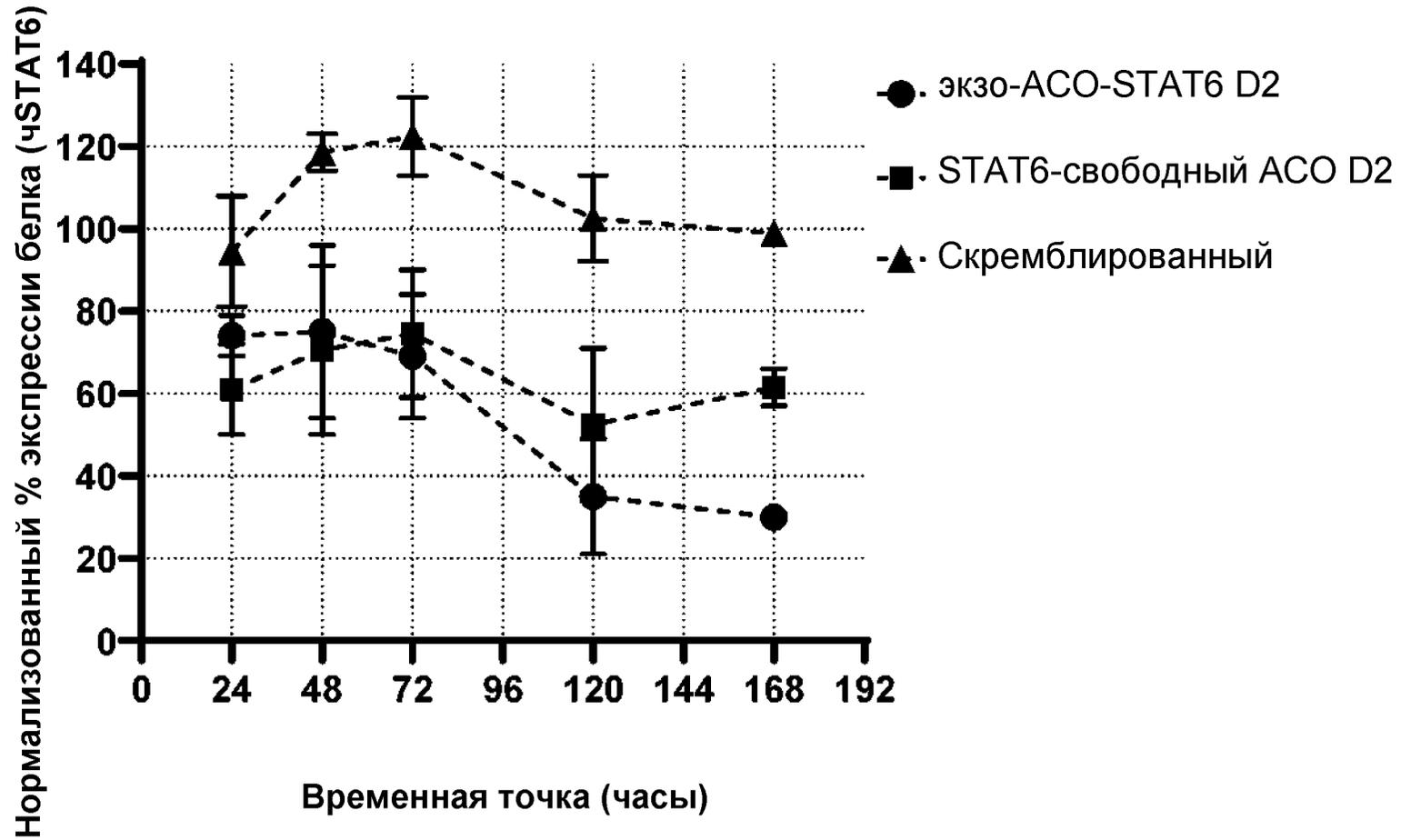


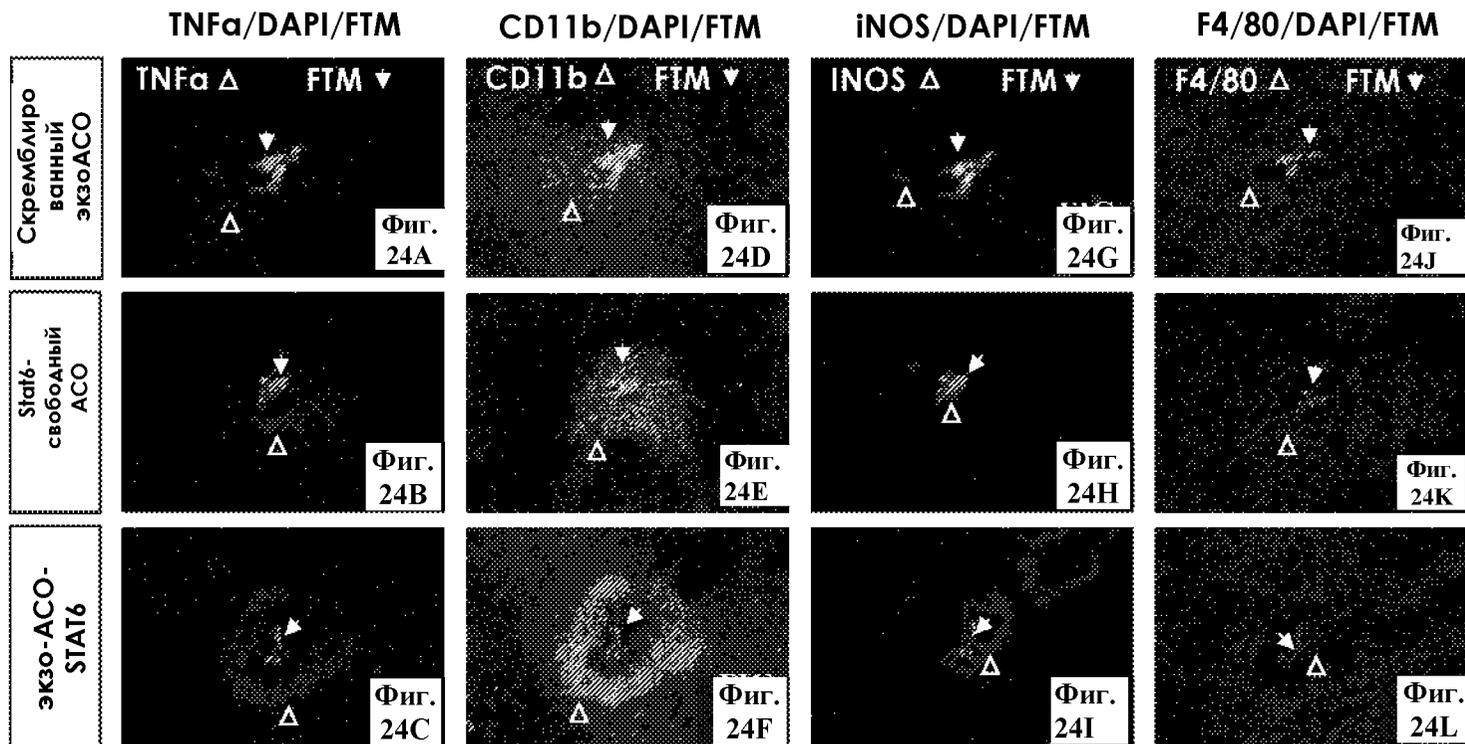
Фиг. 23А  
KD белка Stat6\_96 ч\_донор 2



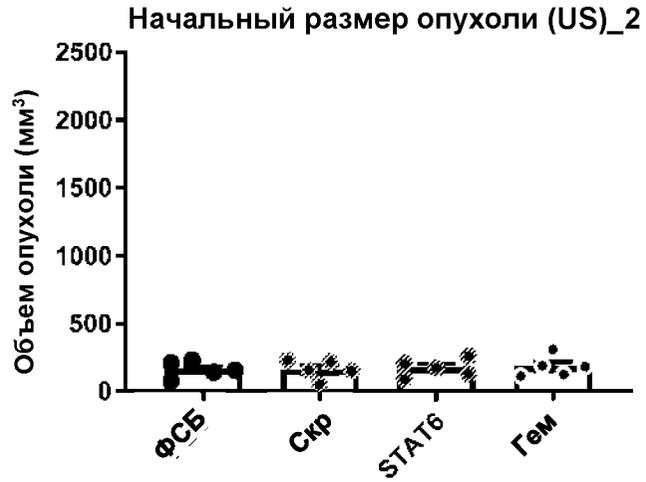
Фиг. 23В

Продолжительность дозы: Белок

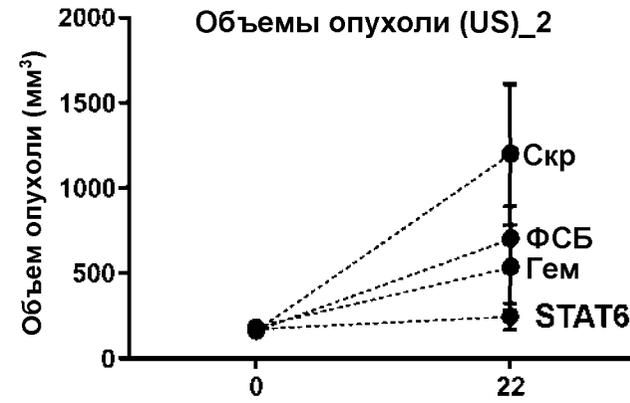




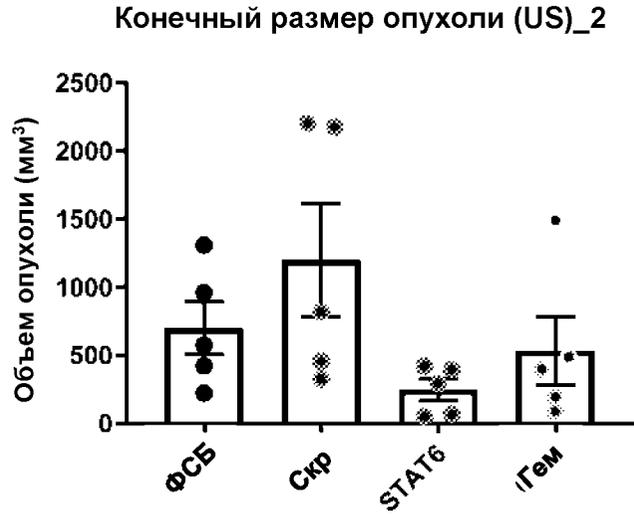
Фиг. 25А



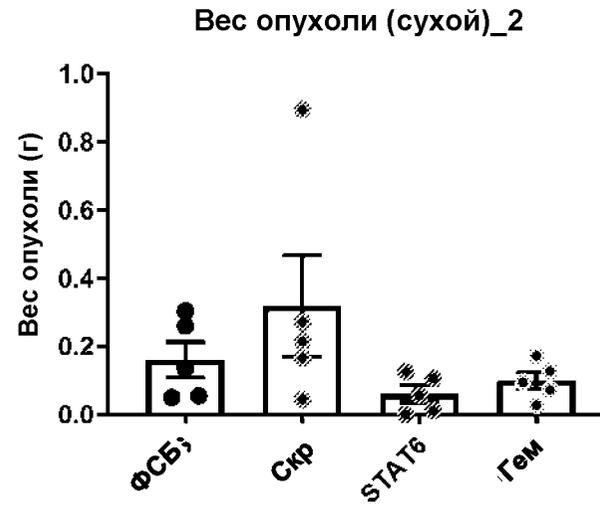
Фиг. 25В



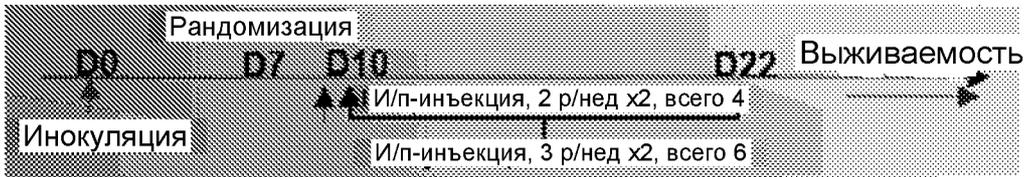
Фиг. 25С



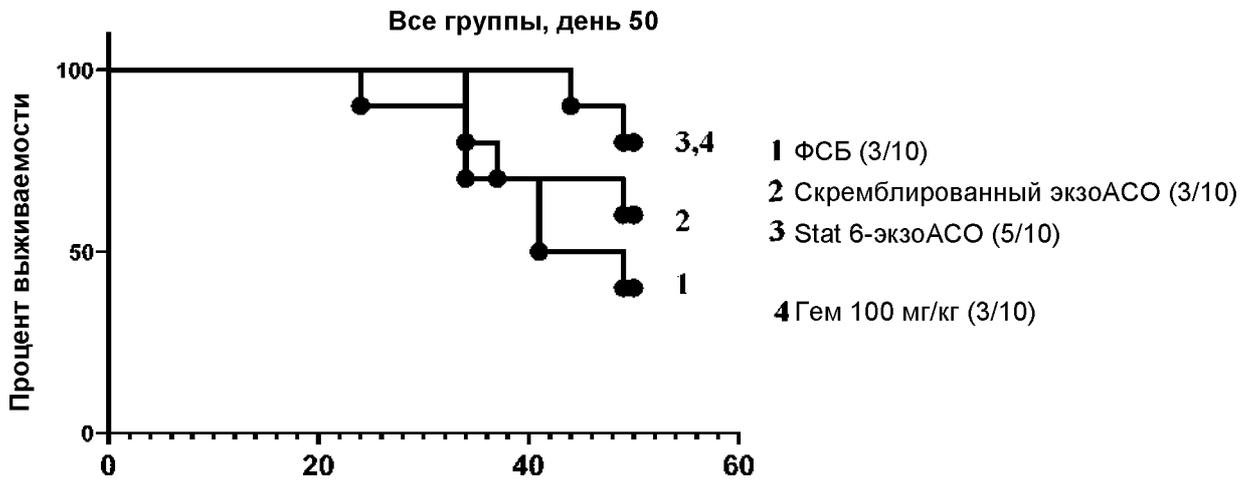
Фиг. 25D



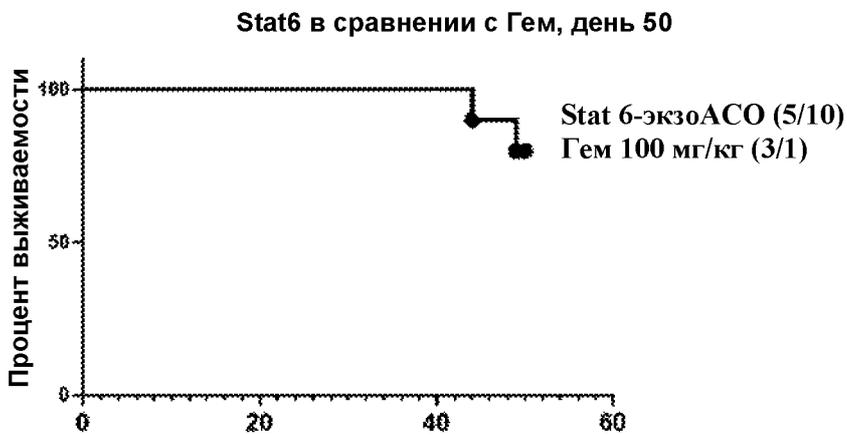
Фиг. 26А



Фиг. 26В



Фиг. 26С



Фиг. 26D

