



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.07.31

(21) Номер заявки
201171480

(22) Дата подачи заявки
2010.05.26

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)

(54) ПОЛИМЕРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ-ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

(31) 61/217,116; 61/217,117; 61/217,124;
61/217,129

(32) 2009.05.27

(33) US

(43) 2012.07.30

(86) PCT/US2010/001561

(87) WO 2010/138194 2010.12.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЕКТА БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Зепп Чарльз, Линфорд Грэйсон Б., Гао
Юнь, Джонстон Ллойд, Фу Фын-ни,
Киган Марк Дж., Болдуин Сэм (US)

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

(56) US-A1-2008160089
WALDVOGEL SIEGFRIED R. ET AL.:
"Nucleotides. Part 55. Synthesis and application
of a novel linker for solid-phase synthesis of
modified oligonucleotides", HELVETICA CHIMICA
ACTA, [Online] vol. 81, 1998, pages 46-58, XP002631549,
compounds 6, 10, 12, 37, page 47, paragraph 2

WO-A2-2005110013

WO-A1-2008079924

EP-A1-1035123

HAMMERBECK ET AL.: "Administration of a dual
toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects
against influenza in rats", ANTIVIRAL RESEARCH,
ELSEVIER BV, NL, vol. 73, no. 1, 14 January 2007
(2007-01-14), pages 1-11, XP022575655, ISSN: 0166-3542,
DOI: DOI:10.1016/J.ANTIVIRAL.2006.07.011, page 2,
section 2.1. "compounds"

WO-A2-2009051837

TONG RONG ET AL.: "Ring-Opening
Polymerization-Mediated Controlled Formulation of
Polylactide-Drug Nanoparticles", JOURNAL OF THE
AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 131, no. 13,
April 2009 (2009-04), pages 4744-4754, XP002631550,
ISSN: 0002-7863, page 4746, left-hand column, paragraph 2

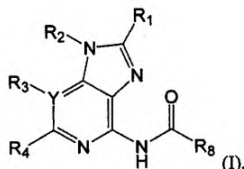
ZHANG Z. ET AL.: "Nanoparticles of poly(lactide)/
vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy:
Synthesis, formulation, characterization and in vitro
drug release", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE
PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 27, no.
2, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 262-270,
XP025096972, ISSN: 0142-9612, DOI: DOI:10.1016/
J.BIOMATERIALS.2005.05.104 [retrieved on 2006-01-01],
page 265; figure 1

WO-A1-2010042870

WO-A2-2010138193

WO-A2-2010138192

(57) Изобретение относится к соединениям формулы (I)



где R₁-R₄, Y имеют значения, определенные в формуле изобретения, R₈ означает биоразлагаемый полимер или его элементарное звено, где биоразлагаемый полимер или его элементарное звено включает сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид или их элементарное звено. Изобретение относится также к композиции, содержащей указанное соединение (I), фармацевтической композиции, включающей вакцину, содержащую соединение (I), способу модуляции иммунного ответа введением соединения (I). Изобретение относится также к способам получения конъюгата, включающего структуру формулы (I). Конъюгаты могут содержаться в синтетических наноносителях, и иммуномодулирующие средства могут высвобождаться из синтетических наноносителей зависимым от pH способом.

Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет согласно 35 U.S.C. § 119 США предварительным заявкам 61/217129, 61/217117, 61/217124 и 61/217116, каждая из которых подана 27 мая 2009 года, содержание каждой из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Область изобретения

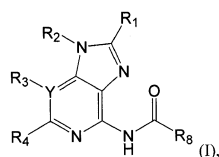
Данное изобретение относится к композициям, а также к соединениям и способам, конъюгатов иммуномодулирующих средств и полимеров или их элементарного звена (элементарных звеньев). Конъюгаты могут содержаться в синтетических наноносителях, и иммуномодулирующие средства могут высвобождаться из синтетических наноносителей pH-зависимым способом.

Предпосылки

Иммуномодулирующие средства применяют для получения иммунных ответов у субъектов. Время от времени предпочтительно присоединять такие средства к носителям для доставки. На данный момент известные для присоединения химические соединения часто нуждаются в определенных реакционноспособных группах, использовании определенных этапов активации для осуществления присоединения и/или они в итоге дают конъюгаты, которые не проявляют оптимальных свойств. Таким образом, существует необходимость в новых способах присоединения иммуномодулирующих средств к носителям для доставки, а также необходимость в получаемых в результате конъюгатах, которые проявляют требуемые свойства.

Краткое описание данного изобретения

В одном аспекте данное изобретение предлагает соединение, которое включает структуру как в формуле (I)



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено, где биоразлагаемый полимер или его элементарное звено включает сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид или их элементарное звено.

В другом варианте осуществления биоразлагаемый полимер или его элементарное звено включает поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер поли(гликолевой и молочной кислот) или поликапролактон или их элементарные звенья.

В одном варианте осуществления соединения формулы (I) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой изобутил, Y представляет собой C, и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены. В другом варианте осуществления R₁ представляет собой этоксиметил, R₂ представляет собой гидроксиизобутил, Y - C, и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены. В еще одном варианте осуществления R₁ представляет собой этоксиметил, R₂ представляет собой метансульфонамидоизобутил, Y - C, и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены. В одном варианте осуществления R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, Y - N, R₃ отсутствует, и R₄ представляет собой бутокси. В другом варианте осуществления Y представляет собой N, R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, R₃ отсутствует, и R₄ представляет собой бутиламино. В еще одном варианте осуществления Y представляет собой N, R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, R₃ отсутствует, и R₄ представляет собой бутокси. В еще одном варианте осуществления Y представляет собой N, R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, R₃ отсутствует, и R₄ представляет собой пентил.

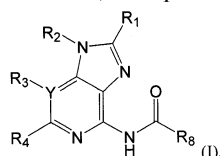
В одном варианте осуществления соединения формулы (I) полимер является нерастворимым в воде

при pH 7,4 и при 25°C. В одном варианте осуществления соединения формулы (I) полимер имеет средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, который определяют с помощью гелепроникающей хроматографии. В другом варианте осуществления соединения формулы (I) полимер или его элементарное звено не содержит поликеталь или его элементарное звено. В одном варианте осуществления приводится композиция, включающая соединение с формулой (I). В следующем варианте осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый эксципиент.

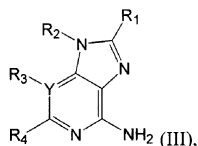
В одном варианте осуществления приводится синтетический наноноситель, включающий соединение с формулой (I). В другом варианте осуществления приводится композиция, содержащая синтетический наноноситель. В еще одном следующем варианте осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый эксципиент.

В одном варианте осуществления приводится композиция, содержащая вакцину, которая содержит соединение формулы (I). В другом варианте осуществления приводится композиция, содержащая вакцину, которая содержит композицию, содержащую соединение формулы (I). В еще другом варианте осуществления приводится способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеописанных соединений.

В одном аспекте способ получения конъюгата, который включает структуру как в формуле (I)



включает активацию биоразлагаемого полимера или его элементарного звена и воздействие на активированный биоразлагаемый полимер или его элементарное звено и соединение, включающее структуру как в формуле (III), основанием и/или растворителем



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

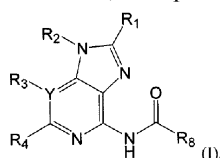
Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

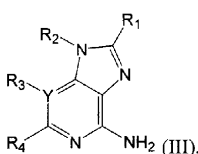
R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R₄ не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

В другом аспекте способ получения конъюгата, который включает структуру как в формуле (I)



включает воздействие на композицию, содержащую полимер или его элементарное звено и соединение, которое включает структуру как в формуле (III), агентом сочетания и основанием и/или растворителем



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с об-

разованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R_4 представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R_4 не объединен с R_3 с образованием 6-членного карбоцикла; или R_4 объединен с R_3 с образованием 6-членного карбоцикла; и

R_8 представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует высвобождение резиквиода (R848) из составов синтетического наноносителя при pH 7,4, 37°C.

Фиг. 2 демонстрирует высвобождение R848 из составов синтетического наноносителя при pH 4,5, 37°C.

Фиг. 3 демонстрирует высвобождение R848 из составов синтетического наноносителя при pH 7,4 и pH 4,5 за 24 ч.

Фиг. 4 демонстрирует уровень индукции антител синтетическими наноносителями с CpG-содержащей иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой (группы 2 и 3) по сравнению с уровнем индукции антител синтетическими наноносителями без CpG-содержащей иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты (группа 1).

Фиг. 5 демонстрирует уровень индукции антител синтетическими наноносителями, которые высвобождают сложный фосфодиэфир, CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту без остатка тиокислоты или CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту с остатком тиокислоты.

Фиг. 6 демонстрирует уровень индукции антител синтетическими наноносителями, которые высвобождают R848 с различными скоростями.

Подробное описание

Прежде чем описывать данное изобретение в деталях должно быть понятно, что это изобретение не ограничивается отдельно проиллюстрированными материалами или технологическими параметрами, которые, конечно, могут различаться. Также следует понимать, что терминология, использованная в настоящем документе, применена только с целью описания отдельных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения применения альтернативной терминологии для описания данного изобретения.

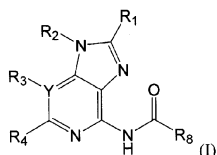
Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе выше или ниже, включены в данный документ в качестве ссылки во всей их полноте для любых целей.

Как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки с множественным числом, если содержание четко не диктует иное. Например, ссылка на "полимер" включает смесь из двух или более подобных молекул, ссылка на "растворитель" включает смесь из двух или более подобных растворителей, ссылка на "адгезив" включает смеси из двух или более подобных материалов и т.п.

Введение

Изобретатели неожиданно и к удивлению обнаружили, что проблемы и ограничения, отмеченные выше, могут быть преодолены применением изобретения, раскрытого в данном документе. В частности, изобретатели неожиданно обнаружили, что возможно доставлять соединения наряду с соответствующими композициями и способами, которые включают

структуру как в формуле (I)



где R_1 - H, OH, SH, NH_2 или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R_2 - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или $-NHSO_2CH_3$;

Y - N или C;

R_3 отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R_3 представляет собой H, или R_3 объединен с R_4 с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R_4 представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда не объединен с R_3 с образованием 6-членного карбоцикла или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены; или R_4 объединен с R_3 с образованием 6-членного карбоцикла; и

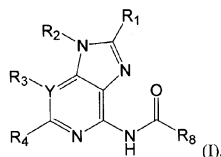
R_8 представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено, где биоразлагаемый

полимер или его элементарное звено включает сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид или их элементарное звено.

При применении синтетических наноносителей для получения иммунного ответа у субъекта предпочтительно вместе с синтетическими наноносителями включать иммуномодулирующее средство. Подобное средство включает средства, которые являются иммуномодулирующими, если не связаны с синтетическим наноносителем, но могут не проявлять иммуномодулирующие свойства при присоединении к синтетическому наноносителю. Особенно предпочтительно включать иммуномодулирующее средство собственно как часть синтетических наноносителей. Для достижения этого иммуномодулирующее средство можно ковалентно присоединить к соответствующему полимеру или его элементарному звену. Отсюда следует, что соединения и конъюгаты, приведенные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают иммуномодулирующее средство, которое, как подразумевается, включает средство, которое является иммуномодулирующим, если не связано с полимером или его элементарным звеном, но которое может не проявлять иммуномодулирующие свойства при связывании с полимером или его элементарным звеном. Приведенные в данном документе соединения можно включить в один или несколько синтетических наноносителей. Соединения включают в синтетические наноносители посредством способов, известных в данной области техники или описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления приведенным полимером или его элементарным звеном из соединений или конъюгатов является биоразлагаемый полимер или его элементарное звено. Полимер или его элементарное звено, таким образом, может включать сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид или их элементарные звенья. Отсюда следует, что полимер или его элементарное звено могут включать поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер поли(гликолевой и молочной кислот) или поликапролактон или их элементарные звенья. В целом предпочтительно, чтобы если полимер включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль) (PEG) или его элементарное звено, полимером является блок-сополимер простого полиэфира и биоразлагаемого полимера с тем, чтобы полимер разрушался естественными факторами. В некоторых вариантах осуществления полимер или его элементарное звено не включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль), или его элементарное звено. В других вариантах осуществления полимер сам по себе не включает простой полиэфир или его элементарное звено, такой как поли(этиленгликоль) или его элементарное звено. В целом, для применения в составе синтетического наноносителя полимер из соединений или конъюгатов, приведенных в данном документе, является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C, биоразлагаемым или и то, и другое. Соединения, конъюгаты и синтетические наноносители, приведенные в данном документе, являются уникальными в композиции и являются пригодными для получения вакцин и связанных материалов.

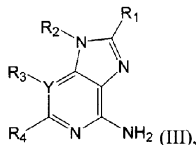
Также приведены способы создания вышеупомянутых соединений. В вариантах осуществления способ создания конъюгата, который включает структуру как в формуле (I)



включает

активацию биоразлагаемого полимера или его элементарного звена и

воздействие на активированный биоразлагаемый полимер или его элементарное звено и соединение, которое включает структуру как в формуле (III), основанием и/или растворителем



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

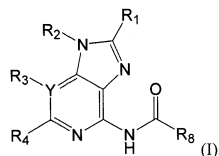
R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R₄ не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

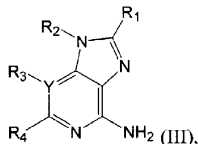
В других вариантах осуществления способ создания конъюгата, который включает структуру как в

формуле (I)



включает

воздействие на композицию, содержащую полимер или его элементарное звено и соединение, которое включает структуру как в формуле (III), агентом сочетания и основанием и/или растворителем



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R₄ не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

Было открыто, что возможно присоединение средств, таких как иммуномодулирующие средства, включающих структуру как в формуле (III), к полимеру или его элементарному звену со спиртом на конце. В целом, спирты, находящиеся на конце, являются менее реакционноспособными, делая химию присоединения затруднительной.

Изобретатели также неожиданно и к удивлению открыли, что возможно создание полимерных синтетических наноносителей с помощью полимеров, которые имеют средневесовой молекулярный вес, варьирующийся в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да, который определяется с помощью гелепроникающей хроматографии. Как в целом полагали, молекулярный вес полимеров в составе полимерных синтетических наноносителей должен составлять или превышать 10000 Да. Иногда прикрепление к полимерам иммуномодулирующего соединения, которое может высвобождаться из синтетического наноносителя в результате этапа неспецифического распада в организме, является преимущественным. Если необходимо использовать синтетические наноносители для целенаправленного воздействия на эндосомальный/лизосомальный компартмент, то, в частности, преимущественно то, чтобы данный этап распада проходил предпочтительно при кислом pH. Одним из недостатков прикрепления иммуномодулирующего средства к полимеру является то, что загрузка снижается по мере увеличения молекулярного веса полимера. Кроме того, поскольку молекулярный вес увеличивается, то увеличивается гидрофобность полимера, в результате чего скорость распада при данном pH может снизиться. Это приводит к нежелательно пониженной скорости высвобождения иммуномодулирующего средства. Неожиданно было обнаружено, что низкомолекулярные полимеры со средневесовым молекулярным весом, варьирующимся в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да, образуют стабильные синтетические наноносители, и что скорость высвобождения иммуномодулирующего средства из синтетического наноносителя повышается по мере снижения молекулярного веса. Полимер из приведенных в данном документе соединений, таким образом, в вариантах осуществления имеет средневесовой молекулярный вес, варьирующийся в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да, и такие соединения можно применять для получения синтетических наноносителей.

Приведенные в данном документе соединения или синтетические наноносители, которые включают данные соединения, могут быть также чувствительными к pH (т.е. проявляют повышенное высвобождение иммуномодулирующего средства при pH или около 4,5 по сравнению с высвобождением иммуномодулирующего средства при или около значения физиологического pH (т.е. pH или 7,4). Свойство обладания относительно низким высвобождением иммуномодулирующих средств при или около значения физиологического pH, но повышенным высвобождением при или около pH 4,5 является желательным для его нацеливания иммуномодулирующих средств на эндосомальный/лизосомальный компартмент, например, антигенпрезентирующих клеток (APC), которые склонны иметь pH, который равен или около 4,5. Этот низкий уровень pH обнаруживают в основном в верхней части пищеварительного тракта и эндосомах/лизосомах. Соответственно, если только соединения и композиции по данному изобретению

вводят не через пероральный путь введения, то ускоренное высвобождение при или около pH 4,5 обеспечивает повышенную концентрацию иммуномодулирующего средства в целевом компартменте. При данных условиях иммуномодулирующее средство проявляет pH-зависимую диссоциацию и затем имеет возможность взаимодействовать с рецепторами в эндосоме/лизосоме и стимулировать требуемый иммунный ответ. Кроме того, поскольку связывание полимера может происходить в положении на иммуномодулирующем средстве или представляющем интерес соединении, что, в целом, значительно уменьшает или исключает биологическую активность иммуномодулирующего средства или представляющего интерес соединения, то связывание может эффективно давать эффект наподобие "пролекарства". Данный эффект в сочетании с повышенным высвобождением в условиях, присутствующих в эндосоме/лизосоме, означает что нецелевые эффекты (например, побочные эффекты) уменьшаются, а пределы безопасности возрастают для композиций и вакцин, которые включают соединения и композиции по данному изобретению.

Данное изобретение теперь будет описано более подробно.

Определения.

"Введение" или "ввод" означает обеспечение соединения, конъюгата, синтетического наноносителя или композиции, приведенных в данном документе, пациенту фармакологически пригодным способом.

"Признак нацеливания на APC" означает одну или более частей, из которых состоят синтетические наноносители по данному изобретению, которые нацеливают синтетические наноносители на специализированные антигенпрезентирующие клетки ("APC"), такие как, но, не ограничиваясь этим, дендритные клетки, SCS макрофаги, фолликулярные дендритные клетки и В-клетки. В вариантах осуществления признак нацеливания на APC может содержать иммуноспецифическую поверхность(ти) и/или нацеливающие фрагменты, которые связывают известные мишени на APC. В вариантах осуществления признаки нацеливания на APC могут включать один или более В-клеточных антигенов на поверхности синтетического наноносителя. В вариантах осуществления признаки нацеливания на APC могут также включать один или более размеров синтетических наночастиц, которые выбраны с тем, чтобы способствовать поглощению APC.

В вариантах осуществления нацеливающие фрагменты для известных мишеней на макрофагах ("МФ") содержат любой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с любым объектом (например, белок, липид, углевод, малая молекула и т.д.), который заметно экспрессирован и/или представлен на макрофагах (т.е. маркеры макрофагов субкапсулярного синуса). Иллюстративные маркеры СКС-МФ включают, но не ограничиваются, CD4 (L3T4, W3/25, T4); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 α , α L-цепь интегрина); CD11b (α M-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (α X-интегрин, p150, 95, AXb2); CDw12 (p90-120); CD13 (APN, gp150, EC 3.4.11.2); CD14 (LPS-R); CD15 (Х-гаптен, Льюис X, SSEA-1, 3-FAL); CD15s (сиалил-Льюис X); CD15u (3'-сульфо-Льюис X); CD15su (6-сульфосиалил-Льюис X); CD16a (FCRIIIA); CD16b (Fc γ RIIIb); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин β 2, CD11a,b,c β -субъединица); CD26 (DPP IV эктоэнзим, ADA-связывающий белок); CD29 (тромбоцитарный GPIIa, β -1 интегрин, GP); CD31 (PECAM-1, эндокам); CD32 (FC γ RII); CD33 (gp67); CD35 (CR1, C3b/C4b рецептор); CD36 (GpIIIb, GPIV, PASIV); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD43 (сиалофорин, лейкосиалин); CD44 (EMCR2, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейтрофилин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49a (VLA-1 α , α 1-интегрин); CD49b (VLA-2 α , gpl α , α 2-интегрин); CD49c (VLA-3 α , α 3-интегрин); CD49e (VLA-5 α , α 5-интегрин); CD49f (VLA-6 α , α 6-интегрин, gp1c); CD50 (ICAM-3); CD51 (интегрин α , VNR- α , витронектин-R α); CD52 (CAMPATH-1, HE5); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD59 (1F5Ag, H19, протектин, MACIF, M1RL, P-18); CD60a (GD3); CD60b (9-O-ацетил GD3); CD61 (GP IIIa, β 3-интегрин); CD62L (L-селектин, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD63 (LIMP, MLA1, gp55, NGA, LAMP-3, ME491); CD64 (Fc γ RI); CD65 (церамид, VIM-2); CD65s (сиалированный CD65, VIM2); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиалозамаскированный лактозамин); CD75S (α 2,6-сиалированный лактозамин); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD84 (p75, GR6); CD85a (ILT5, LIR2, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD87 (uPAR); CD88 (C5aR); CD89 (Fc-рецептор к IgA, Fc α R); CD91 (α 2M-R, LRP); CDw92 (p70); CDw93 (GR11); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD97 (BL-KDD/F12); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD99R (CD99, связываемый моноклональными антителами); CD100 (SEMA4D); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD102 (ICAM-2); CD111 (PVRL1, HveC, PRR1, нектин 1, HIgR); CD112 (HveB, PRR2, PVRL2, нектин 2); CD114 (CSF3R, G-CSFR, HG-CSFR); CD115 (c-fms, CSF-1R, M-CSFR); CD116 (GMCSFR α); CDw119 (IFN γ R, IFN γ RA); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2R β); CD123 (IL-3R α); CD124 (IL-4R α); CD127 (p90, IL-7R, IL-7R α); CD128a (IL-8Ra, CXCR1, ориентировочно переименованный как CD181); CD128b (IL-8Rb, CSCR2, ориентировочно переименованный как CD182); CD130 (gp130); CD131 (общая β -субъединица); CD132 (общая γ -цепь, IL-2R γ); CDw136 (MSP-R, RON, p158-ron); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD141 (тромбо-

модулин, фетомодулин); CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD148 (HPTP-η, p260, DEP-1); CD155 (PVR); CD156a (CD156, ADAM8, MS2); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CDw156C (ADAM10); CD157 (Mo5, BST-1); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD165 (AD2, gp37); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (сиалоадгезин, сиглек-1); CD170 (сиглек-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1α, MyD-1); CD172b (SIRPβ); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD181 (CXCR1, (прежде известный как CD128a)); CD182 (CXCR2, (прежде известный как CD128b)); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD191 (CCR1); CD192 (CCR2); CD195 (CCR5); CDw197 (CCR7 (был CDw197)); CDw198 (CCR8); CD204 (MSR); CD205 (DEC-25); CD206 (MMR); CD207 (лангерин); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD224 (GGT); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD230 (прионный белок (PrP)); CD232 (VESP-R); CD244 (2B4, P38, NAIL); CD245 (p220/240); CD256 (APRIL, TALL2, суперсемейство TNF (лиганд), член 13); CD257 (BLYS, TALL1, суперсемейство TNF (лиганд), член 13b); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNBF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD277 (BT3.1, семейство B7: бутирофилин 3); CD280 (TEM22, ENDO180); CD281 (TLR1, TOLL-подобный рецептор 1); CD282 (TLR2, TOLL-подобный рецептор 2); CD284 (TLR4, TOLL-подобный рецептор 4); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, Na/K-АТФаза, β3-субъединица); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD300e (CMRF-35L1); CD302 (DCL1); CD305 (LAIR1); CD312 (EMR2); CD315 (CD9P1); CD317 (BST2); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw328 (сиглек-7); CDw329 (сиглек-9); CD68 (gp 110, макросиалин); и/или рецептор маннозы; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

В вариантах осуществления нацеливающие фрагменты для известных мишеней на дендритных клетках ("ДК") содержат любой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессируется и/или представлен на ДК (т.е. маркер ДК). Иллюстративные маркеры ДК включают, но не ограничиваются, CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD1e (R2); CD11b (αМ-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (αX-интегрин, p150, 95, AXb2); CDw117 (лактозилцерамид, LacCer); CD19 (B4); CD33 (gp67); CD 35 (CR1, рецептор C3b/C4b); CD 36 (GpIIb, GPIV, PASIV); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD49d (VLA-4α, α4-интегрин); CD49e (VLA-5α, α5-интегрин); CD58 (LFA-3); CD64 (FcγRI); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (экто-5'нуклеотидаза); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD83 (HB15); CD85a (ILT5, LIR3, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD88 (C5aB); CD97 (BL-KDD/F12); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD116 (GM-CSFRα); CD120a (TMFRI, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD123 (IL-3Rα); CD139; CD148 (HPTP-η, DEP-1); CD150 (SLAM, IPO-3); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CD157 (Mo5, BST-1); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (сиалоадгезин, сиглек-1); CD170 (сиглек-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1α, MyD-1); CD172b (SIRPβ); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD193 (CCR3); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (ws CDw197)); CDw197 (CCR7, EB11, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CD206 (MMR); CD207 (лангерин); CD208 (DC-LAMP); CD209 (DCSIGN); CDw218a (IL18Rα); CDw218b (IL18Rβ); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD230 (прионный белок (PrP)); CD252 (OX40L, суперсемейство TNF (лиганд), член 4); CD258 (LIGHT, суперсемейство TNF (лиганд), член 14); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD271 (NGFR, p75, суперсемейство TNFR, член 16); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1, PDL1); CD275 (B7H2, ICOSL); CD276 (B7H3); CD277 (BT3.1, семейство B7: бутирофилин 3); CD283 (TLR3, TOLL-подобный рецептор 3); CD289 (TLR9, TOLL-подобный рецептор 9); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, β3-субъединица Na/K-АТФазы); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD301 (MGL1, CLECSF14); CD302 (DCL1); CD303 (BDCA2); CD304 (BDCA4); CD312 (EMR2); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD320 (8D6); и CD68 (gp110, макросиалин); MHC II класса; BDCA-1; сиглек-H; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

В вариантах осуществления нацеливание может быть выполнено с помощью любого нацеливающего фрагмента, который специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессируется и/или представлен на В-клетках (т.е. маркер В-клеток). Иллюстративные маркеры В-клеток включают, но не ограничиваются, CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD2 (рецептор Е-роетки, T11, LFA-2); CD5 (T1, Trp67, Leu-1, Ly-1); CD6 (T12); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1α, αL-цепь интегрина); CD11b (αМ-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (αX-интегрин, P150, 95, AXb2); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин β2, β-субъединица CD11a, b, c); CD19 (B4); CD20 (B1, Bp35); CD21 (CR2, EBV-R, C3dR); CD22 (BL-CAM, Lyb8, сиглек-2); CD23 (FcεRII, B6, BLAST-2, Leu-20); CD24 (BBA-1, HSA); CD25 (Тас-антиген, IL-2Rα, p55); CD26 (DPP IV эктоэнзим, ADA-связывающий белок); CD27 (T14, S152); CD29 (тромбоцитарный GPIIa, интегрин β-1, GP); CD31 (PECAM-1, эндокам); CD32 (FcγRII); CD35 (CR1, C3b/C4b рецп-

тор); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD44 (ECMРII, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейрофилин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49b (VLA-2 α , gp1a, α 2-интегрин); CD49c (VLA-3 α , α 3-интегрин); CD49d (VLA-4 α , α 4-интегрин); CD50 (ICAM-3); CD52 (CAMPATH-1, HES); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD60a (GD3); CD62L (L-селектин, LAM-1, LE-CAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (экзо-5'-нуклеотидаза); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиалозамаскированный лактозамин); CD75S (α 2, 6-сиализированный лактозамин); CD77 (Pk-антиген, BLA, CTH/Gb3); CD79a (Ig α , MB1); CD79b (Ig β , B29); CD80; CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD83 (HB15); CD84 (P75, GR6); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CDw92 (p70); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD100 (SEMA4D); CD102 (ICAM-2); CD108 (SEMA7A, антиген группы крови JMH); CDw119 (IFN γ R, IFN γ R α); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2R β); CD124 (IL-4R α); CD130 (gp130); CD132 (общая γ -цепь, IL-2R γ); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD150 (SLAM, IPO-3); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD171 (L1CMA, NILE); CD175s (сиалил-Tn (S-Tn)); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD185 (CXCR5); CD192 (CCR2); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (был CDw197)); CDw197 (CCR7, EB1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CDw218a (IL18R α); CDw218b (IL18R β); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD224 (GGT); CD225 (Leu13); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD229 (Ly9); CD230 (прионный белок (Prp)); CD232 (VESP-R); CD245 (p220/240); CD247 (зета-цепь CD3); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD267 (TACI, суперсемейство TNF-R, член 13B); CD268 (BAFFR, суперсемейство TNF-R, член 13C); CD269 (BCMA, суперсемейство TNF-R, член 16); CD275 (B7H2, ICOSL); CD277 (BT3.1.семейство B7: бутирофилин 3); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3 β 3-субъединица Na/K-АТФазы); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD305 (LAIR1); CD307 (IRTA2); CD315 (CD9P1); CD316 (EW12); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD321 (JAM1); CD322 (JAM3); CDw327 (сиглек-6, CD33L); CD68 (gp 100, макросиалин); CXCR5; VLA-4; MHC II класса; поверхностный IgM; поверхностный IgD; APRL и/или BAFF-R; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия. Примеры маркеров включают те, которые предусмотрены в других местах данного документа.

В некоторых вариантах осуществления нацеливание на В-клетки может быть выполнено с помощью любого нацеливающего фрагмента, который специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессируется и/или представлен на В-клетках при активации (т.е. маркер активированных В-клеток). Иллюстративные маркеры активированных В-клеток включают, но не ограничиваются, CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD15s (сиалил-Льюис X); CD15u (3'-сульфо-Льюис X); CD15su (6-сульфосиалил-Льюис X); CD30 (Ber-H2, Ki-1); CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD70 (Ki-24, CD27 лиганд); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD86 (B7-2/B70); CD97 (BLKDD/F12); CD125 (IL-5R α); CD126 (IL-6R α); CD138 (синдекан-1, гепаран-сульфат-протеогликан); CD152 (CTLA-4); CD252 (OX40L, суперсемейство TNF (лиганд), член 4); CD253 (TRAIL, суперсемейство TNF (лиганд), член 10); CD279 (PD1); CD289 (TLR9, TOLL-подобный рецептор 9); и CD312 (EMR2); где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия. Примеры маркеров включают те, которые предусмотрены в других местах данного документа.

"В-клеточный антиген" означает любой антиген, который встречается в природе или может быть сконструирован для того, чтобы узнаваться В-клеткой, и запускает (естественным образом или, будучи сконструированным, как известно в области техники) иммунный ответ у В-клетки (например, антиген, который специфически распознается В-клеточным рецептором на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся Т-клеточным антигеном, также является В-клеточным антигеном. В других вариантах осуществления Т-клеточный антиген также не является В-клеточным антигеном. В-клеточные антигены включают, но без ограничений, белки, пептиды, малые молекулы и углеводы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является небелковым антигеном (т.е. не является белковым или пептидным антигеном). В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является углеводом, связанным с инфекционным агентом. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является гликопротеином или гликопептидом, связанным с инфекционным агентом. Инфекционный агент может быть бактерией, вирусом, грибом, простейшим, паразитом или прионом. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является слабоиммуногенным антигеном. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является веществом, которым злоупотребляют, или его частью. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является вызывающим привыкание веществом или его частью. Вызывающие привыкание вещества включают, но без ограниче-

ний, никотин, наркотическое средство, средство от кашля, транквилизатор и седативное средство. В некоторых вариантах осуществления В-клеточным антигеном является токсин, например токсин из химического оружия или естественных источников, или загрязняющее вещество. В-клеточный антиген также может быть средством, вредным для окружающей среды. В других вариантах осуществления В-клеточный антиген является аллоантигеном, аллергеном, контактным сенсибилизирующим веществом, антигеном дегенеративного заболевания, гаптеном, антигеном инфекционного заболевания, раковым антигеном, антигеном атопического заболевания, вызывающим привыкание веществом, ксеноантигеном или ферментом нарушения обмена веществ или продуктом данного фермента.

"Биоразлагаемый полимер" означает полимер, который распадается с течением времени при введении в организм субъекта. Биоразлагаемый полимер включает, но без ограничений, сложные полиэфиры, поликарбонаты, поликетали или полиамиды. Такие полимеры могут включать поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер поли(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер простого полиэфира, например поли(этиленгликоля) и сложного полиэфира, поликарбоната или полиамида или другой биоразлагаемый полимер. В вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер поли(этиленгликоля) и поли(молочной кислоты), поли(гликолевой кислоты), блок-сополимера поли(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактона. В некоторых вариантах осуществления, однако, биоразлагаемый полимер не включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль), или состоит только из простого полиэфира. В целом, для применения в составе синтетического наноносителя биоразлагаемый полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C. Биоразлагаемый полимер в вариантах осуществления имеет средневесовой молекулярный вес в диапазоне от приблизительно 800 Да до приблизительно 10000 Да, что определяют с помощью гельпроникающей хроматографии. В варианте осуществления биоразлагаемый полимер не включает поликеталь или его элементарное звено.

"Связывают", или "связанный", или "связывает" (и подобное) означает присоединенный к полимеру или его элементарному звену или присоединенный к или содержащийся в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления ковалентное связывание опосредовано одним или более линкерами. В некоторых вариантах осуществления связывание является нековалентным. В некоторых вариантах осуществления нековалентное связывание опосредовано взаимодействиями зарядов, аффинными взаимодействиями, координационной связью металлов, физической адсорбцией, взаимодействиями типа хозяин-гость, гидрофобными взаимодействиями, взаимодействиями ТТ укладки, взаимодействиями водородных связей, взаимодействиями ван-дер-Ваальса, магнитными взаимодействиями, электростатическими взаимодействиями, диполь-дипольными взаимодействиями и/или их комбинациями. В вариантах осуществления связывание может появляться в контексте инкапсуляции в синтетические наноносители с использованием традиционных методик. Любое из вышеупомянутых связываний может быть организовано так, чтобы быть на поверхности или внутри синтетического наноносителя по данному изобретению.

"Лекарственная форма" означает приведенные в данном документе соединение, конъюгат, синтетический наноноситель или композицию в среде, транспортёре, носителе или устройстве, пригодном для ввода субъекту.

"Инкапсулировать" означает заключать в синтетическом наноносителе, предпочтительно полностью заключать в синтетическом наноносителе. Большая часть или все вещество, которое инкапсулируется, не подвергается воздействию локального окружения, внешнего по отношению к синтетическому наноносителю. Инкапсуляция отличается от абсорбции, которая размещает большую часть или все вещество на поверхности синтетического наноносителя и позволяет веществу подвергаться воздействию локального окружения, внешнего по отношению к синтетическому наноносителю. В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство или В-клеточный и/или Т-клеточный антиген инкапсулированы в синтетическом наноносителе.

"Иммуномодулирующее средство" означает средство, которое модулирует иммунный ответ. "Модулировать", как используется в данном документе, относится к индуцированию, усилению, стимуляции или направлению иммунного ответа. Подобные средства включают иммуностимулирующие средства, которые стимулируют (или поддерживают) иммунный ответ на антиген, но не являются антигеном или производным антигена. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство находится на поверхности синтетического наноносителя и/или заключено в синтетический наноноситель. В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем через полимер или его элементарное звено из приведенных соединений или конъюгатов.

В некоторых вариантах осуществления все иммуномодулирующие средства синтетического наноносителя идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит ряд различных типов иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит множество отдельных иммуномодулирующих средств, все из которых идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит строго один тип иммуномодулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит строго два различных типа иммуномодулирующих средств. В некото-

рых вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит больше чем два различных типа иммуномодулирующих средств.

"Максимальный размер синтетического наноносителя" означает самый большой размер наноносителя, измеренный вдоль любой оси синтетического наноносителя. "Минимальный размер синтетического наноносителя" означает самый маленький размер синтетического наноносителя, измеренный вдоль любой оси синтетического наноносителя. Например, для сфероида синтетического наноносителя максимальный и минимальный размеры синтетического наноносителя были бы, по существу, идентичными и являлись бы величиной его диаметра. Подобным образом, для кубического синтетического наноносителя минимальный размер синтетического наноносителя был бы наименьшим из его высоты, ширины или длины, а максимальный размер синтетического наноносителя был бы наибольшим из его высоты, ширины или длины. В варианте осуществления минимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, основываясь на общем количестве синтетических наноносителей в образце, составляет больше 100 нм. В варианте осуществления максимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, основываясь на общем количестве синтетических наноносителей в образце, равен или меньше 5 мкм. Предпочтительно минимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, основываясь на общем количестве синтетических наноносителей в образце, равен или больше 110 нм, более предпочтительно равен или больше 120 нм, более предпочтительно равен или больше 130 нм и все же более предпочтительно равен или больше 150 нм. Предпочтительно максимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, основываясь на общем количестве синтетических наноносителей в образце, равен или меньше 3 мкм, более предпочтительно равен или меньше 2 мкм, более предпочтительно равен или меньше 1 мкм, более предпочтительно равен или меньше 800 нм, более предпочтительно равен или меньше 600 нм и все же более предпочтительно равен или меньше 500 нм. В предпочтительных вариантах осуществления максимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, основываясь на общем количестве синтетических наноносителей в образце, равен или больше 100 нм, более предпочтительно равен или больше 120 нм, более предпочтительно равен или больше 130 нм, более предпочтительно равен или больше 140 нм и более предпочтительно также равен или больше 150 нм. Измерение размера синтетического наноносителя проводится суспендированием синтетического наноносителя в жидкой (обычно водной) среде с применением динамического светорассеяния (например, используя прибор Brookhaven ZetaPALS).

"Фармацевтически приемлемый эксципиент" означает фармакологически неактивное вещество, добавляемое к соединению, конъюгату, синтетическому наноносителю или композиции по данному изобретению для дополнительного облегчения их введения. Примеры, без ограничения, фармацевтически приемлемых наполнителей включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные разбавители, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

"Скорость высвобождения" означает скорость, с которой захваченное иммуномодулирующее средство выходит из композиции, например наноносителя, в окружающую среду в тесте высвобождения *in vitro*. Сначала получают синтетический наноноситель для тестирования высвобождения посредством размещения в соответствующей среде высвобождения *in vitro*. Это обычно осуществляется посредством замены буфера после центрифугирования с осаждением синтетического наноносителя и ресуспендирования синтетических наноносителей в мягких условиях. Данный анализ начинают путем размещения образца при 37°C в соответствующем приборе с контролируемой температурой. В различные моменты времени забирают образец.

Синтетические наноносители отделяют от среды для высвобождения путем центрифугирования с осаждением синтетических наноносителей. Среда высвобождения анализируют на предмет иммуномодулирующего средства, которое диспергировалось из синтетических наноносителей. Иммуномодулирующее средство измеряют с помощью ВЭЖХ для определения содержания и качества иммуномодулирующего средства. Осадок, содержащий остаток удерживаемого иммуномодулирующего средства, растворяют в растворителях или гидролизуют основанием с освобождением удерживаемого иммуномодулирующего средства из синтетических наноносителей. Остаток, содержащий иммуномодулирующее средство, также затем измеряют с помощью ВЭЖХ для определения содержания и качества иммуномодулирующего средства, которое не высвободилось на данный момент времени.

Равновесие масс ограничивается иммуномодулирующим средством, которое было высвобождено в среду высвобождения, и тем, что остается в синтетических наноносителях. Данные представлены в виде высвобожденной фракции или чистого высвобожденного веса, представленного как микрограммы, высвобожденные за период времени.

"Субъект" означает животное, включая млекопитающих, таких как человек и приматы; птиц; и

животных домашнего хозяйства или фермы, таких как кошки, собаки, овцы, козы, крупный рогатый скот, лошади и свиньи; лабораторных животных, таких как мыши, крысы и морские свинки, рыбы и тому подобное.

"Синтетический(е) наноноситель(и)" означает дискретный объект, который не встречается в природе, и который обладает по меньшей мере одним размером, который меньше или равен 5 мкм. Наночастицы альбумина специально включены в качестве синтетических наноносителей.

Синтетические наноносители включают приведенные в данном документе соединения и композиции и, таким образом, могут быть полимерными наночастицами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут содержать одну или несколько полимерных матриц. Синтетические наноносители, однако, могут также включать прочие наноматериалы и могут быть, например, липидно-полимерными наночастицами. В некоторых вариантах осуществления полимерная матрица может быть окружена покрывающим слоем (например, липосома, липидный монослой, мицелла и т.д.). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель не является мицеллой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать ядро, содержащее полимерную матрицу, окруженную липидным слоем (например, липидным бислоем, липидным монослоем и т.д.). В некоторых вариантах осуществления различные элементы синтетических наноносителей могут быть связаны с полимерной матрицей.

Синтетические наноносители могут содержать один или более липидов. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липосому. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липидный бислой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липидный монослой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать мицеллу. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать неполимерное ядро (например, металлическую частицу, квантовую точку, керамическую частицу, костную частицу, вирусную частицу, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и т.д.), окруженное липидным слоем (например, липидным бислоем, липидным монослоем и т.д.).

Синтетические наноносители могут включать наночастицы на основе липидов, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболлы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка (такие как наночастицы альбумина). Синтетические наноносители могут быть рядом различных форм, включая, но не ограничиваясь, сферической, кубической, пирамидальной, вытянутой, цилиндрической, тороидальной и тому подобное. Синтетические наноносители согласно данному изобретению содержат одну или более поверхностей. Примеры синтетических наноносителей, которые могут быть адаптированы для использования в практическом применении данного изобретения, содержат: (1) биоразлагаемые наночастицы, раскрытые в патенте США 5543158, Gref et al., (2) полимерные наночастицы из опубликованной заявки на патент США 2006/0002852, Saltzman et al., (3) сконструированные литографическим способом наночастицы из опубликованной заявки на патент США 2009/0028910, DeSimone et al., (4) раскрытие WO 2009/051837, von Andrian et al., или (5) наночастицы, раскрытые в опубликованной заявке на патент США 2008/0145441, Penades et al.

Синтетические наноносители согласно данному изобретению, которые имеют минимальный размер, равный или меньше приблизительно 100 нм, предпочтительно равный или меньше 100 нм, не содержат поверхности с гидроксильными группами, которые активируют комплемент или, альтернативно, содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, не являющихся гидроксильными группами, которые активируют комплемент. В предпочтительном варианте осуществления синтетические наноносители согласно данному изобретению, имеющие минимальный размер, равный или меньше приблизительно 100 нм, предпочтительно равный или меньше 100 нм, не содержат поверхность, которая существенно активирует комплемент или, альтернативно, содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, которые существенно не активируют комплемент. В более предпочтительном варианте осуществления синтетические наноносители согласно данному изобретению, имеющие минимальный размер, равный или меньше приблизительно 100 нм, предпочтительно равный или меньше 100 нм, не содержат поверхность, которая активирует комплемент или, альтернативно, содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, которые не активируют комплемент. В вариантах осуществления синтетические наноносители могут иметь соотношение сторон более 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или более 1:10.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются сферами или сфероидными. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители плоские или пластинчатые. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители кубы или кубические. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители овалы или эллипсы. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители цилиндры, конусы или пирамиды.

Часто желательно применение популяции синтетических наноносителей, которая является относительно равномерной с точки зрения размера, формы и/или композиции так, чтобы каждый синтетический наноноситель имел сходные свойства. Например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по

меньшей мере 95% синтетических наноносителей может иметь минимальный размер или максимальный размер, который попадает в пределы 5, 10 или 20% от среднего диаметра или среднего размера. В некоторых вариантах осуществления популяция синтетических наноносителей может быть гетерогенной по отношению к размеру, форме и/или композиции.

Синтетические наноносители могут быть сплошными или полыми и могут содержать один или несколько слоев. В некоторых вариантах осуществления каждый слой имеет уникальную композицию и уникальные свойства по отношению к другому слою(ям). Чтобы дать лишь один пример, синтетические наноносители могут иметь структуру ядро/оболочка, в которой ядро является одним слоем (например, полимерное ядро) и оболочка является вторым слоем (например, липидный бислой или монослой). Синтетические наноносители могут содержать несколько разных слоев.

"Его элементарное звено" относится к мономерному элементарному звену полимера, при этом полимер, в целом, составлен из ряда связанных мономеров.

"Вакцина" означает композицию вещества, которая усиливает иммунный ответ на конкретный патоген или заболевание. Вакцина обычно содержит факторы, которые стимулируют иммунную систему субъекта для узнавания специфического антигена как чужого и его устранения из организма субъекта. Вакцина также создает иммунологическую "память", поэтому антиген будет быстро узнаваться, и на него будет быстро дан ответ, если человек подвергнется вторичному заражению. Вакцины могут быть профилактическими (например, для предупреждения будущей инфекции каким-либо патогеном) или терапевтическими (например, вакцина против опухолеспецифического антигена для лечения рака). Вакцины по данному изобретению могут включать одно или несколько из приведенных в данном документе соединений, конъюгатов, синтетических наноносителей или композиций.

Способы создания соединений, конъюгатов или синтетических наноносителей по данному изобретению.

Иммуномодулирующее средство и полимеры или их элементарное звенья связаны ковалентно посредством амидной или сложноэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления эти конъюгаты образуют часть синтетического наноносителя. В целом, полимер, такой как полилактид (PLA) или сополимер полилактида и гликолида (PLGA), может соединяться с иммуностимулирующим средством, таким как резиквимод (также известный как R848), несколькими способами. Способы связывания приведены ниже и в примерах.

Следующие способы или любой этап из приведенных способов приводятся в качестве примеров и могут быть осуществлены при любых подходящих условиях. В некоторых случаях реакцию или любой этап приведенных способов можно осуществить в присутствии растворителя или смеси растворителей. Неограничивающие примеры растворителей, которые могут быть пригодны для применения в данном изобретении, включают, но без ограничений, р-крезол, толуол, ксилол, мезителен, диэтиловый эфир, гликоль, петролейный эфир, гексан, циклогексан, пентан, дихлорметан (или метиленхлорид), хлороформ, диоксан, тетрагидрофуран (THF), диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), этилацетат (EtOAc), триэтиламин, ацетонитрил, метил-трет-бутиловый эфир (MTBE), N-метилпирридон (NMP), диметилацетамид (DMAC), изопропанол (IPA), их смеси или подобное. В некоторых случаях растворитель выбран из группы, состоящей из этилацетата, метиленхлорида, THF, DMF, NMP, DMAC, DMSO и толуола или их смесей.

Реакция или любой этап из приведенных способов могут быть осуществлены при любой подходящей температуре. В некоторых случаях реакция или любой этап из приведенных способов осуществляют при приблизительно комнатной температуре (например, приблизительно 25°C, приблизительно 20°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C и подобное). В некоторых случаях, однако, реакцию или любой этап из приведенных способов можно осуществить при температуре ниже или выше комнатной температуры, например при приблизительно -20°C, при приблизительно -10°C, при приблизительно 0°C, при приблизительно 10°C, при приблизительно 30°C, приблизительно 40°C, приблизительно 50°C, приблизительно 60°C, приблизительно 70°C, приблизительно 80°C, приблизительно 90°C, приблизительно 100°C, приблизительно 120°C, приблизительно 140°C, приблизительно 150°C или выше. В конкретных вариантах осуществления реакцию или любой этап из приведенных способов проводят при температуре от 0 до 120°C. В некоторых вариантах осуществления реакцию или любой этап из приведенных способов можно осуществить при более чем одной температуре (например, реагенты, добавляемые при первой температуре, и реакционную смесь, перемешиваемую при второй, где переход от первой температуры ко второй температуре может быть постепенным или быстрым).

Реакции или любому этапу из приведенных способов можно позволить проходить в течение любого подходящего периода времени. В некоторых случаях реакции или любому этапу из приведенных способов позволяют проходить в течение приблизительно 10 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 40 мин, приблизительно 50 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 2 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 4 суток или дольше. В некоторых случаях аликвоты реакционной смеси можно собрать и проанализировать в промежуточное время для определения хода реакции или любого этапа из приведенных способов. В некоторых вариантах осуществления

реакцию или любой этап из приведенных способов можно осуществить в инертной атмосфере в безводных условиях (например, в атмосфере азота или аргона, безводных растворителей и т.д.).

Продукты реакции и/или промежуточные продукты можно выделить (например, посредством дистилляции, колоночной хроматографии, экстракции, осаждения и т.д.) и/или проанализировать (например, газожидкостной хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией, ядерной магнитно-резонансной спектроскопией и т.д.) с использованием общеизвестных методик. В некоторых случаях конъюгат или синтетический наноноситель, который включает конъюгированные, можно проанализировать для определения загрузки иммуномодулирующего средства, например, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

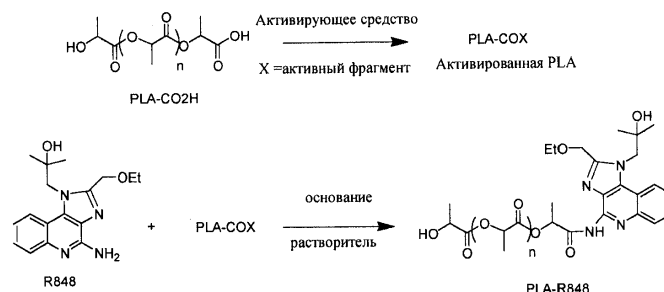
Полимеры могут иметь любой подходящий молекулярный вес. Например, полимеры могут иметь низкий или высокий молекулярный вес. Неограничивающие значения молекулярного веса включают 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 Да. Молекулярный вес полимера можно определить с помощью гелепроникающей хроматографии.

Ниже в качестве примера приведены реакции соединения, которые не подразумеваются как ограничивающие.

Способ 1.

Полимер (например, PLA, PLGA) или его элементарное звено по меньшей мере с одной кислотной концевой группой превращают в реакционноспособное ацилирующее средство, такое как ацилгалогенид, ацилимидазол, активный сложный эфир и т.д., с помощью активирующего реагента, обычно применяемого при синтезе амидов.

В этом двухэтапном способе получаемый в результате активированный полимер или его элементарное звено (например, PLA, PLGA) выделяют и затем вводят в реакцию с иммуномодулирующим средством (например, R848) в присутствии основания с получением требуемого конъюгата (например, PLA-R848), например, как показано на следующей схеме:

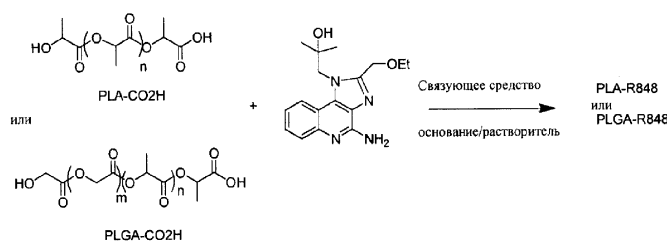


Активирующие реагенты, которые можно применять для превращения полимеров или их элементарных звеньев, таких как PLA или PLGA, в активированную ацилированную форму, включают, но без ограничений, циануровый фторид, N,N-тетраметилфторформамидингексафторфосфат (TFFH); ацилимидазолы, такие как карбонилдиимидазол (CDI), N,N'-карбонилбис(3-метилимидазол)трифлат (CBMIT); и активные сложные эфиры, такие как N-гидроксилсукцинимид (NHS или HOSu), в присутствии карбодиимида, такого как N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC), N-этил-N'-(3-(диметиламино)пропил)карбодиимидгидрохлорид (EDC) или N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC); N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC); пентафторфенол в присутствии DCC, или EDC, или DIC; пентафторфенилтрифторацетат.

Активированный полимер или его элементарное звено можно выделить (например, посредством осаждения, экстракции и т.д.), и/или хранить в подходящих условиях (например, при низкой температуре в атмосфере аргона) после активации, или можно сразу использовать. Активированный полимер или его элементарное звено можно ввести в реакцию с иммуностимулирующим средством при любых подходящих условиях. В некоторых случаях реакцию осуществляют в присутствии основания и/или катализатора. Неограничивающие примеры оснований/катализаторов включают диизопропилэтиламин (DIPEA) и 4-диметиламинопиридин (DMAP).

Способ 2.

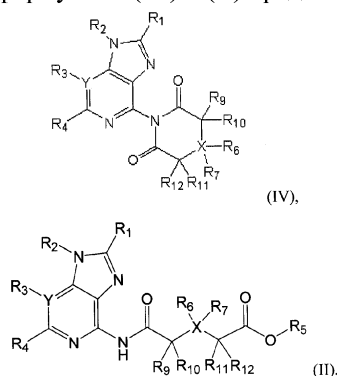
Полимер или его элементарное звено (например, PLA, PLGA, имеющие любой пригодный молекулярный вес) с кислотной концевой группой вступают в реакцию с иммуномодулирующим средством (например, R848) в присутствии активирующего или связывающего реагента, который превращает полимер или его элементарное звено (например, PLA, PLGA) с реакционноспособным ацилирующим средством *in situ*, с получением требуемого конъюгата (например, PLA-R848, PLGA-R848).



Связующие вещества или активаторы включают, но без ограничений, активаторы, используемые в присутствии карбодиимида, такого как EDC, или DCC, или DIC, такого как 1-гидроксибензотриазол (HOBt), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt), 3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксо-1,2,3-бензотриазин (HODhbt), N-гидроксисукцинимид (NHS или HOSu), пентафторфенол (PFP); активаторы без карбодиимида; соли фосфония, такие как O-бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), O-бензотриазол-1-илокситрис(пирролидин)фосфония гексафторфосфат (PyBOP), 7-азабензотриазол-1-илокситрис(пирролидин)фосфония гексафторфосфат (PyAOP); соли урания, такие как O-бензотриазол-1-илокситрис-1,1,3, 3-тетраметилурония тетрафторборат (TBTU) и гексафторфосфат (HBTU), O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HATU), O-(1,2-дигидро-2-оксо-1-пиридил)-1,1,3,3-тетраметил-урония тетрафторборат (TPTU); галогенурониевые и галогенфосфониевые соли, такие как бис-(тетраметилен)фторформамидиниевый гексафтофосфат (BTFFH), бромтрис-(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BrOP), бромтрипирролидинфосфония гексафторфосфат (PyBrOP) и хлортрипирролидинфосфония гексафторфосфат (PyClOP); производные бензотриазина, такие как O-(3,4-дигидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат (TDBTU) и 3-(диэтилоксифосфорилокси)-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-он (DEPBT). Неограничивающие примеры подходящих растворителей включают DMF, DCM, толуол, этилацетат и т.д., которые описаны в данном документе.

Способ 3.

Иммуномодулирующие средства, такие как R848, также можно связывать с полимерами или их элементарными звеньями, которые заканчиваются гидроксильной группой. Такие полимеры или их элементарные звенья включают полиэтиленгликоль, полилактид, сополимер полилактида и гликолида, поликапролактон и другие подобные сложные полиэфиры или их элементарные звенья. В целом, реакция протекает следующим образом, где имид с общей структурой (IV) будет вступать в реакцию с концевым гидроксидом вышеупомянутых полимеров или их элементарных звеньев при помощи катализатора, используемого в реакциях полимеризации с раскрытием лактонового кольца. Получаемый в результате продукт реакции (II) связывает амид средства с полимером или его элементарным звеном посредством сложноэфирной связи. Соединения с формулами (IV) и (II) представляют собой следующее:

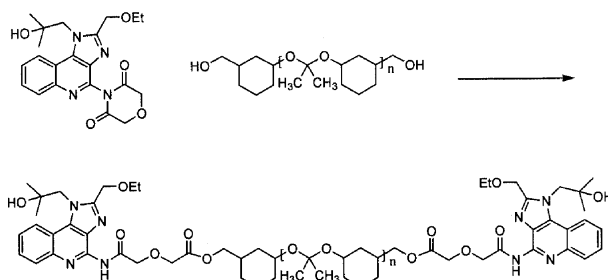


где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино; R₂ - H, алкил или замещенный алкил; Y - N или C; R₃ отсутствует, если Y - N; или представляет собой H, алкил, замещенный алкил, или объединен с R₄ с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены, если Y - C; R₄ представляет собой H, или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино, если не объединен с R₃ с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами пиридинового кольца, к которому они присоединены; или объединен с R₃ с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены; R₅ представляет собой полимер или его элементарное звено; X представляет собой C, N, O или S; каждый из R₆ и R₇ независимо представляет собой H или замещен; и каждый из R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ независимо представляет собой H, галоген, OH, тио, NH₂ или замещенный или незамещенный алкил, арил, гетероцикл, алкокси, арилокси, алкилтио, арилтио, алкиламино или ариламино.

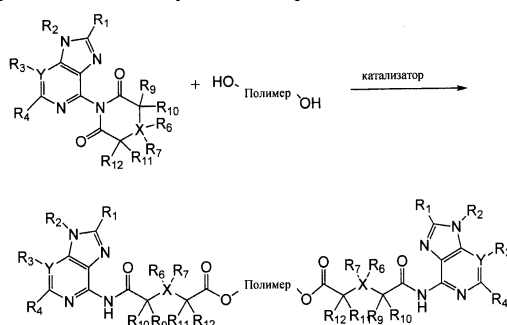
Катализаторы включают, но без ограничений, фосфазинные основания, 1,8-диазациклоундец-7-ен (DBU), 1,4,7-триазабициклодецен (TBD) и N-метил-1,4,7-триазабициклодецен (MTDB). В данной об-

ласти техники известны и приводятся другие катализаторы, например у Kamber et al., Organocatalytic Ring-Opening Polymerization, Chem. Rev. 2007, 107, 58-13-5840. Неограничивающие примеры подходящих растворителей включают метилхлорид, хлороформ и THF.

Конкретный пример реакции, осуществляемой по такому способу, показан ниже



где R5-OH содержит две гидроксильных группы (например, диол, HO-R5-OH), каждая из которых функционализована при помощи реакции с имидом, связанным с R848. В некоторых случаях HO-R5-OH представляет собой полидиол, такой как поли(гексаметилкарбонат)диол или поликапролактондиол. Например, реакцию можно осуществить следующим образом:

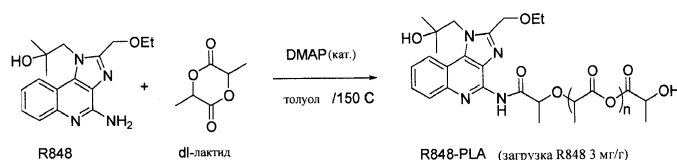


где R-группы являются такими, как описано в данном документе. Неограничивающие примеры подходящих полимеров включают поликетальдиолы, поли(этилен)гликоль, поликапролактондиол, диблок-сополимер полилактида и поли(этилен)гликоля, диблок-сополимер полилактида/полигликолида и поли(этилен)гликоля, диблок-сополимер полигликолида и поли(этилен)гликоля, поли(пропилен)гликоля, поли(гексаметилкарбонат)диол и поли(тетрагидрофуран).

В вариантах осуществления, в которых задействован полидиол, одну из групп диола можно защитить защитной группой (например, t-бутилоксикарбонил), таким образом, полидиолом может быть соединение с формулой HO-R5-OP, в которой P является защитной группой. После реакции с иммуномодулирующим средством с образованием конъюгата иммуномодулирующее средство-R5-OP, причем защитную группу можно удалить, и можно ввести в реакцию вторую группу диола с любым подходящим реагентом (например, PLGA, PLA).

Способ 4.

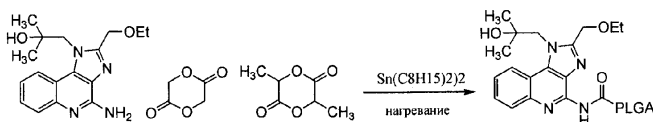
Конъюгат (например, R848-PLA) можно образовать посредством проводимой в одном сосуде полимеризации с раскрытием кольца иммуномодулирующего средства (например, R848) с полимером или его элементарным звеном (например, D/L-лактид) в присутствии катализатора, например, как показано в следующей схеме:



При одностадийной процедуре иммуномодулирующее средство и полимер или его элементарное звено можно объединить в единую реакционную смесь, содержащую катализатор. Реакция может проходить при подходящей температуре (например, при приблизительно 150°C), а полученный в результате конъюгат можно выделить с помощью общеизвестных методик. Неограничивающие примеры подходящих катализаторов включают DMAP и этилгексаноат олова.

Способ 5.

Конъюгат можно образовать посредством двухстадийной полимеризации с раскрытием кольца иммуномодулирующего средства (например, R848) с одним или несколькими полимерами или их элементарными звеньями (например, D/L-лактид или гликолид) в присутствии катализатора, например, как показано в следующей схеме:



Полимеры или их элементарные звенья можно сначала объединить и в некоторых случаях нагреть (например, до 135°C) с образованием раствора. В раствор, содержащий полимеры или их элементарные звенья, можно добавить иммуномодулирующее средство с последующим добавлением катализатора (например, этилгексаноат олова). Полученный в результате конъюгат можно выделить с помощью общеизвестных методик. Неограничивающие примеры подходящих катализаторов включают DMAP и этилгексаноат олова.

В некоторых вариантах осуществления приведенные в данном документе соединения или конъюгаты, другое иммуномодулирующее средство, антиген и/или фрагмент нацеливания можно ковалентно связать с полимерной матрицей. В некоторых вариантах осуществления ковалентное соединение опосредовано линкером. В некоторых вариантах осуществления приведенные в данном документе соединения или конъюгаты, другое иммуномодулирующее средство, антиген и/или фрагмент нацеливания можно нековалентно связать с полимерной матрицей. Например, в некоторых вариантах осуществления приведенные в данном документе соединения или конъюгаты, другое иммуномодулирующее средство, антиген и/или фрагмент нацеливания можно инкапсулировать внутри, окружить и/или диспергировать по полимерной матрице. Альтернативно или дополнительно, приведенные в данном документе соединения или конъюгаты, другое иммуномодулирующее средство, антиген и/или фрагмент нацеливания можно связать с полимерной матрицей гидрофобными взаимодействиями, взаимодействиями зарядов, силами Ван-дер-Ваальса и т.д.

Широкое разнообразие полимеров и способов формирования полимерных матриц посредством этого общеизвестны. В основном полимерная матрица содержит один или более полимеров. Полимеры могут быть природными или неприродными (синтетическими) полимерами. Полимеры могут быть гомополимерами или сополимерами, содержащими два или более мономеров. С точки зрения последовательности сополимеры могут быть статистическими, блок-сополимерами или состоять из комбинации статистических и блоковых последовательностей. Как правило, полимеры в соответствии с настоящим изобретением являются органическими полимерами.

Примеры полимеров, подходящих для применения в данном изобретении, включают, но не ограничиваясь, полиэтилены, поликарбонаты (например, поли(1,3-диоксан-2-он)), полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)), полигидроксикислоты (например, поли(β-гидроксиалканоксид)), полипропилфумераты, поликапролактоны, полиамиды (например, поликапролактам), полиацетали, простые полиэфиры, сложные полиэфиры (например, полилактид, полигликолид), поли(сложные эфиры ортокислот), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины и полисахариды (например, хитозан).

В некоторых вариантах осуществления полимеры в соответствии с данным изобретением включают полимеры, которые были одобрены к применению для людей Управлением по делам пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), 21 C.F.R. § 177.2600, включая, но не ограничиваясь, сложные полиэфиры (например, полимолочной кислоты, сополимер полимолочной и полигликолевой кислот), поликапролактон, поливалеролактон, поли(1,3-диоксан-2-он); полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)); простые полиэфиры (например, полиэтиленгликоль); полиуретаны; полиметакрилаты; полиакрилаты и полицианоакрилаты.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть гидрофильными. Например, полимеры могут содержать анионные группы (например, фосфатную группу, сульфатную группу, карбоксилатную группу); катионные группы (например, четвертичную аминогруппу); или полярные группы (например, гидроксильную группу, тиольную группу, аминогруппу). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофильную полимерную матрицу, образует гидрофильное окружение внутри синтетического наноносителя. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть гидрофобными. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофобную полимерную матрицу, образует гидрофобное окружение внутри синтетического наноносителя. Выбор гидрофильности или гидрофобности полимера может оказать влияние на характер материалов, которые заключены (например, связаны) в синтетическом наноносителе.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью одного или нескольких фрагментов и/или функциональных групп. Различные фрагменты или функциональные группы могут быть использованы в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью PEG, углеводов и/или ациклических полиацеталей, производных полисахаридов (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301).

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью липидных или жирно-кислотных групп. В некоторых вариантах осуществления жирно-кислотная группа может быть одной или более масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой,

пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой, бегеновой или лигноцериновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления жирно-кислотная группа может состоять из одной или более пальмитолеиновой, олеиновой, вакценовой, линолевой, альфа-линоленовой, гамма-линоленовой, арахидоновой, гадолеиновой, арахидоновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой или эруковой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть сложными полиэфирами, в том числе включающими сополимеры, содержащие элементарные звенья гликолевой кислоты и молочной кислоты, такие как сополимер полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и сополимер полилактида и полигликолида, совместно именуемые здесь "PLGA"; и гомополимерами, включающими элементарные звенья гликолевой кислоты, упомянутые в настоящем документе как "PGA", и элементарные звенья молочной кислоты, такие как поли-L-молочная кислота, поли-D-молочная кислота, поли-D,L-молочная кислота, поли-L-лактид, поли-D-лактид и поли-D,L-лактид, совместно именуемые здесь "PLA". В некоторых вариантах осуществления образцы сложных полиэфиров включают, например, полигидроксикислоты; PEG-сополимеры и сополимеры лактида и гликолида (например, сополимеры PLA-PEG, сополимеры PGA-PEG, сополимеры PLGA-PEG и их производные). В некоторых вариантах осуществления сложные полиэфиры включают, например, полиангидриды, поли(сложный эфир ортокислоты), сополимеры поли(сложный эфир ортокислоты)-PEG, поли(капролактон), сополимеры поли(капролактон)-PEG, полилизин, сополимеры полилизин-PEG, поли(этиленимин), сополимеры поли(этиленимин)-PEG, сополимер поли(L-лактида и L-лизина), поли(сложный эфир серина), поли(сложный эфир 4-гидрокси-L-пролина), поли[α -(4-аминобутил)-L-гликолевая кислота] и их производные.

В некоторых вариантах осуществления полимер может быть PLGA. PLGA является биосовместимым и биоразлагаемым сополимером молочной кислоты и гликолевой кислоты, и различные формы PLGA характеризуются соотношением молочная кислота:гликолевая кислота. Молочная кислота может быть L-молочной кислотой, D-молочной кислотой или D,L-молочной кислотой. Скорость разложения PLGA можно регулировать путем изменения соотношения молочная кислота:гликолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления PLGA, которая будет использоваться в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется соотношением молочная кислота:гликолевая кислота приблизительно 85:15, приблизительно 75:25, приблизительно 60:40, приблизительно 50:50, приблизительно 40:60, приблизительно 25:75 или приблизительно 15:85.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть одним или более акриловыми полимерами. В определенных вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, сополимер аминокислотметакрилата, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), сополимер алкиламида метакриловой кислоты, поли(метил метакрилат), поли(метакриловой кислоты ангидрид), метил метакрилат, полиметакрилат, сополимер поли(метилметакрилата), полиакриламид, сополимер аминокислот метакрилата, сополимеры глицидилметакрилата, полицианакирилаты и комбинации, содержащие один или более из вышеприведенных полимеров. Акриловый полимер может содержать полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислоты с низким содержанием групп четвертичного аммония.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть катионными полимерами. В целом, катионные полимеры могут конденсировать и/или защищать отрицательно заряженные нити нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК или их производных). Аминосодержащие полимеры, такие как поли(лизин) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97 и Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), поли(этиленимин) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297) и поли(амидоамин) дендримеры (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703 и Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) являются положительно заряженными при физиологических значениях pH, образуют ионные пары с нуклеиновыми кислотами и опосредуют трансфекцию в различных клеточных линиях.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть разлагаемыми полиэфирами, несущими катионные боковые цепи (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633 и Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399).

Примеры таких сложных полиэфиров включают сополимер поли-L-лактида и полилизина (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), поли(сложный эфир серина) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), поли(сложный эфир 4-гидрокси-L-пролина) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658 и Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633), и поли(сложный эфир 4-гидрокси-L-пролина) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658 и Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633).

Свойства этих и других полимеров и способы их получения хорошо известны в данном уровне техники (см., например, патенты США №№ 6123727, 5804178, 5770417, 5736372, 5716404, 6095148, 5837752, 5902599, 5696175, 5514378, 5512600, 5399665, 5019379, 5010167, 4806621, 4638045 и 4946929; Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Ace Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7 и Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181). В целом, различные методы синтеза определенных подходящих полимеров описаны в Concise Encyclopedia

of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386 и в патентах США №№ 6506577, 6632922, 6686446 и 6818732.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть линейными или разветвленными полимерами. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть дендримерами. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть в основном сшиты друг с другом. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть в основном свободны от сшивок. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, не подвергаясь этапу сшивания. Далее следует понимать, что соединения по данному изобретению и синтетические наночастицы могут включать в себя блок-сополимеры, привитые-сополимеры, сочетания, смеси и/или аддукты любого из вышеуказанных и других полимеров. Специалистам в данной области техники будет понятно, что полимеры, перечисленные в данном документе, представляют собой примерный не являющийся исчерпывающим список полимеров, которые могут быть применены в соответствии с данным изобретением.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут включать металлические частицы, квантовые точки, керамические частицы и т.д.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут факультативно содержать один или более амфифильных объектов. В некоторых вариантах осуществления амфифильный объект может способствовать получению синтетических наночастиц с повышенной стабильностью, улучшенной однородностью или повышенной вязкостью. В некоторых вариантах осуществления амфифильные объекты могут быть присоединены к внутренней поверхности липидной мембраны (например, липидного бислоя, липидного монослоя и т.д.). Многие амфифильные объекты, известные в данном уровне техники, подходят для применения в создании синтетических наночастиц в соответствии с данным изобретением. Такие амфифильные объекты включают, но не ограничиваясь, фосфоглицериды; фосфатидилхолины; дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC); диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE); диолеилоксипропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеилфосфатидилхолин, холестерин, сложные эфиры холестерина; диацилглицерол; диацилглицеролсукцинат; дифосфатидилглицерин (DPPG); гексанодеканол, жирные спирты, такие как полиэтиленгликоль (PEG); полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир, поверхностно-активные жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота или олеиновая кислота, жирные кислоты, моноглицериды жирных кислот, диглицериды жирных кислот, амиды жирных кислот; сорбитантриолеат (Span®85) гликохолат; сорбитанмонолаурат (Span®20); полисорбат 20 (Tween®20); полисорбат 60 (Tween®60); полисорбат 65 (Tween®65); полисорбат 80 (Tween®80); полисорбат 85 (Tween®85); полиоксиэтилена моностеарат; суфрактин; полуксомер; сорбитановый сложный эфир жирной кислоты, такой как сорбитантриолеат, лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинозитол; сфингомиелин; фосфатидилэтаноламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидная кислота; цереброзиды; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерол; стеариламин; додециламин; гексадециламин; ацетилпальмитат; глицеринрицинолеат; гексадецилстеарат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль)5000-фосфатидилэтаноламин; поли(этиленгликоль)400-моностеарат; фосфолипиды, синтетические и/или природные моющие средства, имеющие высокие поверхностно-активные свойства; деоксихолаты; циклодекстрины; хаотропные соли; средства ионного спаривания, а также их комбинации. Компонент амфифильного объекта может быть смесью различных амфифильных объектов. Специалистам в данном уровне техники будет понятно, что это примерный не являющийся исчерпывающим перечень веществ с поверхностно-активным действием. Любое амфифильное средство может быть использовано в создании синтетических наночастиц, которые будут применены в соответствии с данным изобретением.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут факультативно содержать один или более углеводов. Углеводы могут быть природными или синтетическими. Углевод может быть производным природного углевода. В определенных вариантах осуществления углевод содержит моносахарид или дисахарид, включая, но не ограничиваясь, глюкозу, фруктозу, галактозу, рибозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, целлибозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, маннуроновую кислоту, глюкозамин, галактозамин и нейраминовую кислоту. В определенных вариантах осуществления углевод является полисахаридом, включая, но не ограничиваясь, пуллулан, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксцеллюлозу (HC), метилцеллюлозу (MC), декстран, циклодекстран, гликоген, крахмал, гидроксипропилкрахмал, карагеллан, гликон, амилозу, хитозан, N,O-карбоксиметилхитозан, альгин и альгиновую кислоту, крахмал, хитин, гепарин, конджак, глюкоманнан, пустулан, гепарин, гиалуроновую кислоту, курдлан и ксантан. В определенных вариантах осуществления углевод является сахарным спиртом, включая, но не ограничиваясь, маннит, сорбит, ксилит, эритрит, мальтит и лактит.

Синтетические наночастицы могут быть получены, используя широкое разнообразие способов, известных в данном уровне техники. Например, синтетические наночастицы могут быть сформированы

способами, такими как нанопреципитация, потоковая фокусировка с использованием жидкостных каналов, распылительная сушка, испарение растворителя однокомпонентных и двухкомпонентных эмульсий, экстракция растворителем, разделение фаз, размалывание, микроэмульсионные процедуры, микросборка, наносборка, жертвенные слои, простая и комплексная коацервация и другими способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Альтернативно или дополнительно, описаны синтезы водных и органических растворителей для монодисперсных полупроводниковых, проводящих, магнитных, органических и других наноматериалов (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545 и Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). Дополнительные способы были описаны в литературе (см. например, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755 и также патенты США 5578325 и 6007845).

В определенных вариантах осуществления синтетические наночастицы получают с помощью нанопреципитационного процесса или распылительной сушки. Условия, использованные при подготовке синтетических наночастиц, могут быть изменены для получения частиц нужного размера или свойств (например, гидрофобность, гидрофильность, внешняя морфология, "липкость", форма и т.д.). Способ подготовки синтетических наночастиц и используемые условия (например, растворитель, температура, концентрация, расход воздуха и т.д.) могут зависеть от материалов, которые будут связаны с синтетическими наночастицами, и/или композиции полимерной матрицы.

Если частицы, полученные любым из указанных выше методов, имеют диапазон размеров за пределами желаемого диапазона, частицы могут быть калиброваны, например, с помощью микрофилтра.

Связывание может быть достигнуто множеством разных способов и может быть ковалентным или нековалентным. Такое связывание может быть организовано, чтобы быть на поверхности или внутри синтетического наночастицы по данному изобретению. Элементы синтетических наночастиц по данному изобретению (такие как фрагменты, которые содержат иммуноспецифическая поверхность, фрагменты нацеливания, полимерные матрицы и т.п.) могут быть напрямую связаны друг с другом, например, одной или более ковалентными связями, или могут быть связаны одним или более линкерами. Дополнительные способы функционализации синтетических наночастиц могут быть адаптированы из опубликованной патентной заявки США № 2006/0002852, Saltzman et al., опубликованной патентной заявки США № 2009/0028910, DeSimone et al. или опубликованной международной патентной заявки WO/2008/127532 A1, Murthy et al.

Любой подходящий линкер может использоваться в соответствии с данным изобретением. Линкеры могут быть применены для формирования амидных связей, сложноэфирных связей, дисульфидных связей и т.д. Линкеры могут содержать атомы углерода или гетероатомы (например, азот, кислород, серу и т.д.). В некоторых вариантах осуществления линкер является алифатическим или гетероалифатическим линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является полиалкильным линкером. В определенных вариантах осуществления линкер является линкером простых полиэфиров. В определенных вариантах осуществления линкер является полиэтиленовым линкером. В определенных специфических вариантах осуществления линкер является полиэтиленгликольным (PEG) линкером.

В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. Чтобы дать лишь несколько примеров, расщепляемые линкеры включают пептидные линкеры, расщепляемые протеазами, нуклеазочувствительные линкеры из нуклеиновых кислот, липазочувствительные липидные линкеры, гликозидазочувствительные углеводные линкеры, pH-чувствительные линкеры, гипоксиячувствительные линкеры, фоторасщепляемые линкеры, термолабильные линкеры, ферментрасщепляемые линкеры (например, эстеразой расщепляемый линкер), УЗИ-чувствительные линкеры, линкеры, расщепляемые рентгеновскими лучами и т.д. В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым линкером.

Множество разнообразных способов может использоваться для связывания линкера или другого элемента синтетического наночастицы с синтетическим наночастицей. Общая стратегия включает пассивную адсорбцию (например, через электростатические взаимодействия), мультивалентное хелатирование, нековалентное связывание высокой аффинности между членами специфически связывающихся пар, образование ковалентной связи и т.д. (Gao et al., 2005, Curr. Op. Biotechnol., 16:63). В некоторых вариантах осуществления клик-химия может использоваться для связывания материала с синтетическим наночастицей.

Взаимодействия нековалентного специфического связывания могут быть применены. Например, или одна частица, или биомолекула может быть функционализирована с биотином, а еще одна функционализирована со стрептавидином. Эти два фрагмента специфически связываются друг с другом нековалентно и с высокой аффинностью, тем самым, связывая частицу и биомолекулу. Другие пары специфического связывания могут быть использованы аналогичным образом. С другой стороны, гистидин-меченные биомолекулы могут быть связаны с частицами, конъюгированными с никель-нитролотриуксусной кислотой (Ni-NTA).

Дополнительную общую информацию о связывании см. журнал Bioconjugate Chemistry, опублико-

ванный Американским химическим обществом, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210; "Cross-Linking," Химическая техническая библиотека Пирса, доступная на веб-сайте Pierce и первоначально опубликованная в 1994-1995 в каталоге Pierce, и ссылки, цитируемые в них; Wong S.S., Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991 и Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, 1996.

Следует понимать, что композиции согласно изобретению могут быть сделаны любым подходящим способом, и изобретение никоим образом не ограничивается композициями, которые могут быть получены с использованием способов, описанных в данном документе. Выбор подходящего способа может потребовать внимания к свойствам деталей присоединенных фрагментов.

Фармацевтические композиции и способы применения

Композиции согласно данному изобретению содержат соединения по данному изобретению, конъюгаты или синтетические наноносители, факультативно в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями. Композиции могут быть получены с использованием традиционного фармацевтического производства и рецептурных методик, чтобы получить пригодные лекарственные формы. В варианте осуществления соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции суспендированы в стерильном физиологическом растворе для инъекций вместе с консервантом.

В некоторых вариантах осуществления соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции получают в стерильных условиях или в заключении стерилизуют. Это может гарантировать, что полученные композиции стерильны и неинфекционны, тем самым, повышая безопасность по сравнению с нестерильными композициями. Это обеспечивает важные меры безопасности, особенно когда субъекты, получающие соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции, имеют иммунные дефекты, страдают от инфекции и/или восприимчивы к инфекции. В некоторых вариантах осуществления соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции могут быть лиофилизированными и храниться в виде суспензии или как лиофилизированный порошок в зависимости от способа составления в течение длительного периода без потери активности.

Соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции могут быть введены различными путями введения, включая, но без ограничений, парентеральный, подкожный, внутримышечный, внутрикожный, пероральный, интраназальный, чресслизистый, ректальный, глазной, трансдермальный, чрескожный или посредством комбинации этих путей.

Соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции и способы, описываемые в данном документе, можно применять для индукции, усиления, стимуляции, модуляции или управления иммунным ответом. Соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции и способы, описываемые в данном документе, можно применять для диагностики, профилактики и/или лечения состояний, таких как разновидности рака, инфекционные заболевания, метаболические расстройства, дегенеративные заболевания, воспалительные заболевания, иммунологические заболевания, или других расстройств и/или состояний. Соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции и способы, описываемые в данном документе, также можно применять для профилактики или лечения привыкания, например привыкания к никотину или наркотическому веществу. Соединения по данному изобретению, конъюгаты, синтетические наноносители или композиции и способы, описываемые в данном документе, можно также применять для профилактики и/или лечения состояния, возникшего в результате воздействия токсина, вредного вещества, токсина окружающей среды или другого токсичного вещества.

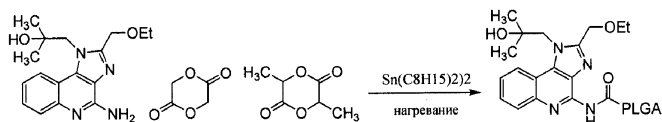
Примеры

Пример 1. Проводимая в одном сосуде полимеризация с раскрытием кольца R848 с D/L-лактидом в присутствии катализатора



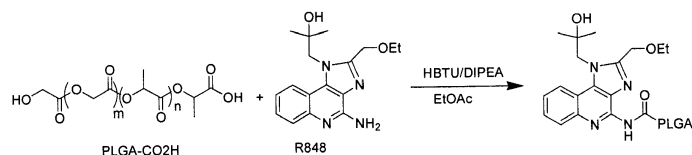
Смесь из R848 (0,2 ммоль, 63 мг), D/L-лактида (40 ммоль, 5,8 г) и 4-диметиламинопиридина (DMAP) (50 мг, 0,4 ммоль) в 2 мл безводного толуола медленно нагрели до 150°C (температура масляной бани) и поддерживали при этой температуре в течение 18 ч (через 3 ч не осталось R848). Смесь охладили до окружающей температуры, и в полученной смеси остановили реакцию водой (50 мл) с осаждением полученного полимера, R848-PLA. Полимер затем промыли последовательно 45 мл каждого из MeOH, iPrOH и этилового простого эфира. Полимер высушили под вакуумом при 30°C с получением грязно-белого рыхлого твердого вещества (5,0 г). Полимерную структуру подтвердили посредством ^1H ЯМР в CDCl_3 . Небольшой образец полимера обработали 2N водным NaOH в THF/MeOH для определения загрузки R848 на полимере с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Загрузка R848 составляет 3 мг на грамм полимера (0,3% загрузка - 27,5% от теории).

Пример 2. Двухэтапная полимеризация с раскрытием кольца R848 с D/L-лактидом и гликолидом



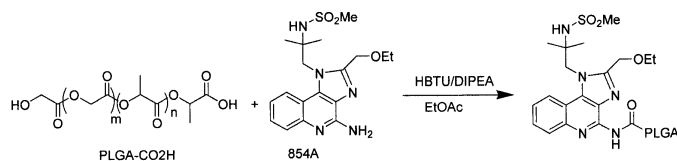
Смесь D/L-лактида (10,8 г, 0,075 моль) и гликолидом (2,9 г, 0,025 моль) нагрели до 135°C в атмосфере аргона. После расплавления всех материалов и получения прозрачного раствора добавили R848 (1,08 г, $3,43 \times 10^{-3}$ моль). Данный раствор перемешивали при 135°C под медленным потоком аргона в течение одного часа. Добавили этилгексаноат олова (150 мкл), и продолжали нагревание в течение 4 ч. После охлаждения твердую светло-коричневую массу растворили в метиленхлориде (250 мл), и раствор промыли 5% раствором винной кислоты (2×200 мл). Раствор метиленхлорида высушили над сульфатом магния, профильтровали и затем сконцентрировали под вакуумом. Остаток растворили в метиленхлориде (20 мл) и добавили 2-пропанол (250 мл) с перемешиванием. Отделившийся полимер выделили декантацией 2-пропанола и высушили в высоком вакууме. ЯМР показал, что полимер имел 71,4% лактида и 28,6% гликолида с молекулярным весом 4000. Загрузка R848 была близкой к теоретической по данным ЯМР.

Пример 3. Получение конъюгата PLGA-R848



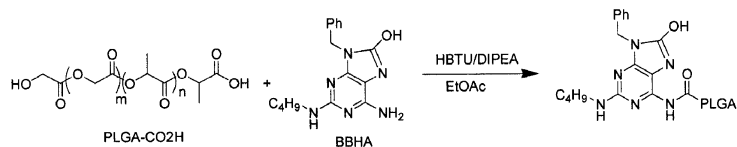
Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB -5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 10 г, 7,0 ммоль) и HBTU (5,3 г, 14 ммоль) в безводном EtOAc (160 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 50 мин. Добавили соединение R848 (2,2 г, 7 ммоль) с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (5 мл, 28 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов и затем при 50-55°C в течение ночи (приблизительно 16 ч). После охлаждения смесь разбавили EtOAc (200 мл) и промыли насыщенным раствором NH_4Cl (2×40 мл), водой (40 мл) и концентрированным соляным раствором (40 мл). Раствор высушили над Na_2SO_4 (20 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (300 мл), и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA (4×50 мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при 35-40°C в течение 3 дней в виде белого порошка (10,26 г, MB по ГПХ (гельпроникающая хроматография) составляет 5200, загрузка R848 составляет 12% по ВЭЖХ).

Пример 4. Получение конъюгата PLGA-854A



Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (20 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 45 мин. Добавили соединение 854A (0,29 г, 0,7 ммоль) с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение ночи (приблизительно 15 ч). После охлаждения смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным раствором NH_4Cl (2×20 мл), водой (20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушили над Na_2SO_4 (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (40 мл), и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA (4×25 мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде белого порошка (1,21 г, MB по ГПХ (гельпроникающая хроматография) составляет 4900, загрузка 854A составляет 14% по ВЭЖХ).

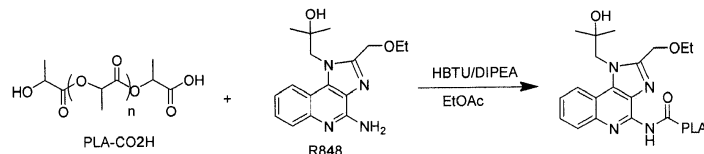
Пример 5. Получение конъюгата PLGA-BBHA



Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавили соединение BBHA (0,22 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивали при

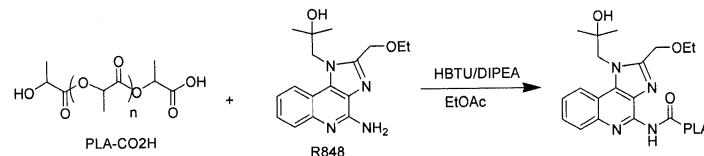
комнатной температуре в течение 20 ч. Добавили дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль), и смесь нагревали при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным раствором NH_4Cl (2×20 мл), водой (20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушили над Na_2SO_4 (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (35 мл), и коричневатый конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,1 г).

Пример 6. Получение конъюгата PLA-R848 с низким MB



Раствор PLA-CO₂H (средний MB: 950, DPI:1,32; 5,0 г, 5,26 ммоль) и HBTU (4,0 г, 10,5 ммоль) в EtOAc (120 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 45 мин. Добавили соединение R848 (1,65 г, 5,26 ммоль) с последующим DIPEA (5,5 мл, 31,6 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение 15 ч. После охлаждения смесь разбавили EtOAc (150 мл) и промыли 1%-ным раствором лимонной кислоты (2×40 мл), водой (40 мл) и соляным раствором (40 мл). Раствор высушили над Na_2SO_4 (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили метил-трет-бутиловый эфир (MTBE) (150 мл), и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли MTBE (50 мл) и высушили под вакуумом при комнатной температуре в течение 2 дней в виде белой пены (5,3 г, средний MB по ГПХ составляет 1200, PDI: 1,29; загрузка R848 составляет 20% по ВЭЖХ).

Пример 7. Получение конъюгата PLA-R848 с низким MB



Раствор PLA-CO₂H (средний MB: 1800, DPI:1,44; 9,5 г, 5,26 ммоль) и HBTU (4,0 г, 10,5 ммоль) в EtOAc (120 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 45 мин. Добавили соединение R848 (1,65 г, 5,26 ммоль) с последующим DIPEA (5,5 мл, 31,6 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение 15 ч. После охлаждения смесь разбавили EtOAc (150 мл) и промыли 1%-ным раствором лимонной кислоты (2×40 мл), водой (40 мл) и соляным раствором (40 мл). Раствор высушили над Na_2SO_4 (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили метил-трет-бутиловый эфир (MTBE) (150 мл), и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли MTBE (50 мл) и высушили под вакуумом при комнатной температуре в течение 2 дней в виде белой пены (9,5 г, средний MB по ГПХ составляет 1900, PDI: 1,53; загрузка R848 составляет 17% по ВЭЖХ).

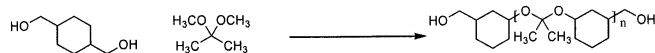
Пример 8. Конъюгирование R848 с PCADK через раскрытие имидного кольца.

Следующие примеры описывают синтез поликетала, PCADK, согласно способу, приведенному в Pulendran et al, WO 2008/127532, который проиллюстрирован на этапе 1 ниже.

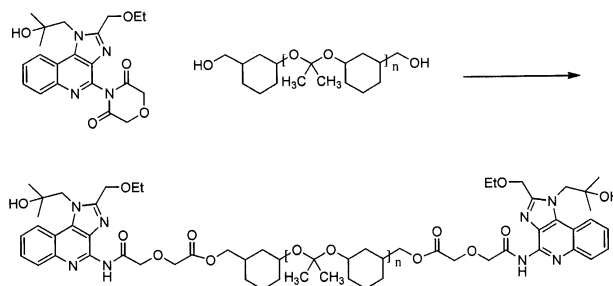
PCADK синтезируют в 50 мл колбе с двумя горлышками, соединенной с короткой дистилляционной головкой. Сначала 5,5 мг перекристаллизованной п-толуолсульфоновой кислоты (0,029 ммоль, Aldrich, Сент-Луис, Миссури) растворяют в 6,82 мл этилацетата и добавили к 30 мл раствора бензола (поддерживая 100°C), который содержит 1,4-циклогександиметанол (12,98 г, 90,0 ммоль, Aldrich). Этилацетату позволяют выкипеть и добавляют дистиллированный 2,2-диметоксипропан (10,94 мл, 90,0 ммоль, Aldrich) к раствору бензола, инициируя реакцию полимеризации. Последовательно добавляют дополнительные дозы 2,2-диметоксипропана (5 мл) и бензола (25 мл) к реакционной смеси каждый час в течение 6 ч через мерную воронку для компенсации выкипевших 2,2-диметоксипропана и бензола. Через 8 ч реакцию останавливают добавлением 500 мкл триэтиламина. Полимер выделяют осаждением в холодном гексане (хранили при -20°C) с последующей вакуумной фильтрацией. Молекулярный вес PCADK определяют посредством гелепроникающей хроматографии (ГПХ) (Shimadzu, Киото, Япония), прибор оборудован УФ-детектором. THF применяют в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин. Стандарты полистирола от Polymer Laboratories (Амхерст, Массачусетс) применяли для построения калибровочной кривой молекулярного веса. Данное соединение применяют для создания частиц PCADK во всех последующих экспериментах.

R848 можно конъюгировать к концевым спиртовым группам PCADK с молекулярным весом 6000 посредством раскрытия имидного кольца в соответствии с этапом 2, показанным ниже.

Этап 1. Получение PCADK



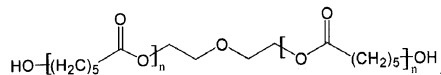
Этап 2: Конъюгация PCADK к R848



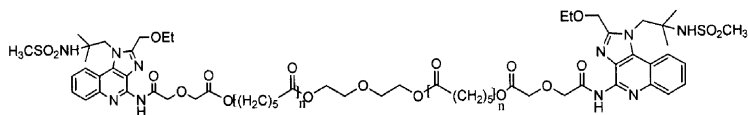
На этапе 2 полимер из этапа 1 (12 г, $2,0 \times 10^{-3}$ моль) растворяют в 100 мл метиленхлорида и добавляют лактам R848 (3,3 г, $8,0 \times 10^{-3}$ моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабицикло[4,4,0]дец-5-ен (TBD, 0,835 г, 6×10^{-3} моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи образуется прозрачный раствор. Раствор разводят метиленхлоридом (100 мл), и раствор промывают 5%-ной лимонной кислотой. Данный раствор сушат над сульфатом натрия, после чего его фильтруют и выпаривают под вакуумом. После сушки в высоком вакууме получают 11,3 г (81%) полимера. Часть гидролизуют в кислоте и определяют, что содержание R848 составляет 9 вес.%.

Пример 9. Конъюгирование R848 с поликапролактондиолом через раскрытие имидного кольца.

Раскрытие имидного кольца применяют для присоединения R854 к конечным спиртовым группам поликапролактондиола с молекулярным весом 2000. Поликапролактондиол приобретен у Aldrich Chemical Company, кат. № 189421, и имеет следующую структуру:



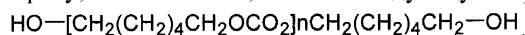
Конъюгат поликапролактондиол-R854 имеет следующую структуру:



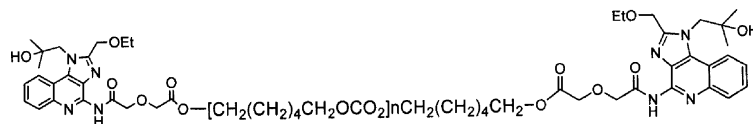
Полимер (5 г, $2,5 \times 10^{-3}$ моль) растворяют в 25 мл метиленхлорида и добавляют лактам R854 (2,4 г, $5,0 \times 10^{-3}$ моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабицикло[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г, 4×10^{-3} моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение 15 мин образуется прозрачный бледно-желтый раствор. Раствор разводят метиленхлоридом (100 мл), и раствор промывают 5%-ной лимонной кислотой. Данный раствор сушат над сульфатом натрия, после чего его фильтруют и выпаривают под вакуумом. После сушки в высоком вакууме получают 5,2 г (70%) полимера. Часть гидролизуют в кислоте и определяют, что содержание R848 составляет 18,5 вес.%.

Пример 10. Конъюгирование R848 с поли(гексаметиленкарбонат)диолом посредством раскрытия имидного кольца.

Раскрытие имидного кольца применяют для присоединения R848 к конечным спиртовым группам поли(гексаметиленкарбонат)диола с молекулярным весом 2000. Поли(гексаметиленкарбонат)диол приобретен у Aldrich Chemical Company, кат. № 461164, и имеет следующую структуру:

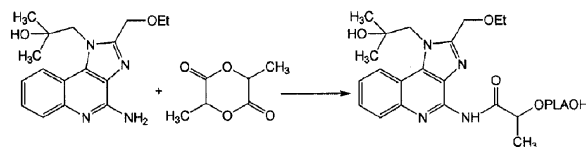


Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-R848 имеет следующую структуру:



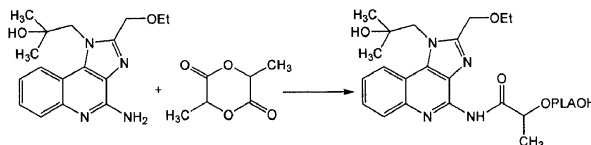
Полимер (5 г, $2,5 \times 10^{-3}$ моль) растворяют в 25 мл метиленхлорида и добавляют лактам R848 (2,06 г, $5,0 \times 10^{-3}$ моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабицикло[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г, 4×10^{-3} моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи образуется прозрачный бледно-желтый раствор. Раствор разводят метиленхлоридом (100 мл), и раствор промывают 5%-ной лимонной кислотой. Данный раствор сушат над сульфатом натрия, после чего его фильтруют и выпаривают под вакуумом. После сушки в высоком вакууме получают 5,9 г (84%) полимера. Применяют ЯМР для определения содержания R848, которое, как определили, составляет 21%.

Пример 11. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина при помощи катализатора на основе этилгексаноата олова



В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин резиквимод (R-848, 100 мг, $3,18 \times 10^{-4}$ моль), D/L лактид (5,6 г, $3,89 \times 10^{-2}$ моль) и безводный сульфат натрия (4,0 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре 50°C в течение 8 ч. Колбу затем продули аргоном и добавили толуол (100 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной бане, установленной на 120°C , пока весь лактид не растворился, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (75 мг, 60 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения добавили воду (20 мл), и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавили дополнительно толуолом (200 мл) и затем промыли водой (200 мл). Раствор толуола затем промыли по очереди 10%-ным раствором хлорида натрия, содержащего 5% конц. соляной кислоты (200 мл), затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (200 мл). ТСХ (диоксид кремния, 10% метанола в метиле-нхлориде) показала, что раствор не содержит свободного R-848. Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением 3,59 г конъюгата полимолочная кислота-R-848. Часть полимера гидролизovali основанием и исследовали с помощью ВЭЖХ на предмет содержания R-848. Путем сравнения калибровочной кривой концентрации R-848 относительно ВЭЖХ-отклика установили, что полимер содержал 4,51 мг R-848 на грамм полимера. Молекулярная масса полимера, определенная с помощью ГПХ, составила приблизительно 19000.

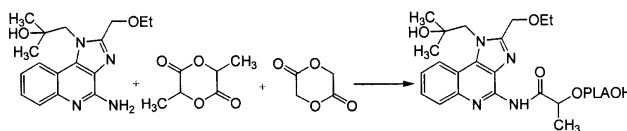
Пример 12. Конъюгаты полимолочной кислоты с низким молекулярным весом и имидазохинолина



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 218 мг, $6,93 \times 10^{-4}$ моль), D/L лактид (1,0 г, $6,93 \times 10^{-3}$ моль) и безводный сульфат натрия (800 мг). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре 55°C в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (50 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной ванне, установленной на 120°C , пока весь лактид не растворился, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (19 мг, 15 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили простым эфиром (200 мл), и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением 880 мг неочищенного конъюгата полимолочная кислота-R-848.

Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10%-ного метанола в метиле-нхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 702 мг (57,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и при сравнении с интегральной интенсивностью протона СН молочной кислоты определили, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат содержал менее 5% свободного R848.

Пример 13. Конъюгаты сополимера гликолевой кислоты и полимолочной кислоты с низким молекулярным весом и имидазохинолина



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 436 мг, $1,39 \times 10^{-3}$ моль), гликолид (402 мг, $3,46 \times 10^{-3}$ моль), D/L лактид (2,0 г, $1,39 \times 10^{-2}$ моль) и безводный сульфат натрия (1,6 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре 55°C в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (60 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной бане, установленной на 120°C , пока не растворился весь R848, гликолид и лактид, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (50 мг, 39 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили этилацетатом (200 мл), и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением неочищенного конъюгата PLGA-R-848. Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10%-ного метанола в метиле-нхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного

конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 1,55 г (54,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и их сравнения с интегральной интенсивностью протона СН молочной кислоты было определено, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат не содержал поддающийся обнаружению свободный R848.

Пример 14. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина при помощи катализа на основе диизопропиламида лития.

Имидазохинолин (R-848), D/L лактид и имеющая отношение лабораторная посуда - все сушили под вакуумом при 50°C в течение 8 ч до использования. В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили R-848 (33 мг, $1,05 \times 10^{-4}$ моль) и сухой толуол (5 мл). Ее нагревали с обратным холодильником до полного растворения R-848. Раствор перемешали в атмосфере азота и охладили до комнатной температуры для получения суспензии мелкодисперсного R-848. К этой суспензии добавили раствор диизопропиламида лития (2,0М в THF, 50 мкл, $1,0 \times 10^{-4}$ моль), после чего продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 5 мин. Бледно-желтый раствор, который образовался, добавили с помощью шприца к горячему (120°C) раствору D/L лактида (1,87 г, $1,3 \times 10^{-2}$ моль) в атмосфере азота. Устранили тепло, и бледно-желтый раствор перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. Раствор разбавили метиленхлоридом (200 мл) и затем его промыли 1%-ной соляной кислотой (2×50 мл), а затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (50 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением конъюгата полимолочная кислота-R-848. ТСХ (диоксид кремния, 10%-ный метанол в метиленхлориде) показала, что раствор не содержит свободного R-848. Полимер растворили в метиленхлориде (10 мл), и этот раствор добавили по каплям в перемешиваемый гексан (200 мл). Осажденный полимер выделили декантацией и высушили под вакуумом с получением 1,47 г конъюгата полимолочная кислота-R848 в виде белого твердого вещества. Часть полимера гидролизovali основанием и исследовали с помощью ВЭЖХ на предмет содержания R-848. Путем сравнения калибровочной кривой концентрации R-848 относительно ВЭЖХ-отклика установили, что полимер содержал 10,96 мг R-848 на грамм полимера.

Пример 15. Активация полимолочной кислоты.

PLA (D/L-полилактид) (Resomer R202H от Boehringer-Ingelheim, кислотное число в эквиваленте КОН 0,21 ммоль/г, характеристическая вязкость (iv): 0,21 дл/г) (10 г, 2,1 ммоль, 1,0 экв.) растворили в дихлорметане (DCM) (35 мл). Добавили EDC (2,0 г, 10,5 ммоль, 5 экв.) и NHS (1,2 г, 10,5 ммоль, 5 экв.). Твердые вещества растворили при помощи воздействия ультразвуком. Полученный в результате раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 дней. Раствор концентрировали для удаления большей части DCM, и остаток добавили в раствор 250 мл диэтилового эфира и 5 мл MeOH для осаждения активированного сложного эфира PLA-NHS. Растворители удалили, и полимер дважды промыли простым эфиром (2×200 мл) и высушили под вакуумом с получением активированного сложного эфира PLA-NHS в виде белого пенистого твердого вещества (~8 г выделенного, ^1H ЯМР подтвердил присутствие сложного эфира NHS). Сложный эфир PLA-NHS хранят в атмосфере аргона в морозилке с температурой ниже -10°C до использования.

Или же реакцию можно осуществить в DMF, THF, диоксане или CHCl_3 вместо DCM. DCC можно использовать вместо EDC (получаемую в результате DCC-мочевину отфильтровывают перед осаждением сложного эфира PLA-NHS из простого эфира). Количество EDC или DCC и NHS может варьировать в диапазоне 2-10 экв. PLA.

Пример 16. Активация PLA.

PLA (D/L-полилактид) с MB 5000 (10,5 г, 2,1 ммоль, 1,0 экв.) растворяют в дихлорметане (DCM) (35 мл). Добавляют EDC (2,0 г, 10,5 ммоль, 5 экв.) и NHS (1,2 г, 10,5 ммоль, 5 экв.). Полученный в результате раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 3 дней. Раствор концентрируют для удаления большей части DCM, и остаток добавляют в раствор 250 мл диэтилового эфира и 5 мл MeOH для осаждения активированного сложного эфира PLA-NHS. Растворители удаляют, и полимер дважды промывают простым эфиром (2×200 мл) и высушивают под вакуумом с получением активированного сложного эфира PLA-NHS в виде белого пенистого твердого вещества (~8 г выделенного, ^1H ЯМР можно использовать для подтверждения присутствия сложного эфира NHS). Сложный эфир PLA-NHS хранят в атмосфере аргона в морозилке с температурой ниже -10°C до использования.

Альтернативно, реакцию можно осуществить в DMF, THF, диоксане или CHCl_3 вместо DCM. DCC можно использовать вместо EDC (получаемую в результате DCC-мочевину отфильтровывают перед осаждением сложного эфира PLA-NHS из простого эфира). Количество EDC или DCC и NHS может находиться в диапазоне 2-10 экв. PLA.

Пример 17. Активация PLGA с низким MB.

Таким же образом, как приведено выше для активации полимера, PLGA с низким MB с 50-75% гликолидом превращают в соответствующий активированный сложный эфир PLGA-NHS и хранят в атмосфере аргона в морозилке при температуре ниже -10°C до использования.

Пример 18. Активация полимолочной кислоты.

PLA (R202H, кислотное число 0,21 ммоль/г) (2,0 г, 0,42 ммоль, 1,0 экв.) растворили в 10 мл сухого ацетонитрила. Добавили N,N'-дисулцинимидилкарбонат (DSC) (215 мг, 1,26 ммоль, 3,0 экв.) и каталитическое количество 4-(N,N-диметиламино)пиридина (DMAP). Полученную в результате смесь перешивали в атмосфере аргона 1 день. Полученный в результате раствор сконцентрировали до почти полной сухости. Остаток затем добавили к 40 мл простого эфира для осаждения полимера, который дважды промыли простым эфиром (2×30 мл) и высушили под вакуумом с получением активированного сложного эфира PLA-NHS (1H ЯМР показал количество сложного эфира NHS на уровне приблизительно 80%).

Пример 19. Активация полимолочной кислоты.

PLA (R202H) (5,0 г, 1,05 ммоль) растворили в 25 мл безводного DCM и 2,5 мл безводного DMF. Добавили DCC (650 мг, 3,15 ммоль, 5,0 экв.) и пентафторфенол (PFP) (580 мг, 3,15 ммоль, 5,0 экв.). Полученный в результате раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 дней и затем сконцентрировали для удаления DCM. Полученный в результате остаток добавили к 250 мл простого эфира для осаждения активированного полимера PLA, который промыли простым эфиром (2×100 мл) и высушили под вакуумом с получением активированного сложного эфира PLA-PFP в виде белого пенистого твердого вещества (4,0 г).

Пример 20. Конъюгаты полимолочной кислоты или PLGA и имидазохинолина.

PLA-NHS (1,0 г), R848 (132 мг, 0,42 ммоль) и диизопропилэтиламин (DIPEA) (0,073 мл, 0,42 ммоль) растворили в 2 мл сухого DMF в атмосфере аргона. Полученный в результате раствор нагревали при 50-60°C в течение 2 дней. Раствор охладили до комнатной температуры и добавили к 40 мл деионизированной (DI) воды для осаждения полимерного продукта. Затем полимер промыли DI водой (40 мл) и простым эфиром (2×40 мл) и высушили при 30°C под вакуумом с получением конъюгата R848-PLA в виде белого пенистого твердого вещества (0,8 г, 1H ЯМР показал конъюгацию R848 с PLA через амидную связь). Степень конъюгации (загрузки) R848 на полимер подтвердили с помощью ВЭЖХ-анализа следующим образом: навеску полимера растворили в THF/MeOH и обработали 15% NaOH. Полученные в результате гидролизованные полимерные продукты проанализировали на количество R848 с помощью ВЭЖХ относительно калибровочной кривой.

Пример 21. Конъюгаты полимолочной кислоты или PLGA и имидазохинолина.

PLA-NHS (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), DIPEA (0,15 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) и DMAP (25 мг, 0,21 ммоль, 1,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF в атмосфере аргона. Полученный в результате раствор нагревали при 50-60°C в течение 2 дней. Раствор охладили до комнатной температуры и добавили к 40 мл деионизированной (DI) воды для осаждения полимерного продукта. Затем полимер промыли DI водой (40 мл) и простым эфиром (2×40 мл) и высушили при 30°C под вакуумом с получением конъюгата PLA-R848 в виде белого пенистого твердого вещества (0,7 г, 20 мг полимера гидролизовали в растворе из 0,2 мл THF, 0,1 мл MeOH и 0,1 мл 15% NaOH). Количество R848 на полимере, как определили, составляло приблизительно 35 мг/г согласно обращенно-фазовому ВЭЖХ-анализу (колонка C18, подвижная фаза A: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза B: 0,1% TFA в CH₃CN, градиент).

Пример 22. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина.

PLA (R202H) (2,0 г, 0,42 ммоль, 1,0 экв.), DCC (260 мг, 1,26 ммоль, 3,0 экв.), NHS (145 мг, 1,26 ммоль, 3,0 экв.), R848 (200 мг, 0,63 ммоль, 1,5 экв.), DMAP (77 мг, 0,63 ммоль, 1,5 экв.) и DIPEA (0,223 мл, 1,26 ммоль, 3,0 экв.) растворили в 4 мл сухого DMF. Смесь нагревали при 50-55°C в течение 3 дней. Смесь охладили до комнатной температуры и разбавили DCM. DCC-мочевину отфильтровали, и фильтрат сконцентрировали для удаления DCM. Полученный остаток в DMF добавили к воде (40 мл) для осаждения полимерного продукта, который промыли водой (40 мл), простым эфиром/DCM (40 мл/4 мл) и простым эфиром (40 мл). После сушки под вакуумом при 30°C получили требуемый конъюгат PLA-R848 в виде белого пенистого твердого вещества (1,5 г).

Пример 23. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина.

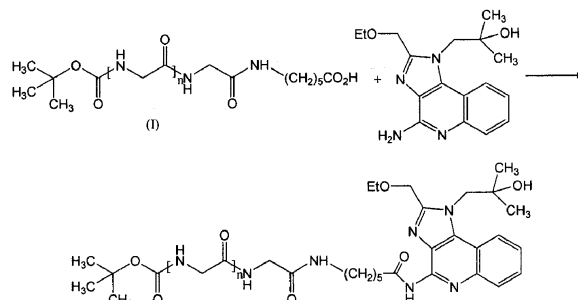
PLA (R202H) (2,0 г, 0,42 ммоль, 1,0 экв.), EDC (242 мг, 1,26 ммоль, 3,0 экв.), HOAt (171 мг, 1,26 ммоль, 3,0 экв.), R848 (200 мг, 0,63 ммоль, 1,5 экв.) и DIPEA (0,223 мл, 1,26 ммоль, 3,0 экв.) растворили в 4 мл сухого DMF. Смесь нагревали при 50-55°C в течение 2 дней. Раствор охладили до комнатной температуры и добавили к воде (40 мл) для осаждения полимерного продукта, который промыли водой (40 мл), простым эфиром/MeOH (40 мл/2 мл) и простым эфиром (40 мл). Полимер оранжевого цвета растворили в 4 мл DCM, и полученный раствор добавили к 40 мл простого эфира для осаждения полимера без значительной части оранжевого цвета. Светло-оранжевый полимер промыли простым эфиром (40 мл). После сушки под вакуумом при 30°C получили требуемый конъюгат PLA-R848 в виде светло-коричневого пенистого твердого вещества (1,5 г).

Пример 24. Конъюгаты полимолочной кислоты или PLGA и имидазохинолина.

PLA (R202H) (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), EDC (161 мг, 0,84 ммоль, 4,0 экв.), HOBt·H₂O (65 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.) и DIPEA (0,150 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF. Смесь нагревали при 50-55°C в течение 2 дней. Раствор охладили до комнатной температуры и добавили к воде (40 мл) для осаждения полимерного продукта. Полимер оранжевого цвета

растворили в 2 мл DCM, и полученный раствор добавили к 40 мл простого эфира для осаждения полимера, который промыли водой/ацетоном (40 мл/2 мл) и простым эфиром (40 мл). После сушки под вакуумом при 30°C требуемый конъюгат PLA-R848 получили в виде грязно-белого пенистого твердого вещества (1,0 г, загрузка R848 на полимере составила приблизительно 45 мг/г по данным ВЭЖХ-анализа и подтверждена ^1H ЯМР). Таким же способом получили PLGA (75% лактида)-R848 и PLGA (50% лактида)-R848.

Пример 25. Конъюгация R848 с полиглицином, полиамид



Получают защищенную t-бутилоксикарбонил (tBOC) полиглицинкарбоновую кислоту (I) посредством полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиангирида глицина (Aldrich кат. № 369772) с применением сложного бензильного эфира 6-аминокапроновой кислоты (Aldrich кат. № S33465) по способу Aliferis et al. (Biomacromolecules, 5, 1653, (2004)). Защита концевой аминогруппы в виде t-BOC-карбамата с последующей гидрогенизацией над палладием на углеороде для удаления бензильного сложного эфира завершает синтез BOC-защищенной полиглицинкарбоновой кислоты (I).

Смесь BOC-защищенной полиглицинкарбоновой кислоты (5 г, $\text{MB}=2000$, $2,5 \times 10^{-3}$ моль) и HBTU (3,79 г, $1,0 \times 10^{-2}$ моль) в безводном DMF (100 мл) перемешивают при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 50 мин. Затем добавляют R848 (1,6 г, $5,0 \times 10^{-3}$ моль) с последующим диизопропилэтиламином (4 мл, $2,2 \times 10^{-2}$ моль). Смесь перемешивают при КТ (комнатная температура) в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение ночи (16 ч). После охлаждения DMF выпаривают под вакуумом, и остаток растирают в порошок в EtOAc (100 мл). Полимер выделяют при помощи фильтрации и затем полимер промывают 2-пропанолом (4×25 мл) для удаления остаточных реагентов и сушат под вакуумом при 35-40°C в течение 3 дней. Полимер выделяют в виде грязно-белого твердого вещества с выходом 5,1 г (88%). Загрузка R848, которую можно определить с помощью ЯМР, составляет 10,1%.

Защитную группу t-BOC удаляют с помощью трифторуксусной кислоты, и полученный полимер прививают к PLA карбоксильными концевыми группами посредством традиционных способов.

Пример 26. Получение конъюгата PLGA с полимером полиглицин/R848.

Этап 1.

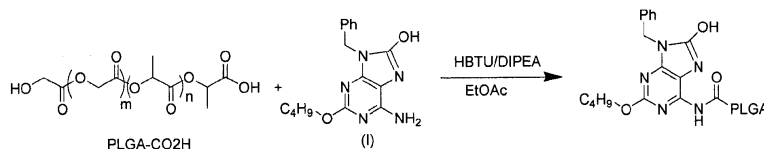
Конъюгат полиглицин/R848, защищенный t-BOC, (5 г) растворяют в трифторуксусной кислоте (25 мл), и этот раствор нагревают при 50°C в течение одного часа. После охлаждения трифторуксусную кислоту удаляют под вакуумом, и остаток растирают в порошок в этилацетате (25 мл). Полимер выделяют фильтрацией и хорошо промывают 2-пропанолом. После сушки под вакуумом получают 4,5 г полимера в виде грязно-белого твердого вещества.

Этап 2.

Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB -5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 10 г, 7,0 ммоль) и HBTU (5,3 г, 14 ммоль) в безводном DMF (100 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 50 мин. Добавляют полимер из приведенного выше (1,4 г, 7 ммоль), растворенный в сухом DMF (20 мл), с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (5 мл, 28 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение ночи (16 ч). После охлаждения DMF выпаривают под вакуумом, и остаток растворяют в метиленхлориде (50 мл). Полимер осаждают посредством добавления 2-пропанола (200 мл). Полимер выделяют при помощи декантирования, промывают 2-пропанолом (4×50 мл) для удаления остаточных реагентов и высушивают под вакуумом при 35-40°C в течение ночи.

Получают 9,8 г (86%) блок-сополимера.

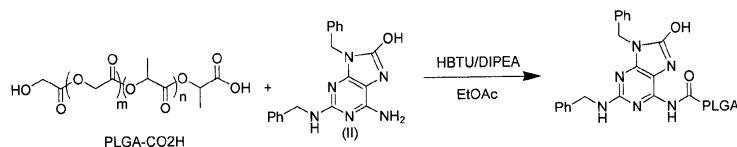
Пример 27. Получение конъюгата PLGA-2-бутоксид-8-гидроксид-9-бензиладенин



Смесь PLGA (Lakeshores Polymers, MB -5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавляют соединение (I) (0,22 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в

течение 20 ч. Добавляют дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль), и смесь нагревают при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавляют EtOAc (100 мл) и промывают насыщенным раствором NH_4Cl (20 мл), водой (2×20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор сушат над Na_2SO_4 (10 г) и концентрируют в гелеподобный остаток. Затем добавляют изопропиловый спирт (IPA) (35 мл), и осаждают из раствора коричневатый конъюгат полимера. Затем полимер промывают IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и сушат под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,0 г).

Пример 28. Получение конъюгата PLGA-2,9-дibenзил-8-гидроксиадеин



Смесь PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавляют соединение (II) (0,24 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 20 ч. Добавляют дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль), и смесь нагревают при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавляют EtOAc (100 мл) и промывают насыщенным раствором NH_4Cl (20 мл), водой (2×20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушивают над Na_2SO_4 (10 г) и концентрируют в гелеподобный остаток. Затем добавляют изопропиловый спирт (IPA) (35 мл), и из раствора осаждают коричневатый конъюгат полимера. Затем полимер промывают IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и сушат под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,2 г).

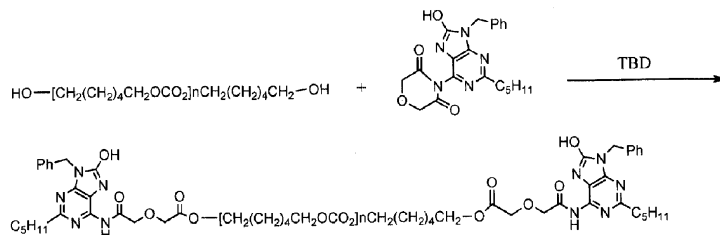
Пример 29. Раскрытие имидного кольца, применяемое для присоединения 2-пентил-8-гидрокси-9-бензиладенина к концевым спиртовым группам поли(гексаметиленкарбонат)диола с молекулярным весом 2000.

Поли(гексаметиленкарбонат)диол приобретен у Aldrich Chemical Company, кат. № 461164.

Поли(гексаметиленкарбонат)диол



Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-8-оксадеин



Полимер (5 г, $2,5 \times 10^{-3}$ моль) растворяют в 25 мл метилхлорида и добавляют лактам 2-пентил-8-гидрокси-9-бензиладенина (2,05 г, $5,0 \times 10^{-3}$ моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабицикло[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г, 4×10^{-3} моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи образуется прозрачный бледно-желтый раствор. Раствор разводят метилхлоридом (100 мл), и раствор промывают 5%-ной лимонной кислотой. Данный раствор высушивают над сульфатом натрия, после чего его фильтруют и выпаривают под вакуумом. После сушки в высоком вакууме получают 5,5 г (78%) полимера. Применяют ЯМР для определения содержания бензиладенина, которое составляет 18%.

Пример 30. Конъюгаты никотин-Peg-Pla.

Полимер 3-никотин-PEG-PLA синтезировали следующим образом. Сначала растворили моноаминополи(этиленгликоль) от JenKem® с молекулярным весом 3,5 КДа (0,20 г, $5,7 \times 10^{-5}$ моль) и избыток 4-карбоксиникотина (0,126 г, $5,7 \times 10^{-4}$ моль) в диметилформамиде (5,0 мл). Перемешали раствор и добавили дициклогексилкарбодиимид (0,124 г, $6,0 \times 10^{-4}$ моль). Этот раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Добавили воду (0,10 мл), и перемешивание продолжали еще в течение 15 мин. Осадок дициклогексилмочевины удалили фильтрацией, и фильтраты выпарили под вакуумом. Остаток растворили в метилхлориде (4,0 мл), и этот раствор добавили к диэтиловому эфиру (100 мл). Раствор охлаждали в холодильнике в течение 2 ч, и осажденный полимер выделили фильтрацией. После промывания диэтиловым эфиром твердый белый полимер высушили в высоком вакууме. Выход составил 0,188 г. Этот полимер был использован без дополнительной очистки для следующего этапа.

Полимер никотин/PEG (0,20 г, $5,7 \times 10^{-5}$ моль) растворили в сухом тетрагидрофуране (10 мл) в атмосфере азота, и перемешивали раствор по мере добавления раствора алюмогидрида лития в тетрагидрофу-

ране (1,43 мл 2,0М, $2,85 \times 10^{-3}$ моль). Добавление алюмогидрида лития вызвало осаждение полимера в виде студенистой массы. Реакционную смесь нагрели до 80°C в медленном потоке азота, позволяя тетрагидрофурану испаряться. Остаток затем нагревали при 80°C в течение 2 ч. После охлаждения осторожно добавили воду (0,5 мл). После того как выделение водорода остановилось, добавили 10%-ный метанол в метиленхлориде (50 мл), и реакционную смесь перемешивали до растворения полимера. Эту смесь отфильтровали через кизельгур (диатомовую землю) марки Celite® (доступна от EMD Inc. как Celite® 545, кат. № CX0574-3), и фильтрат выпарили досуха под вакуумом. Остаток растворяли в метиленхлориде (4,0 мл), и этот раствор медленно добавляли к диэтиловому эфиру (100 мл). Полимер, отделенный в виде белого хлопьевидного твердого вещества, выделили с помощью центрифугирования. После промывания в диэтиловом эфире твердое вещество высушили под вакуумом. Выход составил 0,129 г.

Затем наполнили круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную мешалкой и обратным холодильником, полимером PEG/никотин (0,081 г, $2,2 \times 10^{-5}$ моль), D/L-лактидом (0,410 г, $2,85 \times 10^{-3}$ моль) и безводным сульфатом натрия (0,380 г). Смесь высушивали под вакуумом при 55°C в течение 8 ч. Колбу охлаждали и продували аргоном, а затем добавляли сухой толуол (10 мл). Колбу помещали на масляную баню, установленную на 120°C, и как только лактид растворялся, добавляли этилгексаноат олова (5,5 мг, $1,36 \times 10^{-5}$ моль). Реакцию проводили при 120°C в течение 16 ч. После охлаждения до комнатной температуры добавили воду (15 мл), и перемешивание продолжили в течение 30 мин. Добавили метиленхлорид (200 мл), и после встряхивания в делительной воронке фазам позволили осесть. Слой метиленхлорида выделен и высушен над безводным сульфатом магния. После фильтрации для удаления высушивающего средства фильтраты выпарили под вакуумом с получением полимера в виде бесцветной пены. Полимер растворили в тетрагидрофуране (10 мл), и этот раствор медленно добавили в воду (150 мл) при перемешивании. Осажденный полимер выделили с помощью центрифугирования, и твердое вещество растворили в метиленхлориде (10 мл). Метиленхлорид удалили под вакуумом, и остаток высушили под вакуумом. Выход полимера 3-никотин-PEG-PLA составил 0,38 г.

Пример 31. Состав с синтетическим наноносителем.

Для инкапсулированных составов адьюванта синтезировали Резиквимод (также известный как R848) в соответствии с синтезом, приведенным в примере 99 патента США № 5389640 Gerster и соавт.

R848 конъюгировали с PLA вышеприведенным способом, и структуру PLA подтвердили ЯМР.

Конъюгат PLA-PEG-никотин получили согласно примеру 30.

Приобрели PLA (Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc., 2820 North Normandy Drive, Питерсберг, Вирджиния 23805). Поливиниловый спирт (MB=11 КДа-31 КДа, гидролизированный на 85-89%) приобрели у VWR scientific. Пептид овальбумина 323-339 получили от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Торранс, Калифорния 90505. Кат. № 4064565).

Вышеприведенные материалы применяли для получения следующих растворов:

1) Резиквимод (R848), 10 мг/мл, и PLA, 100 мг/мл, в метиленхлориде или конъюгат PLA-R848, 100 мг/мл, в метиленхлориде.

2) PLA-PEG-никотин в метиленхлориде, 100 мг/мл.

3) PLA в метиленхлориде, 100 мг/мл.

4) Овальбумина пептид 323-339 в воде, 10 или 69 мг/мл.

5) Поливиниловый спирт в воде, 50 мг/мл.

Раствор № 1 (0,25-0,75 мл), раствор № 2 (0,25 мл), раствор № 3 (0,25-0,5 мл) и раствор № 4 (0,1 мл) объединили в небольшой емкости, и смесь обработали ультразвуком при 50%-ной амплитуды в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250. К этой эмульсии добавили раствор № 5 (2,0 мл), и обработка ультразвуком при 35% амплитуды в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250 образует вторую эмульсию. Ее добавили в стакан с фосфатно-соляным буфером (30 мл), и данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч для образования наночастиц.

Чтобы промыть частицы, часть дисперсии наночастиц (7,4 мл) перенесли в центрифужную пробирку и крутили при 5300 g один час, супернатант удалили, а осадок ресуспендировали в 7,4 мл соляного раствора, забуференного фосфатом. Повторили процедуру центрифугирования, и осадок ресуспендировали в 2,2 мл фосфатно-соляного буфера для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

Пример 32. Двойная эмульсия с множеством первичных эмульсий.

Материалы.

Пептид овальбумина 323-339, 17 аминокислотный пептид, известный как Т-клеточный эпитоп белка овальбумина, приобрели у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Торранс, Калифорния 90505.)

Резиквимод (также известный как R848) синтезировали согласно способу, приведенному в патенте США № 6608201.

PLA-R848, резиквимод конъюгировали с PLA с молекулярным весом приблизительно 2500 Да согласно вышеприведенному способу.

PLGA-R848, резиквимод конъюгировали с PLGA с молекулярным весом приблизительно 4100 Да согласно вышеприведенному способу.

PS-1826 олигонуклеотид ДНК с полностью фосфотиоатированным остовом, имеющий нуклеотид-

ную последовательность 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' с натриевым противоионом, приобрели у Oligos Etc (9775 SW Commerce Circle C-6, Уилсонвилль, Орегон 97070).

PS-1826 олигонуклеотид ДНК с фосфодиэфирным остовом, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' с натриевым противоионом, приобрели у Oligos Etc. (9775 SW Commerce Circle C-6, Уилсонвилль, Орегон 97070).

PLA с характеристической вязкостью 0,21 дл/г приобрели у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Бирмингем, Алабама 35211. Код продукта 100 DL 2A).

PLA с характеристической вязкостью 0,71 дл/г приобрели у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Бирмингем, Алабама 35211. Код продукта 100 DL 7A).

PLA с характеристической вязкостью 0,19 дл/г приобрели у Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc. (Питерсберг, Вирджиния. Кат. № R202H).

PLA-PEG-никотин с молекулярным весом приблизительно 18500-22000 Да получили согласно вышеприведенному способу.

PLA-PEG-R848 с молекулярным весом приблизительно 15000 Да получили согласно вышеприведенному способу.

Поливиниловый спирт (МВ=11000-31000 Да, гидролизированный на 87-89%) приобрели у J.T. Baker (кат. № U232-08).

Партии изготовили с помощью способа двойных эмульсий с множеством первичных эмульсий. Приведенная ниже таблица дает ссылку на индексы растворов (например, В в колонке раствора №1 указывает на то, что применялся раствор №1В) и объем использованного раствора.

Номер образца	Раствор №1 (объем)	Раствор №2 (объем)	Раствор №3 (объем)	Раствор №4 (объем)	Раствор №5 (объем)
1	В (0,1 мл)	С (1,0 мл)	А (0,1 мл)	С (1,0 мл)	А (2,0 мл)
2	А (0,2 мл)	А (1,0 мл)	А (0,1 мл)	А (1,0 мл)	А (3,0 мл)
3	А (0,2 мл)	В (1,0 мл)	А (0,1 мл)	В (1,0 мл)	А (3,0 мл)
4	А (0,2 мл)	В (1,0 мл)	А (0,1 мл)	В (1,0 мл)	А (3,0 мл)

Раствор 1А.

Пептид овальбумина 323-339, 35 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 1В.

Пептид овальбумина 323-339, 70 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2А.

0,21-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,21-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 частей раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 2В.

0,71-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,71-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 частей раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 2С.

0,19-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,19-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 частей раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 3А.

Олигонуклеотид (либо PS-1826, либо PO-1826), 200 мг/мл, в очищенной воде. Раствор приготовили путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 4А.

Такой же, как и раствор № 2А.

Раствор 4В.

Такой же, как и раствор № 2В.

Раствор 4С.

Такой же, как и раствор № 2С.

Раствор 5А.

Поливиниловый спирт, 50 мг/мл, в 100 мМ фосфатном буфере с pH 8.

Приготовили две отдельные первичные эмульсии вода-в-масле (В/М). В1/М2 приготовили путем объединения раствора 1 и раствора 2 в небольшой пробирке давлением и обработки ультразвуком с 50%-ной амплитудой в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250. В3/М4 приготовили путем объединения раствора 3 и раствора 4 в пробирке с низким давлением и обработки ультразвуком с 50%-ной амплитудой в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250. Третью эмульсию с эмульсией из двух внутренних эмульсий ([В1/М2, В3/М4]/В5) приготовили путем объединения 0,5 мл каждой первичной эмульсии (В1/М2 и В3/М4) и раствора 5 и обработки ультразвуком с 30%-ной амплитудой в течение 40-60 с с помощью Branson Digital Sonifier 250.

Третью эмульсию добавили в стакан, содержащий 70 мМ фосфатный буферный раствор (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с тем, чтобы позволить испариться метиленхлориду и сформироваться наночастицам. Часть наночастиц промыли путем перенесения суспензии наночастиц в центрифужную пробирку и кручения при 13823 g в течение одного часа, удаления супернатанта и ресуспендирования осадка в фосфатно-соляном буфере. Повторили процедуру промывания, и осадок ресуспендировали в фосфатно-соляном буфере для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

Количества олигонуклеотида и пептида в наночастице определили посредством ВЭЖХ-анализа.

Пример 33. Стандартная двойная эмульсия.

Материалы.

Как приведено в примере 32 выше.

Партии изготовили с помощью стандартного способа двойных эмульсий. Приведенная ниже таблица дает ссылку на индексы растворов (например, В в колонке раствора №1 указывает на то, что применялся раствор №1В) и объем использованного раствора.

Номер образца	Раствор №1 (объем)	Раствор №2 (объем)	Раствор №3 (объем)	Раствор №4 (объем)	Раствор №5 (объем)
1	А (0,1 мл)	А (0,75 мл)	А (0,25 мл)	Нет	А (2,0 мл)
2	А (0,1 мл)	Нет	А (0,25 мл)	А (0,75 мл)	А (2,0 мл)
3	А (0,1 мл)	В (0,75 мл)	А (0,25 мл)	Нет	А (2,0 мл)
4	В (0,1 мл)	С (0,75 мл)	А (0,25 мл)	Нет	В (2,0 мл)
5	В (0,1 мл)	Д (0,25 мл)	А (0,25 мл)	А (0,50 мл)	В (2,0 мл)
6	С (0,2 мл)	Нет	А (0,25 мл)	А (0,75 мл)	В (2,0 мл)
7	Д (0,1 мл)	Нет	А (0,25 мл)	А (0,75 мл)	В (2,0 мл)

Раствор 1А.

Пептид овальбумина 323-339, 69 мг/мл, в деионизированной воде. Раствор приготовили путем медленного добавления пептида овальбумина к воде при перемешивании при комнатной температуре.

Раствор 1В.

Пептид овальбумина 323-339, 70 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 1С.

Олигонуклеотид (PS-1826), 50 мг/мл, в очищенной воде. Раствор приготовили путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 1D.

Пептид овальбумина 323-339, 17,5 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина, 70 мг/мл, в 0,13N растворе соляной кислоты при комнатной температуре и затем разведения раствора 3 частями очищенной воды на одну часть исходного раствора.

Раствор 2А.
R848, 10 мг/мл, и 0,19-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 2В.

PLA-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 2С.

PLGA-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 2D.

PLA-PEG-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 3А.

PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 4А.

0,19-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 5А.

Поливиниловый спирт, 50 мг/мл, в деионизированной воде.

Раствор 5В.

Поливиниловый спирт, 50 мг/мл, в 100 мМ фосфатном буфере с pH 8.

Первичную эмульсию вода-в-масле (В/М) приготовили путем объединения раствора 1 и раствора 2, раствора 3 и раствора 4 в небольшой пробирке давления и обработки ультразвуком с 50%-ной амплитудой в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250. Двойную эмульсию вода/масло/вода (В/М/В) приготовили путем добавления раствора 5 к первичной эмульсии и обработки ультразвуком при 30-35%-ной амплитуде в течение 40 с с помощью Branson Digital Sonifier 250.

Двойную эмульсию добавили в стакан с раствором фосфатного буфера (30 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с тем, чтобы позволить испариться метиленхлориду и сформироваться наноносителям. Часть наноносителей промыли путем перенесения суспензии наноносителей в центрифужную пробирку и кручения при 5000-9500 об/мин в течение одного часа, удаления супернатанта и ресуспендирования осадка в фосфатно-соляном буфере. Повторили процедуру промывания, и осадок ресуспендировали в фосфатно-соляном буфере для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

Пример 34. Определение количества средств.

Способ для R848 и пептидов (например, пептида овальбумина, пептида человека, TT2pDT5t).

Количество R848 (иммуностимулирующее средство) и пептида овальбумина (Т-клеточный антиген) измерили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100 при соответствующих длинах волн ($A=254$ нм для R848 и 215 нм для пептида ova), оснащенной колонкой Agilent Zorbax SB-C18 (3,5 мкм $75 \times 4,6$ мм. Температура колонки= 40°C (кат. номер 866953-902)) с применением подвижной фазы А (МРА) 95% воды/5% ацетонитрила/0,1% TFA и подвижной фазы В (МРВ) 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA (градиент В=5-45% за 7 мин; постепенно до 95% В до 9 мин; обратное понижение до 5% В до 9,5 мин и сохранять в равновесии до конца. Общее время цикла составило 13 мин со скоростью потока 1 мл/мин).

Способ для CrG.

Количество CrG (иммуностимулирующее средство) измерили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100 при 260 нм, оснащенной XBridge C-18 Waters (2,5-микронная частица, $50 \times 4,6$ мм внутренний диаметр (кат. № 186003090), темп, колонки 600°C) с применением подвижной фазы А 2% ацетонитрил в 100 мМ ТЕА-ацетатный буфер, pH приблизительно 8,0, и подвижной фазы В в виде 90% ацетонитрила, 10% воды (колонку уравнивали до 5% В с повышением до 55% В за 8,5 мин, затем постепенно до 90% В до 12 мин. Концентрацию В быстро повысили до 5% за 1 мин и уравнивали до времени остановки, 16 мин. Скорость потока составляла 1 мл/мин до окончания способа, 16 мин).

Способ для аналога никотина.

Аналог никотина измеряли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100, оснащенной XBridge C-18 Waters (5-микронная частица, $100 \times 4,6$ мм внутренний диаметр, температура колонки 400°C) с применением подвижной фазы А (МРА) 95% воды/5% ацетонитрила/0,1% TFA и подвижной фазы В (МРВ) 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA (градиент: колонку уравнивали при 5% В, повышали до 45% В за 14 мин. Затем постепенно повышали до 95% В от 14 до 20 мин). Концентрацию подвижной фазы В быстро понизили обратно до 5% и повторно уравнивали до конца способа. Скорость потока способа поддерживали при 0,5 мл/мин с общим временем цикла 25 мин. Суспензию NC центрифугировали при 14000 об/мин в течение приблизительно 15-30 мин в зависимости от размера частиц. Собранные осадки обрабатывали 200 мкл концентр. NH_4OH (8 М) в течение 2 ч при покачивании до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. 200 мкл 1% TFA добавили для нейтрализации раствора смеси, что дало общий объем раствора осадка 200 мкл. Аликвоту 50 мкл раствора разбавили МРА (или водой) до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества, присутствовавшего в осадках.

Инкапсулированный свободный R848 в наноносителе 0,5 мл суспензии NC центрифугировали при 14000 об/мин в течение приблизительно 15 мин. Собранный остаток растворили 0,3 мл ацетонитрила и недолго центрифугировали при 14000 об/мин для удаления любых остаточных нерастворимых веществ. Прозрачный раствор дополнительно разбавили 4-кратным эквивалентным объемом МРА и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанной выше.

Инкапсулированный CpG в наноносителе.

330 мкл суспензии NC с производства (приблизительно 10 мг/мл суспензия в PBS) осадили центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15-30 мин в зависимости от размера частиц. Собранные осадки ресуспендировали 500 мкл воды и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин до полного диспергирования частиц. NC затем нагревали при 600°C в течение 10 мин. К смеси добавили дополнительные 200 мкл 1 N NaOH, нагревали еще 5 мин, в результате чего смесь становится прозрачной. Раствор гидролизованного NC недолго центрифугировали на 14000 об/мин. Затем осуществили конечное 2-кратное разведение прозрачного раствора с использованием воды и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанной выше.

Инкапсулированные Т-клеточные антигены (например, пептид ova или пептид человека, TT2pDT5t).

330 мкл суспензии NC с производства (приблизительно 10 мг/мл суспензия в PBS) осадили центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15-30 мин. К осадкам добавили 100 мкл ацетонитрила для растворения полимерных компонентов NC. Смесь перемешали на вортекс-мешалке и обрабатывали ультразвуком в течение 1-5 мин. 100 мкл 0,2% TFA добавили к смеси для экстрагирования пептидов и обрабатывали ультразвуком в течение еще 5 мин, чтобы обеспечить разрушение агрегатов. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин для отделения каких-либо нерастворимых материалов (например, полимеров). Взяли 50 мкл аликвоту супернатанта, разведенную 150 мкл МРА (или воды), и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано выше.

Количество конъюгированного аналога никотина (В-клеточный антиген) в наноносителях.

1,5 мл суспензии NC осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение приблизительно 15 мин, осадки гидролизовали с помощью 150 мкл концентрированного NH_4OH (8M) в течение приблизительно 2-3 ч до тех пор, пока раствор не становится прозрачным. К смеси осадков добавили 150 мкл 2% TFA (водн.) для нейтрализации раствора. Аликвоту 100 мкл смеси развели 200 мкл воды и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанной выше, и определили количество на основе калибровочной кривой, построенной при помощи предшественника (PEG-никотин) PLA-PEG-никотина, применяемого в производстве.

Пример 35. Скорость высвобождения иммуномодулирующего средства из синтетических наноносителей.

Следующие данные демонстрируют скорости высвобождения R848 из наночастиц, произведенных из конъюгата низкомолекулярной полимолочной кислоты R848, показанного выше. Табл. 1 приводит соответствующую информацию о составах для экспериментов.

Высвобождение Т-клеточного антигена, пептида ova и адьюванта, R848 из синтетического наноносителя (наночастиц) в PBS (100 mM, pH 7,4) и цитратного буфера (100 mM, pH 4,5) при 37°C осуществили следующим образом:

Аналитический способ.

Высвобожденное количество R848 и ova пептида измеряют при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100 при $\lambda=215$ нм, оснащенной колонкой Zorbax SB-C18 Agilent (3,5 мкм, 75×4,6 мм. Температура колонки=40°C (кат. № 866953-902)) с применением подвижной фазы А (МРА) 98% воды/2% ацетонитрила/0,1% TFA и подвижной фазы В (МРВ) 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA с градиентом: В=5-45% за 7 мин; постепенно до 95% В до 9 мин; повторно уравнивали до конца. Время цикла 13 мин. Поток=1 мл/мин.

Общее количество R848 и пептида ova, присутствующих в наночастицах, было такое, как показано в табл. 1. Водную суспензию тестируемых синтетических наноносителей затем развели PBS до конечного объема исходного раствора 4,4 мл.

А) Измерение скорости высвобождения *in vitro* в PBS (pH 7,4).

Для образца T0 сразу удалили аликвоту 200 мкл из каждого образца NP и центрифугировали при 14000 об/мин в микроцентрифужных пробирках с помощью микроцентрифуги (модель: Galaxy 16). Удаляли 100 мкл супернатанта, развели до 200 мкл в подвижной фазе А (МРА) ВЭЖХ и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ova на обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для измерений в моменты времени: 9×200 мкл каждого из образцов добавили в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных), и добавили 300 мкл 37°C PBS к каждой из вышеупомянутых аликвот, и образцы немедленно поместили в 37°C термостат. В следующие моменты времени: 24, 48, 96 и 144 ч (для конъюгированного R848) или 2, 16 и 24 ч (для неконъюгированного (инкапсулированного) R848) образцы центрифугировали и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ova, как описано выше для образца T0.

В) Измерение скорости высвобождения *in vitro* в цитратном буфере (pH 4,5).

Для образца T0 удалили 200 мкл аликвоту из каждого образца и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин, и удалили супернатант. Остаточные наночастицы ресуспендировали в 200 мкл цитратного буфера и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Удалили 100 мкл супернатанта, развели до 200 мкл посредством МРА и проанализировали на R848 и пептид, как приведено выше.

Для измерений в моменты времени: 9×200 мкл каждого из образцов добавили в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированного) и центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин, и удалили супернатанты. Остаточные NP затем ресуспендировали в 500 мкл цитратного буфера и поместили в 37°C термостат. В следующие моменты времени: 24, 48, 96 и 144 ч (для конъюгированного R848) или 2, 16 и 24 ч (для неконъюгированного (инкапсулированного) R848) образцы центрифугировали и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ова, как описано выше для образца T0.

Для установления баланса масс из вышеуказанных измерений в PBS и цитратном буфере оставшиеся осадки (только образцы конъюгированного R848) из каждого образца обработали 200 мкл конц. NH₄OH (8 М) в течение 3 ч с перемешиванием. После осаждения смеси добавили 200 мкл 1% TFA с доведением общего объема осадка до 400 мкл. Аликвоту 50 мкл раствора развели МРА до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества R848 и пептида ова, которые остались в осадке после высвобождения *in vitro* для сведения баланса масс. Для неконъюгированных образцов разводят образец посредством TFA в ацетонитриле и анализируют, как описано выше для R848 и пептида.

Результаты подытожены на фиг. 1-3.

Таблица 1
Целевые составы с ковалентным R848

Состав	Загрузка R848*	Загрузка пептида ова	PLA-PEG-NIC	тип конъюгата PLA-R848**	PLA (15-20K, VI R202H)	Химия
1	E1, 5%	1, 1-2, 2%	25%		75%	
2	E1, 5%+	1, 1-2, 2%	25%		75%	
3	C75%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 1		Амин
4	C75%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 1		Амин
5	C75%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 5		ROP- выс. МВ
6	C75%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 5		ROP- низ. МВ
7	C50%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 5	25%	ROP- низ. МВ
8	C25%	0, 15-0, 31%	25%	Способ 5	50%	ROP- низ. МВ

*С - ковалентный R848;

Е - инкапсуляция R848.

Материалы и способ.

ВЭЖХ - Agilent 1100. $\lambda=215$ нм. Темп. колонки=40°C.

Колонка - Zorbax SB-C18 Agilent, 3,5 мкм. 75×4,6 мм (кат. № 866953-902).

C18 предколонка.

Подвижная фаза А (МРА) - 98% воды/2% ацетонитрила/0,1% TFA.

Подвижная фаза В (МРВ) - 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA.

Градиент: В=5-45% за 7 мин; постепенно до 95% В до 9 мин; повторно уравнивали до конца.

Время цикла - 13 мин. Поток=1 мл/мин.

PBS - 100 mM, pH 7,4.

Цитратный буфер - 100 mM, pH 4,5.

Термостат.

Микроцентрифуга - Galaxy 16.

Микроцентрифужные пробирки.

Ультразвуковой аппарат.

Пипетки - 20, 200, 1000 мкл, регулируемые,

вода класса "для ВЭЖХ" - EMD - №WX0008-I.

NH₄OH - ~8 М Mallinckrodt.

TFA, 0,2%. Пригот. 4/27/09.

TFA, 1%. Пригот. 5/13/09.

Термометр.

Образцы "6-1" и "6-2" имеют удерживаемый R848. Все остальные имеют конъюгированный R848. Оценочные значения основаны на результатах загрузки из "62" серии.

Таблица 2
Оценочные R848 и пептид ova в синтетических наноносителях

ИК образца	Оценочный R848 в NP (мкг/мл)	Оценочный ova в NP (мкг/мл)
1	54	146
2	166	184
3	119	32
4	114	34
5	465	37
6	315	34
7	116	40

Объемы образцов были слегка ниже, чем планировалось. Для обеспечения достаточного количества материала для всех моментов времени к образцам добавили следующие объемы PBS с доведением их всех до 4,4 мл.

Таблица 3

ИК образца	Объем образца (мл)	Объем добавленного PBS (мл)
1	4,35	0,05
2	4,23	0,17
3	4,21	0,19
4	4,20	0,20
5	4,21	0,19
6	4,19	0,21
7	4,20	0,20

Процедура.

1) Приготовление образца T=0.

a. PBS:

- i. Взять 200 мкл аликвоту из каждого образца. Центрифугировать на микроцентрифуге при 14000 об/мин. Удалить супернатант.
- ii. Развести 100 мкл >200 мкл супернатанта в МРА. (DF(фактор разведения)=2).
- iii. Проанализировать на пептид и R848.

b. Цитрат:

- i. Взять 200 мкл аликвоту из каждого образца. Центрифугировать на микроцентрифуге при 6000 об/мин в течение 20 мин. Удалить супернатант.
- ii. Добавить 200 мкл цитратного буфера и тщательно ресуспендировать.
- iii. Центрифугировать на микроцентрифуге при 14000 об/мин в течение 15 мин. Удалить супернатант.
- iv. Развести 100 мкл >200 мкл супернатанта в МРА. (DF=2).
- v. Проанализировать пептид и R848.

2) PBS IVR.

- a. Добавить 9×200 мкл каждого из образцов в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных).
- b. К каждой аликвоте добавить 300 мкл 37°C PBS.
- c. Образцы сразу поместить в 37°C термостат.

3) Цитрат IVR.

- a. Добавить 9×200 мкл каждого из образцов в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных).
- b. Центрифугировать 20 мин при 6000 об/мин.
- c. Удалить супернатанты.
- d. В каждую пробирку добавить 500 мкл цитратного буфера и тщательно ресуспендировать.
- e. Образцы поместить в 37°C термостат.

4) Для партий 1-4 и 8 забрать образцы (см. этап 6) в следующие моменты времени:

a. Конъюгированные:

- i. 24 ч.
- ii. 48 ч (2 суток).
- iii. 96 ч (4 суток).
- iv. 144 ч (6 суток).
- v. Дальнейшие моменты времени TBD следует определять на основе вышеприведенных данных.

b. Неконъюгированные:

- i. 2 ч.

ii. 16 ч.

iii. 24 ч.

5) Для партий 6 и 7 взять образцы в следующие моменты времени:

a. PBS:

i. 24 ч.

ii. 48 ч (2 суток).

iii. 96 ч (4 суток).

iv. 144 ч (6 суток).

v. Дальнейшие моменты времени TBD следует определять на основе вышеприведенных данных.

b. Цитрат:

i. 2 ч.

ii. 16 ч.

iii. 24 ч.

iv. 48 ч (2 суток).

v. 72 ч (3 суток).

vi. 96 ч (4 суток).

vii. 120 ч (5 суток).

viii. Дальнейшие моменты времени TBD следует определять на основе вышеприведенных данных.

6) Забор образца следующим образом:

a. Центрифугировать на микроцентрифуге при 14000 об/мин. в течение 15 мин.

b. Удалить супернатант.

c. Развести от 100 до 200 мкл в МРА. (DF=2).

7) Проанализировать на пептид и R848. Это даст количество, высвобождаемое в каждый момент времени.

Для сведения баланса масс выполнить следующее:

8) К оставшимся осадкам (только конъюгированным) добавить 200 мкл NH_4OH .

9) Немного крутить на вортекс-мешалке и обработать ультразвуком для диспергирования.

10) Добавить магнитную мешалку. Дать осесть до прозрачности (по меньшей мере 3 ч).

11) Добавить 200 мкл 1% TFA (общий объем осадка=400 мкл).

12) Развести 50 мкл-200 мкл в МРА. Проанализировать с помощью ВЭЖХ для определения пептида и R848, оставшихся в осадке. (DF=4).

13) Для неконъюгированных партий проанализировать пептид и R848 посредством обычного способа AcN/TFA .

Пример 36. Тестирование скорости высвобождения.

Высвобождение антигена (например, пептида ова, Т-клеточного антигена) и иммуностимулирующих средств (например, R848, CpG) из синтетических наноносителей в фосфатно-соляном буфере (PBS) (100 mM, pH 7,4) и цитратном буфере (100 mM, pH 4,5) при 37°C определяли следующим образом:

Высвобождение R848 из наноносителя, составленного из конъюгированного R848 и пептида ова, осуществили путем замены требуемого количества водной суспензии тестируемых синтетических наноносителей, полученных с производства (например, приблизительно 10 мг/мл в PBS), на такой же объем соответствующих сред для высвобождения (цитратный буфер, 100 mM) посредством центрифугирования и ресуспендирования.

Измерение скорости высвобождения *in vitro* в PBS (pH 7,4).

1 мл суспензии NC в PBS центрифугировали при 14000 об/мин в микроцентрифужных пробирках, в основном от 15 до 30 мин в зависимости от размера частиц. Собранный супернатант затем развели равным объемом подвижной фазы А (МРА) или водой и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ на предмет количества R848, высвобожденного при хранении. Оставшийся осадок ресуспендировали до однородной суспензии в 1 мл PBS и поместили в термокамеру при 37°C с постоянным легким помешиванием.

Для образца T0 сразу удалили аликвоты 150 мкл из суспензии NC перед тем, как поместить суспензию NC в термокамеру при 37°C, и центрифугировали при 14000 об/мин в микроцентрифужных пробирках с помощью микроцентрифуги (модель: Galaxy 16). Удалили 100 мкл супернатанта, развели до 200 мкл подвижной фазой А (МРА) ВЭЖХ или водой и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ова на обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для измерений в моменты времени удалили аликвоты 150 мкл из суспензии-образца NC 37°C, и образцы центрифугировали, и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ова тем же способом, что и для образца T0. Высвобожденные R848 и пептида ова тестировали в момент времени 6, 24 ч для обычного контроля с дополнительными моментами времени 2, 48, 96 и 144 ч для установления полного профиля высвобождения.

Измерение скорости высвобождения *in vitro* в цитратном буфере (pH 4,5).

Применили 100 mM буфер на основе цитрата натрия (pH 4,5) для замены исходного раствора для хранения NC (например, PBS) вместо PBS-буфера, pH 7,4. Для того чтобы свести баланс масс из выше-

приведенных измерений в PBS и цитратном буфере, оставшиеся осадки от каждого момента времени обработали 100 мкл NH_4OH (8 M) в течение 2 ч (или дольше) при перемешивании до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. 100 мкл 1% TFA добавили для нейтрализации смеси, что дало общий объем раствора осадка 200 мкл. Аликвоту 50 мкл смеси развели МРА (или водой) до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества высвобожденного R848, который остался в осадке после высвобождения *in vitro* для сведения баланса масс. Для несконъюгированных образцов образец разводят TFA в ацетонитриле и анализируют как описано выше для R848.

Высвобождение CpG определяли схожим образом как для измерения R848 и пептида ova с точки зрения приготовления образцов и контролируемых моментов времени. Тем не менее, количество CpG в средах для высвобождения оценивали с помощью способа обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанного выше.

Пример 37. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих адъювант CpG.

Группы из пяти мышей иммунизировали три раза (подкожно, в задние конечности) с 2-недельными интервалами (дни 0, 14 и 28) посредством 100 мг NC-Nic. NC-Nic представлял собой композицию наночастиц с находящимся на внешней поверхности никотином, и для всех групп мышей, за исключением группы 1, транспортирующий адъювант CpG-1826 (тиоатированный), который высвобождался из наночастиц с различными скоростями. Наночастицы получали в соответствии с приведенным выше способом. Затем измерили антитела к никотину сыворотки крови на 26 и 40 дни. EC_{50} для антител к никотину, как измерено в стандартном ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 4.

Мышам группы 1 вводили NC-Nic без CpG-1826, содержащие пептид ova и полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic. Мышам группы 2 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 3,2% CpG-1826; скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 4,2 мкг CpG на мг NC. Мышам группы 3 вводили NC-Nic, содержащие полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 3,1% CpG-1826; скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 15 мкг CpG на мг NC. Высвобождение определяли при pH 4,5.

Результаты, показанные на фиг. 4, демонстрируют, что удержание адъюванта в наночастицах является полезным для иммунного ответа на связанный с NC антиген, и, кроме того, что более высокая скорость высвобождения удерживаемого адъюванта CpG из наночастиц (NC) на момент времени 24 ч давала иммунный ответ, который был повышен по сравнению с ответом, индуцированным посредством NC с более низкой скоростью высвобождения адъюванта CpG (агонист TLR9).

Пример 38. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих две формы адъюванта CpG.

Группы из пяти мышей иммунизировали дважды (подкожно, в задние конечности) с 4-недельными интервалами (дни 0 и 28) посредством 100 мкг NC-Nic, а затем антитела к никотину сыворотки крови измеряли на 12, 24 и 40 дни. NC-Nic представлял собой композицию наночастиц с находящимся на внешней поверхности никотином и транспортирующий одну из двух форм адъюванта CpG-1826. Наночастицы получали в соответствии с приведенным выше способом. EC_{50} для антител к никотину, как измерено в стандартном ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 5.

Мышам группы 1 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 6,2% CpG-1826 (тиоатированный); скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 16,6 мкг CpG на мг NC. Мышам группы 2 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 7,2% CpG-1826 (тиоатированный); скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 13,2 мкг CpG на мг NC. Мышам группы 3 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 7,9% CpG-1826 (сложный фосфодиэфир или PO, нетиоатированный); скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 19,6 мкг CpG на мг NC. Мышам группы 4 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 8,5% CpG-1826 (PO, нетиоатированный); скорость высвобождения на момент времени 24 ч: 9,3 мкг CpG на мг NC. Высвобождение определяли при pH 4,5.

Результаты, показанные на фиг. 5, демонстрируют, что скорость высвобождения удерживаемого адъюванта (CpG, агонист TLR9) из наночастиц влияла на продуцирование антител к связанному с NC антигену (никотину), при этом наночастиль, проявлявший более высокую скорость высвобождения на момент времени 24 ч, индуцировал более сильный гуморальный иммунный ответ (группа 1 > группа 2 и группа 3 > группа 4). Это имело место независимо от использовавшейся формы CpG (более стабильный, тиаотированный или менее стабильный нетиоатированный).

Пример 39. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих R848.

Группы из пяти мышей иммунизировали трижды (подкожно, в задние конечности) с 2-недельными интервалами (дни 0, 14 и 28) посредством 100 мкг NC-Nic, а затем антитела к никотину сыворотки крови измеряли на 26, 40 и 54 дни. Наночастицы получали в соответствии с приведенным выше способом. EC_{50} для антител к никотину, как измерено в стандартном ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 6.

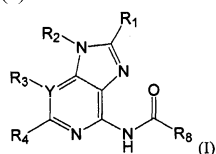
Мышам группы 1 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova и полимеры, 75% которых представляли

собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, но без адъюванта. Мышам группы 2 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 1,0% R848; из которого 92% высвобождается за 2 ч и более 96% высвобождается за 6 ч. Мышам группы 3 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA-R848, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 1,3% R848; из которого 29,4% высвобождается за 6 ч и 67,8% высвобождается за 24 ч. Мышам группы 4 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 75% которых представляли собой PLA-R848, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 1,4% R848; из которого 20,4% высвобождается за 6 ч и 41,5% высвобождается за 24 ч. Мышам группы 5 вводили NC-Nic, содержащие пептид ova, полимеры, 25% которых представляли собой PLA-PEG-R848, 50% PLA, и 25% представляли собой PLA-PEG-Nic, и 0,7% R848; из которого менее 1% высвобождается за 24 ч. Высвобождение определяли при pH 4,5.

Результаты, показанные на фиг. 6, демонстрируют, что адъювант R848 (агонист TLR 7/8), содержащийся в NC, увеличивает гуморальный иммунный ответ на связанный с NC антиген (группы 2-5>>группа 1). Более того, ни быстрое (группа 2), ни медленное (группа 5) высвобождение R848 не повышало иммунный ответ до такого же уровня, как NC, высвобождавшие R848 со средней скоростью (группа 3≈группа 4>группа 2≈группа 5).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение структурной формулы (I)



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено, где биоразлагаемый полимер или его элементарное звено включает сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид или их элементарное звено.

2. Соединение по п.1, где биоразлагаемый полимер или его элементарное звено включает поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер поли(гликолевой и молочной кислот) или поликапролактон или их элементарное звено.

3. Соединение по п.1, где R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер, содержащий сложный полиэфир, поликарбонат или полиамид.

4. Соединение по п.3, где биоразлагаемый включает полимер поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер поли(гликолевой и молочной кислот) или поликапролактон.

5. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из пп.1-4.

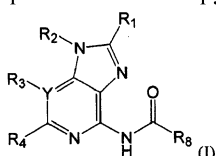
6. Синтетический наноноситель, который включает соединение по любому из пп.1-4.

7. Фармацевтическая композиция, включающая синтетический наноноситель по п.6.

8. Фармацевтическая композиция, включающая вакцину, которая содержит соединение по любому из пп.1-4.

9. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение соединения по любому из пп.1-4 субъекту.

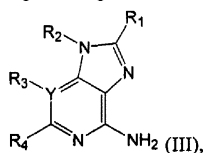
10. Способ получения конъюгата, который включает структуру формулы (I)



включающий

активацию биоразлагаемого полимера или его элементарного звена и

воздействие на активированный биоразлагаемый полимер или его элементарное звено и соединение структурной формулы (III) основанием и/или растворителем



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

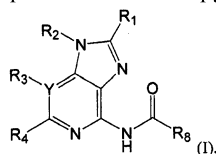
R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R₄ не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

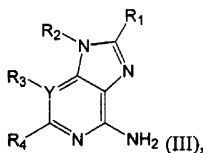
11. Способ по п.10, где R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер.

12. Способ получения конъюгата, который включает структуру формулы (I)



включающий

воздействие на композицию, включающую полимер или его элементарное звено и соединение структурной формулы (III), агентом сочетания и основанием и/или растворителем;



где R₁ - H, OH, SH, NH₂ или (C1-C4)алкил, замещенный (C1-C4)алкил, содержащий (C1-C3)алкокси; или (C1-C3)алкокси;

R₂ - H, (C1-C3)алкил или замещенный (C1-C3)алкил, содержащий метил, гидроксиль, фенил, или -NHSO₂CH₃;

Y - N или C;

R₃ отсутствует, если Y - N; или если Y - C, то R₃ представляет собой H, или R₃ объединен с R₄ с образованием 6-членного карбоцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;

R₄ представляет собой H или (C1-C5)алкил, (C1-C4)алкокси, или (C1-C4)алкиламино, или замещенный (C1-C4)алкиламино, содержащий фенил, когда R₄ не объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; или R₄ объединен с R₃ с образованием 6-членного карбоцикла; и

R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер или его элементарное звено.

13. Способ по п.12, где R₈ представляет собой биоразлагаемый полимер.

14. Соединение по любому из пп.1-4, где R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой изобутил, Y представляет собой C, и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены.

15. Соединение по любому из пп.1-4, где R₁ представляет собой этоксиметил, R₂ представляет собой гидроксизобутил, Y - C и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены.

16. Соединение по любому из пп.1-4, где R₁ представляет собой этоксиметил, R₂ представляет собой метансульфонамидоизобутил, Y - C и R₃ и R₄ объединены с образованием бензольного кольца с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены.

17. Соединение по любому из пп.1-4, где R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, Y - N, R₃ отсутствует и R₄ представляет собой бутокси.

18. Соединение по любому из пп.1-4, где Y представляет собой N, R₁ представляет собой OH, R₂ представляет собой бензил, R₃ отсутствует и R₄ представляет собой бутиламино.

19. Соединение по любому из пп.1-4, где Y представляет собой N, R₁ представляет собой OH, R₂

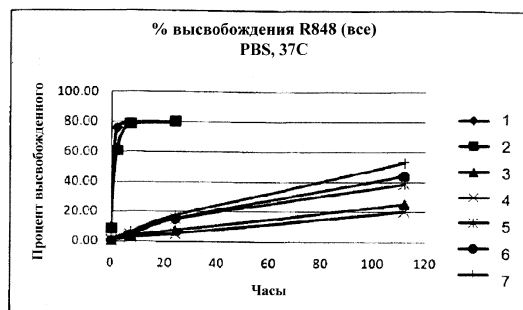
представляет собой бензил, R_3 отсутствует и R_4 представляет собой бутокси.

20. Соединение по любому из пп.1-4, где Y представляет собой N , R_1 представляет собой OH , R_2 представляет собой бензил, R_3 отсутствует и R_4 представляет собой бензиламино.

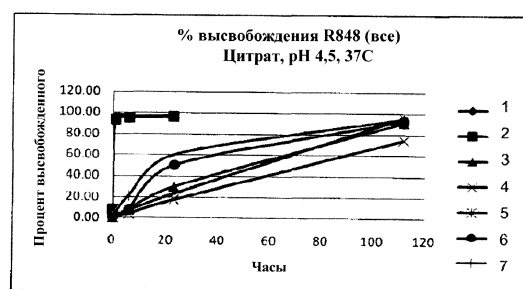
21. Соединение по любому из пп.1-4, где Y представляет собой N , R_1 представляет собой OH , R_2 представляет собой бензил, R_3 отсутствует и R_4 представляет собой пентил.

22. Соединение по любому из пп.1-4, где полимер является не растворимым в воде при pH 7,4 и при $25^\circ C$.

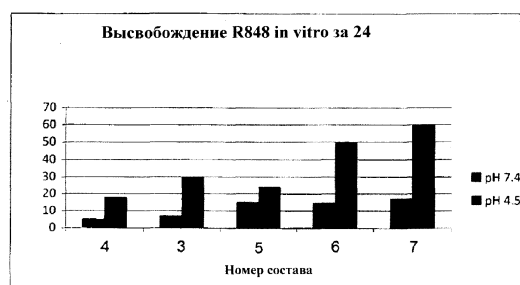
23. Соединение по любому из пп.1-4, где полимер имеет средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, как определено с помощью гелепроникающей хроматографии.



Фиг. 1



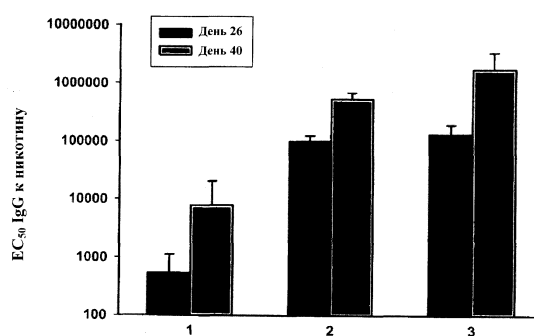
Фиг. 2



* Высвобождение при pH 4,5 было выше для каждого из вышеприведенных составов

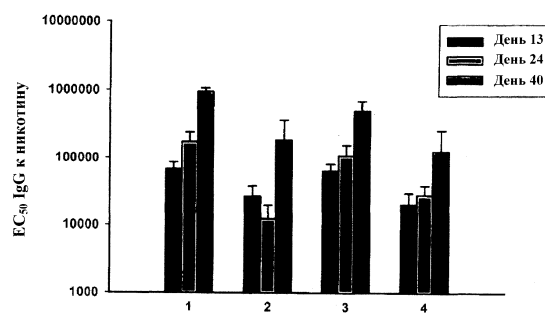
Фиг. 3

Индукция антител посредством NC ± CpG с различными скоростями высвобождения CpG



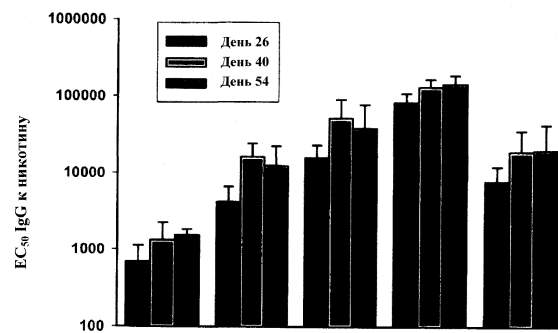
Фиг. 4

Индукция антител с помощью NC, высвобождающих две формы CrG с различными скоростями



Фиг. 5

Индукция антител с помощью NC, высвобождающих R848 с различными скоростями



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2