

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **027103**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.06.30

(21) Номер заявки
201391597

(22) Дата подачи заявки
2012.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/445* (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)

**(54) ТОЛЕРОГЕННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ НАНОНОСИТЕЛИ, УМЕНЬШАЮЩИЕ
ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ**

(31) 61/480,946; 61/513,514; 61/531,147;
61/531,153; 61/531,164; 61/531,168;
61/531,175; 61/531,180; 61/531,194;
61/531,204; 61/531,209; 61/531,215

(32) 2011.04.29; 2011.07.29; 2011.09.06;
2011.09.06; 2011.09.06; 2011.09.06;
2011.09.06; 2011.09.06; 2011.09.06;
2011.09.06; 2011.09.06; 2011.09.06

(33) US

(43) 2014.09.30

(86) PCT/US2012/035366

(87) WO 2012/149255 2012.11.01

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

(72) Изобретатель:
Фрейзер Кристофер, Кисимото Такаси
Кен, Мальдонадо Роберто А. (US)

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

(56) US-A1-20100129439
US-A1-20110020388
US-A1-20110070153
US-A1-20100055189
US-A1-20100068261

(57) В изобретении раскрыты композиции синтетических наноносителей и связанные с ними способы, включающие терапевтические белки-презентируемые APC антигены и иммунодепрессанты, которые обеспечивают толерогенные иммунные ответы, специфические в отношении терапевтических белков.

B1**027103****027103****B1**

Родственные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет по 35 U.S.C. §119 предварительной заявки на патент США 61/480946, поданной 29 апреля 2011 г., 61/513514, поданной 29 июля 2011 г., 61/531147, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531153, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531164, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531168, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531175, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531180, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531194, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531204, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531209, поданной 6 сентября 2011 г., 61/531215, поданной 6 сентября 2011 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылок.

Область изобретения

Данное изобретение относится к синтетическим композициям наноносителя с терапевтическими белками-презентируемыми (АРС) антигенами и иммунодепрессантами и родственными способам. Композиции и способы позволяют для эффективного обратного захвата антиген-презентирующими клетками повышать иммунный ответ в сторону развития толерогенного иммунного ответа, специфического к терапевтическим белкам. Композиции и способы, предоставленные в данном документе, можно, таким образом, использовать для вызова толерогенного иммунного ответа у субъекта, у которого лечение терапевтическим белком приводит или предположительно приведет к нежелательным иммунным ответам.

Предпосылки изобретения

Различные виды терапевтического лечения, такие как белковая или заместительная ферментная терапия, часто приводят к нежелательным иммунным ответам на отдельные терапевтические средства. В таких случаях клетки иммунной системы распознают терапевтическое средство как чужеродное и пытаются разрушить его, так же, как пытаются разрушить инфицирующие организмы, например бактерии и вирусы. Такие нежелательные иммунные ответы можно уменьшить, применяя иммунодепрессантные препараты. Конвенционные иммунодепрессантные препараты, однако, имеют широкий спектр действия. Кроме того, для поддержания иммунодепрессии терапия иммунодепрессантами обычно является пожизненной. К сожалению, использование иммунодепрессантов широкого спектра действия связано с риском возникновения серьезных побочных эффектов, таких как опухоли, инфекции, нефротоксичность и нарушения метаболизма. Соответственно полезным было бы появление новых видов терапии иммунодепрессантами.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте предоставлена композиция, содержащая: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных антигенами, презентруемыми терапевтическим белком АРС. В одном варианте осуществления первое и второе множество являются одним и тем же множеством. В другом варианте осуществления первое и второе множество являются различными множествами.

В другом варианте осуществления иммунодепрессанты содержат статин, ингибитор mTOR, TGF- β сигнальный агент, кортикостероид, ингибитор митохондриальной функции, ингибитор p38, NF- κ B ингибитор, агонист рецептора аденозина, агонист простагландина E2, ингибитор фосфодиэстеразы-4, ингибитор деацетилазы гистонов или ингибитор протеасомы. В другом варианте осуществления ингибитор mTOR является рапамицином или аналогом рапамицина.

В некоторых вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, предоставляются путем связывания терапевтического белка с синтетическими наноносителями. В других вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, предоставляются путем связывания полипептида или пептида, полученного или деривированного из терапевтического белка. В последующем варианте осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, содержат МНС класса I-рестриктированные и/или МНС класса II-рестриктированные эпитопы терапевтического белка и/или эпитопы В-клеток. В другом варианте осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, содержат МНС класса II-рестриктированные эпитопы терапевтического белка. В другом варианте осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, практически не содержат эпитопов терапевтического белка В-клеток. В другом варианте осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, содержат МНС II класс-рестриктированные эпитопы и практически не содержат эпитопов терапевтического белка В-клеток.

В одном варианте антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, содержат терапевтический протеин для замещения белка или белковой заместительной терапии или их фрагмент или производное. В другом варианте осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком АРС, содержат белок для инфузий или инъекций, фермент, кофактор фермента, гормон, кровь или фактор свертываемости крови, цитокин, интерферон, фактор роста, моноклональное антитело, поликлональное антитело или белок, связанный с болезнью Помпе, или фрагмент, или производное любого из вышеупомянутых веществ. В другом варианте осуществления терапевтический белок для инфузий или инъекций включает тоцилизумаб, альфа-1 антитрипсин, хематид, альбинтерферон альфа-2b, руцин, тезаморелин, окрелизумаб, белимумаб, пеглотиказу, талиглуцеразу альфа, агальцидазу альфа или велаглуцеразу альфа. В другом варианте осуществления фермент содержит оксидоредуктазу, трансферазу, гидролазу, лиа-

зу, изомеразу или лигазу. В другом варианте осуществления фермент содержит фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления. В другом варианте осуществления фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления содержит имиглюцеразу, а-галактозидазу А (a-gal А), агалсидазу бета, кислую а-глюкозидазу (GAA), алглюкозидазу альфа, умизим, миоим, арилсульфатазу В, ларонидазу, алдуразим, идурсульфазу, элапазу или наглазим. В другом варианте осуществления цитокин содержит лимфокин, интерлейкин, хемокин, цитокин типа 1 или цитокин типа 2. В другом варианте осуществления кровь и факторы свертывания крови содержат фактор I, фактор II, тканевой фактор, фактор V, фактор VII, F фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Ха, фактор XII, фактор XIII, фактор фон Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок С, белок S, белок Z, белок Z-зависимый протеазный ингибитор (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI1), ингибитор-2 активатора плазминогена (PAI2), раковый прокоагулянт или эпоэтин альфа. В другом варианте осуществления терапевтический белок экспрессируется в или на клетках клеточной терапии или их посредством.

В одном варианте осуществления композиция присутствует в эффективном количестве для вызова толерогенного иммунного ответа на терапевтические белки-презентируемые APC антигены, из которых получены или деривированы антигены. В другом варианте осуществления композиция находится в эффективном количестве для уменьшения образования антител, специфических к терапевтическому белку, который применяют для лечения субъекта.

В другом варианте осуществления нагрузка иммунодепрессантов и/или антигенов в среднем на первое и второе множество синтетических наноносителей находится в диапазоне между 0,0001 и 50%. В другом варианте осуществления нагрузка иммунодепрессантов и/или антигенов в среднем на первое и второе множество синтетических наноносителей находится в диапазоне между 0,1 и 10%.

В одном варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липидные наночастицы, полимерные эмульсии, металлические наночастицы, эмульсии на основе сурфактантов, дендримеры, бакиболлы, нанонити, вирусоподобные частицы или пептиды или частицы пептидов. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липидные наночастицы. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липосомы. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат металлические наночастицы. В последующем варианте осуществления металлические наночастицы содержат наночастицы золота. В последующем варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат полимерные наночастицы. В другом варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полимеры без концевой метоксигруппы, блок-сополимеры полиоксипропилена и полиоксипропилена. В последующем варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полиэстер, полиэстер, связанный с полиэфиром, полиаминокислоту, поликарбонат, полиацетат, поликеталь, полисахарид, полиэтилоксазолин или полиэтиленмин. В другом варианте осуществления полиэфир содержит поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер молочной и гликолевой кислот или поликапролактон. В другом варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полиэстер и полиэстер, связанный с полиэфиром. В другом варианте осуществления полиэфир содержит полиэтиленгликоль или полипропиленгликоль. В другом варианте осуществления среднее значение для распределения размеров частиц, полученного с помощью динамического рассеяния света, составляет более 100 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 150 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 200 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 250 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 300 нм.

В последующем варианте осуществления соотношение синтетических наноносителей первого и/или второго множества больше чем 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или 1:10.

В другом варианте осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

В другом аспекте предоставлена лекарственная форма, содержащая любые из упомянутых композиций.

В другом аспекте предоставлен способ, включающий лечение субъекта, которому вводили, вводят или будут вводить терапевтический белок, любыми упомянутыми композициями или лекарственными формами. В одном варианте осуществления способ помимо того содержит лечение субъекта терапевтическим белком. В другом варианте осуществления терапевтический белок применяют до, во время или после введения композиции или лекарственной формы. В другом варианте осуществления для субъекта применяют одну или больше поддерживающую дозу композиции или лекарственной формы.

В другом варианте осуществления способ, кроме того, включает оценку образования нежелательного иммунного ответа у субъекта до и/или после введения композиции или лекарственной формы и/или терапевтического белка. В одном варианте осуществления нежелательным иммунным ответом является создание антигенов, специфических к терапевтическому белку. В другом варианте осуществления нежелательный иммунный ответ является пролиферацией и/или активностью CD4+Т-клеток, специфической

к терапевтическому белку. В другом варианте осуществления нежелательный иммунный ответ является пролиферацией и/или активностью В-клеток, специфической к терапевтическому белку.

В одном варианте осуществления терапевтический белок содержит терапевтический белок, предназначенный для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии. В другом варианте осуществления терапевтический белок содержит терапевтический белок для инфузий или инъекций, фермент, кофактор фермента, гормон, кровь или фактор свертываемости крови, цитокин, интерферон, фактор роста, моноклональное антитело, поликлональное антитело или белок, связанный с болезнью Помпе, или фрагмент, или производное любого из вышеупомянутых веществ. В другом варианте осуществления терапевтический белок для инфузий или инъекций содержит тоцилизумаб, альфа-1 антитрипсин, хематид, альбинтерферон альфа-2b, рущин, тезаморелин, окрелизумаб, белимумаб, пеглотиказу, талиглуцеразу альфа, агальцидазу альфа или велаглуцеразу альфа. В другом варианте осуществления фермент содержит оксидоредуктазу, трансферазу, гидролазу, лиазу, изомеразу или лигазу. В другом варианте осуществления фермент содержит фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления. В другом варианте осуществления фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления содержит имиглюцеразу, а-галактозидазу А (a-gal A), агальцидазу бета, кислотную а-глюкозидазу (GAA), алглюкозидазу альфа, умизим, миозим, арилсульфатазу В, ларонидазу, альдуразим, идурсульфазу, элапазу или наглазим. В другом варианте осуществления цитокин содержит лимфокин, интерлейкин, хемокин, цитокин типа 1 или цитокин типа 2. В другом варианте осуществления кровь и факторы свертывания крови содержат фактор I, фактор II, тканевой фактор, фактор V, фактор VII, F фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Ха, фактор XII, фактор XIII, фактор фон Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок С, белок S, белок Z, белок Z-зависимый протеазный ингибитор (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI1), ингибитор-2 активатора плазминогена (PAI2), раковый прокоагулянт или эпоэтин альфа. В еще одном варианте осуществления терапевтический белок экспрессируется в клетках клеточной терапии, посредством их или на их поверхности.

В одном варианте осуществления введение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляется внутривенно, интраперитонеально, трансмукозально, орально, подкожным, пульмонально, интраназально, внутривожно или внутримышечно. В другом варианте осуществления введение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляется путем ингаляции или внутривенно, подкожно или трансмукозально.

В еще одном аспекте предоставлен способ, включающий введение пациенту композиции, содержащей: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с антигенами, презентруемыми терапевтическим белком APC, причем композиция вводится в эффективном количестве для уменьшения образования нежелательного иммунного ответа на терапевтические белки-презентируемые APC антигены. В еще одном аспекте предоставлен способ, включающий уменьшение вызова нежелательного иммунного ответа у субъекта при введении композиции, содержащей: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами. В еще одном аспекте предоставлен способ лечения субъекта композицией по указанному протоколу с целью уменьшить вызов нежелательного иммунного ответа на терапевтические белки-презентируемые APC антигены у одного или нескольких исследуемых субъектов; причем композиции содержат: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами. В одном варианте осуществления первое множество и второе множество являются одним и тем же множеством. В другом варианте осуществления первое множество и второе множество являются различными множествами.

В другом варианте осуществления способ, кроме того, включает обеспечение и идентификацию субъекта. В другом варианте осуществления способ, кроме того, содержит оценку нежелательного иммунного ответа у субъекта до и/или после введения композиции. В одном варианте осуществления нежелательный иммунный ответ является вызовом специфических антител к терапевтическому белку и/или пролиферацией и/или активностью CD4+Т-клеток, специфической к терапевтическому белку, и/или пролиферацией и/или активностью В-клеток, специфической к терапевтическому белку.

В другом варианте осуществления иммунодепрессанты включают статин, ингибитор mTOR, TGF-сигнальный агент-β, кортикостероид, ингибитор митохондриальной функции, ингибитор p38, NF-κβ ингибитор, агонист аденозинового рецептора, агонист простагландина E2, ингибитор фосфодиэстеразы-4, ингибитор деацетилазы гистонов или ингибитор протеасомы. В другом варианте осуществления ингибитором mTOR является рапамицин или аналог рапамицина.

В некоторых вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, предоставляются связыванием терапевтического белка с синтетическими наноносителями. В других вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, предоставляют свя-

занным с полипептидом или пептидом, полученным или деривированным из терапевтического белка. В последующем варианте осуществления антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, содержат МНС класса I-рестриктированные и МНС класса II-рестриктированные эпитопы терапевтического белка и/или эпитопы В-клеток. В другом варианте осуществления антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, содержат МНС класса II-рестриктированные эпитопы терапевтического белка. В другом варианте осуществления антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, практически не содержат эпитопов терапевтического белка В-клеток. В другом варианте осуществления антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, содержат МНС класса II-рестриктированные эпитопы терапевтического белка и практически не содержат эпитопов В-клеток.

В одном варианте осуществления терапевтический белок содержит терапевтический белок для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии. В другом варианте осуществления антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, содержат терапевтический белок для инфузий или инъекций, фермент, кофактор фермента, гормон, кровь или фактор свертываемости крови, цитокин, интерферон, фактор роста, моноклональное антитело, поликлональное антитело или белок, связанный с болезнью Помпе. В другом варианте осуществления терапевтический белок для инфузий или инъекций содержит тоцилизумаб, альфа-1 антитрипсин, хематид, альбинтерферон альфа-2b, руцин, тезаморелин, окрелизумаб, белимумаб, пеглотиказу, талиглюцеразу альфа, агальцидазу альфа или велаглюцеразу альфа. В другом варианте осуществления фермент содержит оксидоредуктазу, трансферазу, гидролазу, лиазу, изомеразу или лигазу. В другом варианте осуществления фермент содержит фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления. В другом варианте осуществления фермент для ферментной заместительной терапии лизосомной болезни накопления содержит имиглюцеразу, а-галактозидазу А (a-gal A), а-гальцидазу бета, кислую а-глюкозидазу (GAA), алглюкозидазу альфа, умизим, миоим, арилсульфатазу В, ларонидазу, альдуразим, идурсульфазу, элапразу или наглазим. В другом варианте осуществления цитокин содержит лимфокин, интерлейкин, хемокин, цитокин типа I или цитокин типа 2. В другом варианте осуществления кровь и факторы свертывания крови содержат фактор I, фактор II, тканевой фактор, фактор V, фактор VII, F фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Ха, фактор XII, фактор XIII, фактор фон Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок С, белок S, белок Z, белок Z-зависимый протеазный ингибитор (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI1), ингибитор-2 активатора плазминогена (PAI2), раковый прокоагулянт или эпоэтин альфа. В еще одном варианте осуществления терапевтический белок экспрессируется в клетках клеточной терапии, на их поверхности или посредством их.

В одном варианте осуществления композиция присутствует в эффективном количестве для уменьшения вызова антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации, и/или активности CD4+Т-клеток, специфической к терапевтическому белку, и/или пролиферации, и/или активности В-клеток, специфической к терапевтическому белку.

В другом варианте осуществления средняя нагрузка иммунодепрессантов и/или антигенов на первое и/или второе множество синтетических наноносителей находится в диапазоне от 0,0001 до 50%. В другом варианте осуществления средняя нагрузка иммунодепрессантов и/или антигенов на первое и/или второе множество синтетических наноносителей находится в диапазоне от 0,1 до 10%.

В одном варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липидные наночастицы, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе сурфактантов, дендримеры, бакиболлы, нанонити, вирусоподобные частицы или пептидные или белковые частицы. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липидные наночастицы. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат липосомы. В другом варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат металлические наночастицы. В последующем варианте осуществления металлические наночастицы содержат наночастицы золота. В последующем варианте осуществления синтетические наноносители первого и/или второго множества содержат полимерные наночастицы. В другом варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полимеры без концевой метоксигруппы, блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена. В еще одном варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полиэстер, полиэстер, связанный с полиэфиром, полиаминокислотой, поликарбонатом, полиацетатом, поликеталем, полисахаридом, полиэтилоксазолином или полиэтиленимином. В другом варианте осуществления полиэстер содержит поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер молочной и гликолевой кислот или поликапролактон. В другом варианте осуществления полимерные наночастицы содержат полиэстер и полиэстер, связанный с полиэстером. В другом варианте осуществления полиэфир содержит полиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

В другом варианте осуществления в дисперсный состав частиц, измеренный путем динамического рассеяния светом наночастиц первого и/или второго множества, входят частицы диаметром больше 100 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 150 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 200 нм. В другом варианте осуществления диаметр больше 250 нм. В другом варианте осу-

ществления диаметр больше 300 нм.

В последующем варианте осуществления соотношение синтетических наноносителей первого и/или второго множества больше чем 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или 1:10.

В последующем варианте осуществления композиция помимо того содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

В последующем варианте осуществления способ помимо того включает лечение субъекта терапевтическим белком. В одном варианте осуществления терапевтический белок применяют до, во время или после лечения композицией.

В другом варианте осуществления пациенту вводят одну или больше поддерживающих доз.

В другом варианте осуществления способ помимо того содержит оценку нежелательного иммунного ответа у субъекта до и/или после введения композиции и/или терапевтического белка. В другом варианте осуществления нежелательный иммунный ответ является вызовом антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферацией и/или активностью CD4+Т-клеток, специфической к терапевтическому белку, и/или пролиферацией и/или активностью В-клеток, специфической к терапевтическому белку.

В одном варианте осуществления введение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляется внутривенно, интраперитонеально, трансмукозально, орально, подкожным, пульмонально, интраназально, внутривожно или внутримышечно. В другом варианте осуществления введение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляется путем ингаляции или внутривенно, подкожно или трансмукозально.

В другом аспекте предоставляется способ, включающий: (i) производство первой популяции синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) производство второй популяции синтетических наноносителей, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами. В одном варианте осуществления первое множество и второе множества одинаковы. В другом варианте осуществления первое множество и второе множества различны. В другом варианте осуществления производимые первое и второе множества синтетических наноносителей такие, как описано где-либо в настоящем документе.

В одном варианте осуществления способ помимо того содержит производство лекарственной формы или композиции, содержащей первое и второе множества производимых синтетических наноносителей. В другом варианте осуществления способ помимо того содержит создание композиции, содержащей первое множество и второе множество синтетических наноносителей, или лекарственной формы, доступной для введения субъекту. В последующем варианте осуществления способ помимо того содержит оценку уменьшения нежелательного иммунного ответа при помощи композиции, содержащей первое множество и второе множество синтетических наноносителей. В одном варианте осуществления нежелательный иммунный ответ является вызовом антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферацией и/или активностью CD4+Т-клеток, специфической к терапевтическому белку, и/или пролиферацией В-клеток и/или их активностью, специфической к терапевтическому белку.

В еще одном аспекте предоставлен процесс производства композиции или лекарственной формы, содержащей: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с антигенами, презентруемыми терапевтическим белком APC, причем процесс включает этапы, как описано в любом из упомянутых в настоящем документе способов.

В другом аспекте предоставлена композиция или лекарственная форма, полученная при помощи любого из описанных в настоящем документе способа или процесса.

В другом аспекте любые из композиций или лекарственных форм, предоставленных в настоящем документе, могут быть использованы для терапии или профилактики.

В другом аспекте любые из представленных в настоящем документе композиций или лекарственных форм могут быть использованы как способ индуцирования толерогенного иммунного ответа на антигены терапевтического белка, клеточную терапию, белковую заместительную терапию, белковую дополнительную терапию или любой из способов, представленных в настоящем документе.

В другом аспекте предоставлено применение любых из указанных в данном документе композиций или лекарственных форм для производства лекарственного препарата, применяемого для индуцирования толерогенного иммунного ответа на антигены терапевтического белка, клеточную терапию, белковую заместительную терапию, белковую дополнительную терапию или любой из способов, представленных в настоящем документе.

В другом аспекте предоставлена лекарственная форма, содержащая любую из композиций, предоставленных в настоящем документе.

При некоторых способах исполнения любых из представленных в настоящем документе композиций или способов, представленные композиции вводят в целях профилактики на ранних стадиях иммунного ответа (например, на стадии иммуноглобулина М) и/или до формирования устойчивой анамнестической реакции и/или ответ иммуноглобулина G. При исполнении любых из представленных в настоя-

щем документе композиций или способов представленные композиции и способы могут уменьшать частоту реагирования эффекторов Т-клеток на антиген и/или их способность продуцировать провоспалительные цитокины. При других способах исполнения любых из представленных в настоящем документе композиций или способов представленные композиции и способы увеличивают количество депрессивных регуляторных Т- или В-клеток, уменьшающих частоту возникновения нежелательных иммунных ответов на терапевтический белок.

При исполнении любых из представленных в настоящем документе композиций или вариантов осуществления антигена белковой природы включают вышеупомянутые эпитопы и могут быть связаны с синтетическими наноносителями. В другом варианте осуществления полипептиды или пептиды, которые включают не только один или несколько вышеупомянутых эпитопов, но и дополнительные аминокислоты, которые находятся с одной или обеих сторон эпитопа(ов), могут связываться с синтетическими наноносителями. В другом варианте осуществлены эпитопы сами связаны с синтетическими наноносителями.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 Т-регуляторных клеток.

Фиг. 2 показано влияние изобретения, содержащего иммунодепрессант (рапамицин или симва- статин), на количество антиген-специфических эффекторов Т-клеток с синтетическими наноносителями (после однократной инъекции).

Фиг. 3 показано увеличение количества клеток в подколенных лимфатических узлах при применении синтетических наноносителей изобретения, содержащих иммунодепрессант (рапамицин или симва- статин) (после неоднократных инъекций).

Фиг. 4 IgG содержат иммунодепрессант рапамицин и антиген овальбумин.

Фиг. 5 содержат иммунодепрессант рапамицин и антиген овальбумин.

Фиг. 6 показано уменьшение уровня антиген-специфических иммуноглобулинов G при введении синтетических наноносителей, содержащих пептид овальбумина и иммунодепрессант рапамицин.

Фиг. 7 показано уменьшение количества антиген-специфических В-клеток при введении синтетических наноносителей, содержащих пептид овальбумина и иммунодепрессант рапамицин.

Фиг. 8 показано уменьшение количества CD4+Т-клеток в лаважных пробах животных моделей с астмой, которую лечили синтетическими наноносителями, содержащими пептид овальбумина и иммуно- депрессант.

Фиг. 9 показано уменьшение у животных моделей с астмой доли делящихся CD4+ Т-клеток в результате введения синтетических наноносителей, содержащих пептид овальбумина и иммунодепрессант рапамицин.

Подробное описание изобретения

Прежде чем давать подробное описание настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничено исключительно представленными материалами или показателями процесса, так как они, безусловно, могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология используется в настоящем документе в целях описания лишь отдельных вариантов осуществления, и использование альтернативной терминологии для описания настоящего изобретения не ограничено.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитированные в настоящем документе, а также ранее или позже, включены в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки для всех целей.

При упоминании в этой спецификации и прилагаемых пунктах формулы изобретения единственные формы предполагают множественные определяемые объекты, если только контекст явно не предполагает иное. Например, упоминание "полимер" содержит смесь двух или более одинаковых молекул или смесь молекул с разными молекулярными массами одного вида полимера, упоминание "синтетический наноноситель" относится к смеси двух или более таких синтетических наноносителей или совокупности таких синтетических наноносителей, упоминание "молекула ДНК" содержит смесь двух или более таких молекул ДНК или совокупность таких молекул ДНК, упоминание "иммунодепрессант" содержит смесь двух или более таких веществ или совокупность молекул иммунодепрессантов и тому подобное.

Применяемое в настоящем документе выражение "содержат" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", следует читать, как указывающие на включение любого упомянутого целого (например, признака, элемента, характеристики, свойства, этап способа/процесса или ограничение) или группы целых чисел (например, признаков, элемента, характеристик, свойств, этапов способа/процесса или ограничений), но не исключение любого другого целого или группы целых чисел. Таким образом, применяемое в настоящем документе выражение "содержащий" является включающим и не исключает дополнительные, неупомянутые целые или этапы способа/процесса.

В вариантах осуществления любых из приведенных в данном документе композиций и способов "содержащий" можно заменить на "по сути состоящий из" или "состоящий из". Фразу "по сути состоящий из" в данном документе применяют как предписывающую указанное(ые) целое(ые) или этапы, а также в существенной степени не влияющие на характер или функцию заявленного изобретения. Применяемое в настоящем документе выражение "состоящий" применяют для указания наличия только упомянутого целого (например, признака, элемента, характеристики, свойства, этапа способа/процесса или ог-

раничения) или группы целых (например, признаков, элемента, характеристик, свойств, этапов способа/процесса или ограничений).

А. Введение.

Как указано выше, современные конвенционные иммунодепрессанты имеют широкий спектр действия и обычно приводят к общей системной деактивации иммунной системы. Композиции и способы, представленные в настоящем документе, вызывают более направленные иммунные эффекты, например, делая возможной адресную доставку к иммунным клеткам-мишеням. Таким образом, композиции и способы помогают достичь иммунодепрессии более направленным способом. Обнаружено, что доставка иммунодепрессантов и антигенов, включающих МНС класса II-рестриктированные эпитопы, может значительно уменьшить выработку антиген-специфических антител, а также уменьшить образование антиген-специфических CD4+T-клеток и В-клеток. Поскольку подобные иммунные ответы могут быть желательными при противодействии нежелательным иммунным ответам, которые генерируются при терапии терапевтическими белками, и изобретение является полезным при стимуляции толерогенных иммунных ответов у тех субъектов, которые получали, получают или будут получать терапевтический белок, против которого уже возник или ожидается нежелательный иммунный ответ. Настоящее изобретение при некоторых вариантах осуществления предотвращает или подавляет нежелательные иммунные ответы, которые могут нейтрализовать положительный эффект определенных видов терапевтического введения.

Изобретатели неожиданно обнаружили, что проблемы и ограничения, упомянутые выше, можно разрешить, применяя изобретение, описанное в настоящем документе. В частности, изобретатели неожиданно обнаружили, что можно предложить синтетические наноносители и родственные методы для толерогенного иммунного ответа на терапевтические белки. Описанные в настоящем документе композиции включают композиции, содержащие: (i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с антигенами, презентуемыми терапевтическим белком APC.

В другом аспекте представлены лекарственные формы любой из композиций. Такие лекарственные формы могут быть использованы для введения субъекту в случае необходимости (например, при потребности в толерогенных иммунных ответах, специфических к терапевтическому белку). В одном способе субъектом является лицо, которое получало, получает или будет получать терапевтический белок, против которого генерируются или ожидаются нежелательные иммунные ответы.

С другой стороны, любую из предоставленных в настоящем документе композиций вводят пациенту. Композицию могут вводить в эффективном количестве для уменьшения вызова нежелательного иммунного ответа против одного или нескольких терапевтических белков. В одном способе композицию вводят пациенту согласно протоколу, описанному выше, чтобы уменьшить нежелательный иммунный ответ на терапевтические белки у одного или нескольких субъектов. Нежелательный иммунный ответ может представлять собой генерирование антител, специфических к терапевтическому белку, пролиферацию и/или активность CD4+T-клеток, или пролиферацию и/или активность В-клеток или их комбинации. Нежелательные иммунные ответы также могут являться вызовом других иммунных ответов исходя из вышеуказанного. В вариантах осуществления эффективные количества или протокол вызывают или, как было показано, вызвали желательные иммунные ответы. Такие иммунные ответы включают уменьшение любых эффектов или их комбинаций, упомянутых выше. Такие иммунные ответы включают любые толерогенные иммунные ответы, например, такие, как описано в настоящем документе.

Композиции могут вводить пациенту до, во время или после введения ему терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления композиции синтетических наноносителей вводят пациенту до формирования устойчивой анамнестической реакции. В некоторых вариантах осуществления предоставленные способы могут также включать введение терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления предоставленные композиции могут быть введены пациенту, который получал, получает или будет получать терапевтический белок, в количестве одной или нескольких поддерживающих доз. В таких вариантах осуществления предоставленные композиции вводят так, что нежелательный иммунный ответ уменьшается на протяжении определенного периода времени. Примеры подобных периодов времени приведены в настоящем документе.

В еще одном аспекте предоставлен способ получения (i) первого множества синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и (ii) второго множества синтетических наноносителей, связанных с антигенами, презентуемыми терапевтическим белком APC. В одном варианте осуществления способ помимо того включает создание лекарственной формы, содержащей первое или второе множество синтетических наноносителей.

Настоящее изобретение более детально будет описано ниже.

В. Определения.

"Введение" или "лечение" подразумевает предоставление вещества пациенту фармацевтически полезным способом.

"Эффективное количество" в контексте композиции или лекарственной формы или введения субъекту подразумевает такое количество композиции или лекарственной формы, которое вызывает один или несколько желательных иммунных ответов у субъекта, например вызов толерогенного иммунного ответа

(например, уменьшение пролиферации, активации, индукции, рекрутинга антиген-специфических CD4+T-клеток или антиген-специфических В-клеток или уменьшение выработки антиген-специфических антител). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество является любым количеством предоставленной в данном документе композиции, которое вызывает один или несколько таких желательных иммунных ответов. Это количество можно применять *in vitro* или *in vivo*. При введении *in vivo* количество может быть таким, что врач-клиницист может убедиться в его клиническом преимуществе для субъекта, который нуждается в антиген-специфической толеризации.

Эффективные количества могут включать только снижение уровня нежелательного иммунного ответа, хотя при некоторых способах они включают также и предотвращение нежелательного иммунного ответа. Эффективные количества могут также включать задержку возникновения нежелательного иммунного ответа. Количество, являющееся эффективным, также может являться таким количеством предоставленной в настоящем документе композиции, которое вызывает желательный терапевтический ожидаемый результат или желательный терапевтический результат. Эффективные количества преимущественно вызывают у субъекта в результате толерогенный иммунный ответ к антигену. Достижение любого из вышеупомянутых эффектов может быть отслежено с помощью распространенных методов.

В некоторых вариантах осуществления в любых из предоставленных композиций и способов эффективное количество является таким, при котором желательный иммунный ответ сохраняется у субъекта в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 5 лет или дольше. В других вариантах осуществления любой из предоставленных композиций и способов эффективное количество таково, что вызывает измеряемый желательный иммунный ответ, например измеряемое уменьшение иммунного ответа (например, к специфическому антигену), по меньшей мере на 1 неделю, по меньшей мере на 2 недели, по меньшей мере на 1 месяц, по меньшей мере на 2 месяца, по меньшей мере на 3 месяца, по меньшей мере на 4 месяца, по меньшей мере на 5 месяцев, по меньшей мере на 6 месяцев, по меньшей мере на 9 месяцев, по меньшей мере на 1 год, по меньшей мере на 2 года, по меньшей мере на 5 лет или больше.

Эффективные количества будут зависеть, конечно, от особенностей субъекта, получающего лечение; от серьезности состояния, болезни или нарушения; от индивидуальных показателей субъекта, таких как возраст, физическое состояние, рост и вес; от продолжительности введения, от природы одновременной терапии (если ее применяют); от специфического способа введения и подобных факторов, зависящих от знаний и опыта лечащего врача. Эти факторы широко известны в данной области и могут рассматриваться как обычный эксперимент. В целом предпочтительно, чтобы применялась максимальная доза, т. е. наивысшая безопасная доза, в соответствии с результатами тщательной медицинской оценки. Специалисты в данной области должны понимать однако, что пациент может настаивать на применении более низкой или приемлемой дозы по медицинским причинам или практически по любой другой причине.

В целом, дозы иммунодепрессантов и/или антигенов в композиции изобретения могут находиться в диапазоне от около 10 μ /кг до около 100 г/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 0,1 до около 100 мг/кг. В очередных вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 0,1 до около 25 мг/кг, от около 25 до около 50 мг/кг, от около 50 до около 75 мг/кг или от около 75 до около 100 мг/кг. Альтернативно, дозу можно вводить посредством ряда синтетических наноносителей, которые обеспечивают желательное количество иммунодепрессантов и/или антигенов. Например, полезные дозы включают количества больше чем 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} синтетических наноносителей на одну дозу. Другие примеры полезных доз включают значения в диапазоне от около 1×10^6 до около 1×10^{10} , от около 1×10^7 до около 1×10^9 или от около 1×10^8 до около 1×10^9 синтетических наноносителей на одну дозу.

"Антиген" означает антиген В-клетки или антиген Т-клетки. "Тип(ы) антигенов" подразумевает молекулы, имеющие одинаковые или практически одинаковые антигенные характеристики. В некоторых вариантах осуществления антигенами могут быть белки, полипептиды, пептиды, липопротеины и гликолипиды, полинуклеотиды, полисахариды, и они могут содержаться или экспрессироваться в клетках. В некоторых вариантах осуществления, например, когда антигены с трудом поддаются определению или характеристике, антигены могут находиться внутри клетки или препарата ткани, фрагментах клеток, экзосомах клеток, кондиционированных средах и так далее. Антиген может комбинироваться с синтетическими наноносителями в той же форме, которую вводят пациенту и которая вызывает нежелательный иммунный ответ, но может также быть ее частью или производным. В случае фрагмента или производного, однако, желаемый иммунный ответ на форму представленную таким субъектом является предпочтительным результатом с предусмотренными композициями и способами.

Термин "антиген-специфический" относится к любому иммунному ответу, который вызывает присутствие антигена или его части или который генерирует молекулы, специфически распознающие и связывающие антиген. Например, когда иммунный ответ является продуцированием антиген-специфических антител, образуются антитела, которые специфически связывают антиген. Другим при-

мером является иммунный ответ, при котором происходит пролиферация антиген-специфических В-клеток или CD4+ Т-клеток и/или их активность, причем пролиферация и/или активность вызвана распознаванием антигена или его части, одного или в комплексе с молекулами МНС, В-клетками и т. д.

"Оценка иммунного ответа" означает любое измерение или определение уровня, присутствия или отсутствия, уменьшения, увеличения и т. д. иммунного ответа *in vitro* или *in vivo*. Подобные измерения или определения могут быть произведены на одном или нескольких образцах, полученных от субъекта. Подобные измерения могут быть произведены любым из предоставленных в настоящем документе методов или другими, известными в данной области.

"Субъектом с повышенным риском" является такой пациент, в отношении которого лечащий врач уверен, что есть вероятность заболевания, нарушения или состояния, как описано в настоящем документе, или есть вероятность возникновения нежелательного иммунного ответа, как описано в настоящем документе.

"В среднем" в контексте настоящего документа относится к среднему арифметическому, если не указано другое.

"Антиген В-клетки" относится к любому антигену, который распознается В-клеткой и запускает в ней иммунный ответ (например, антиген, который специфически распознается В-клеткой или ее рецептором). В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки также является антигеном В-клетки. В других вариантах осуществления антиген Т-клетки не является антигеном В-клетки. Антигены В-клеток включают белки, пептиды и т. д., но не ограничены ими. В некоторых вариантах осуществления антиген В-клеток содержит небелковый антиген (т. е. небелковый и непептидный антиген).

"Одновременно" означает введение пациенту двух или больше веществ способом, который совпадает во времени предпочтительно в достаточном объеме, чтобы обеспечить модуляцию иммунного ответа. В вариантах осуществления одновременное введение может происходить путем введения двух или более веществ в одной и той же лекарственной форме. В других вариантах осуществления одновременное введение может включать введение двух или больше веществ в различных лекарственных формах в пределах определенного периода времени, предпочтительно в течение 1 месяца, предпочтительней в течение 1 недели, еще более предпочтительно в 1 день или еще лучше в течение 1 часа.

"Связь", или "связанные", или "связи" (и тому подобное) означает химически ассоциированные друг с другом в одну частицу (например, в функциональную группу). В некоторых вариантах осуществления связь является ковалентной, то есть связывание происходит в присутствии ковалентной связи между частицами. При нековалентных вариантах нековалентное связывание происходит посредством нековалентных взаимодействий, включающих взаимодействия зарядов, но не ограниченное ими, химическое сродство, металлокоординационные взаимодействия, физическую адсорбцию, взаимодействия типа "хозяин-гость", гидрофобные взаимодействия, ТТ стэкинг-взаимодействие, водородные связи, взаимодействия ван дер Ваальса, магнитные взаимодействия, электростатические взаимодействия, взаимодействия между диполями и/или комбинации вышеуказанного. В вариантах осуществления инкапсуляция является формой связывания.

"Деривированный" означает приготовленный из вещества или с использованием данных о веществе, но не "полученный" из вещества. Подобные вещества могут являться в значительной степени модифицированными или преобразованными формами веществ, полученных непосредственно из биологического материала. Такие вещества также могут включать вещества, полученные с использованием данных, связанных с биологическим материалом.

"Лекарственная форма" означает фармакологически и/или иммунологически активное вещество в посреднике, носителе, наполнителе или приспособлении, удобном для введения вещества пациенту.

"Инкапсулировать" означает заключать по меньшей мере часть вещества в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления осуществления вещество полностью в синтетическом наноносителе. В других способах осуществления большая часть или все вещество, которое инкапсулировано, не подвергается воздействию локального окружения, внешнего по отношению к синтетическому наноносителю. В других способах не более 50, 40, 30, 20, 10 или 5% (вес./вес.) выделяется в местную среду. Инкапсуляция отличается от абсорбции, при которой все вещество или его большая часть находится на поверхности синтетического наноносителя и остается снаружи синтетического наноносителя во внешней среде.

"Эпитоп", также известный как антигенная детерминанта, является частью антигена, которая распознается иммунной системой специфически, например, антителами, В-клетками или Т-клетками. В контексте настоящего документа "МНС класса I-рестриктированные эпитопы" являются эпитопами, которые презентуются иммунным клеткам молекулами МНС I класса, находящимися на клетках с ядрами. "МНС класса II-рестриктированные эпитопы" являются эпитопами, которые презентуются иммунным клеткам молекулами МНС II класса, находящимися на антиген-презентирующих клетках (АРС), например на профессиональных антиген-презентирующих иммунных клетках, таких как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки, или на негематопозитических клетках, таких как гепатоциты. "Эпитопы В-клеток" являются молекулярными структурами, которые распознаются антителами или В-клетками. В некоторых вариантах осуществления сам эпитоп является антигеном.

В данной области известны многие эпитопы и некоторые примеры эпитопов, соответствующих данному изобретению, содержат эпитопы, внесенные в списки базы данных иммунных эпитопов, но не ограничены ими (www.immuneepitope.org, Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D854-62; полный перечень которых, а также все статьи базы данных IEDB version 2.4, August 2011, и в особенности все эпитопы, упомянутые в настоящем документе, включены сюда посредством данной ссылки). Эпитопы также могут быть идентифицированы при помощи общедоступных методов, например описанных у Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund

O, Nielsen M, Peters B. 2010. peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules.

BMC Bioinformatics 2010, 11:568; Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B.

2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol.* 4(4):e1000048; Nielsen M, Lund O. 2009. NN-align.

An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics.* 10:296; Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. 2007. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method.

BMC Bioinformatics. 8:238; Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothé BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. *Immunogenetics.* 57:304-314; Sturniolo

T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.* 17(6):555-561; Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S,

Lund O. 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 12:1007-1017; Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothé BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics* 57:304-314; Peters B, Sette A. 2005. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics*

6:132; Chou PY, Fasman GD. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47:45-148; Emini EA, Hughes JV,

Perlow DS, Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836-839; Karplus PA, Schulz GE. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72:212-213; Kolaskar AS, Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS*

Lett 276:172-174; Parker JM, Guo D, Hodges RS. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25:5425-5432;

Larsen JE, Lund O, Nielsen M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes.

Immunome Res 2:2; Ponomarenko JV, Bourne PE. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct Biol* 7:64; Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein

3D structures. *Protein Sci* 15:2558-2567; Ponomarenko JV, Bui H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B. 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9:514; Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A,

Justesen S, Buus S, and Lund O. 2008. *PLoS Comput Biol.* 4(7)e1000107.

Количественные предсказания связывания пептидов с любой молекулой HLA-DR известной последовательности: NetMHCIIpan; полное содержание каждого из которых включено сюда посредством дан-

ной ссылки для описания способов или алгоритмов идентификации эпитопов.

"Вызов" означает стимуляцию действия, такого как иммунный ответ (т. е. толерогенный иммунный ответ), либо непосредственную, либо опосредованную, такую как при помощи третьей стороны, которая принимает действия с опорой на слова или поступки другого.

"Идентификация" является любым действием или комплексом действий, которые позволяют врачу-клиницисту определить, что пациент получит пользу от способов и композиций, предоставленных в настоящем документе. Предпочтительно идентифицированным субъектом является тот, кто нуждается в толерогенных иммунных ответах, предоставленных в данном документе. Действие или комплекс действий могут являться напрямую или косвенно, такими как, но не ограниченными, независимой третьей стороной, которая принимает действия с опорой на слова или поступки другого.

"Иммунодепрессант" означает соединение, которое вызывает у APC проявление иммунодепрессивного (т. е. толерогенного) эффекта. Иммунодепрессивный эффект обычно относится к продуцированию или проявлению цитокинеза или других факторов APC, которые уменьшают, ингибируют или предотвращают нежелательный иммунный ответ или которые вызывают желательный иммунный ответ. Когда APC оказывают иммунодепрессивный эффект на иммунные клетки, распознающие антиген, презентируемый APC, об иммунодепрессивном эффекте говорят, что он специфический к презентируемому антигену. Подобный эффект упоминается в настоящем документе как толерогенный эффект. Не привязываясь к какой-либо определенной теории считают, что иммунодепрессивный или толерогенный эффект является результатом доставки иммунодепрессанта к APC, предпочтительно в присутствии антигена (т. е. вносимого антигена или такого, который уже присутствует *in vivo*). Соответственно иммунодепрессант содержит соединения, которые обеспечивают толерогенный иммунный ответ на антиген, который может быть предоставлен или не предоставлен в одной и той же или иной композиции. В одном способе иммунодепрессант заставляет APC запускать регуляторный фенотип у одной или нескольких иммунных эффекторных клеток. Например, регуляторный фенотип может характеризоваться ингибированием продуцирования, вызова, стимуляции или рекрутинга антиген-специфических CD4+T-клеток или В-клеток, ингибированием образования антиген-специфических антител, образования, вызова, стимуляции или рекрутинга регуляторных Т-клеток (например, CD4+CD25highFoxP3+ регуляторных Т-клеток), и т. д. Это может быть результатом конверсии CD4+Т-клеток или В-клеток в регуляторный фенотип. Это также может быть результатом вызова FoxP3 в другие иммунные клетки, такие как CD8+Т-клетки, макрофаги и iNKT-клетки (нативные киллеры). В одном варианте осуществления иммунодепрессант является таким, который действует на ответ APC после того, как он обработал антиген. В другом варианте осуществления иммунодепрессант не влияет на обработку антигена. В последующем варианте осуществления иммунодепрессант не является сигнальной молекулой апоптоза. В другом способе иммунодепрессант не является фосфолипидом.

Иммунодепрессанты содержат, но не ограничиваются статинами; ингибиторами mTOR, такими как рапамицин или аналог рапамицина; сигнальными агентами TGF- β ; агонистами кортикостероидами TGF- β ; ингибиторами митохондриальной функции, например ротеноном; ингибиторами p38, NF- κ -B ингибиторы ингибиторами, например 6Bio, дексаметазоном, TCPA-1, IKK VII; агонистами рецептора аденозина, агонистами простагландина E2 (PGE2), например мизопростолом; ингибиторами фосфодиэстеразы, например ингибитором фосфодиэстеразы-4 (PDE4), таким как ролипрам; ингибиторами протеасомы; ингибиторами киназы; агонистами рецепторов, связанных с G-белком; антагонистами рецепторов, связанных с G-белком; глюкокортикоидами; ретиноидами; ингибиторами цитокинов; ингибиторами рецепторов цитокинов; активаторами рецепторов цитокинов; антагонистами рецепторов, активируемых пероксисомой; агонистами рецепторов, активируемых пролиферацией пероксисомы; ингибиторами деацетилазы гистонов; ингибиторами кальциневрина; ингибиторами фосфатазы; ингибиторами PI3KB, такими как TGX-221; ингибиторами автофагии, такими как 3-метиладенин; ингибиторами рецепторов арилгидрокарбона; ингибитором протеасомы I (PSI) и окисленными АТФ, такими как блокаторы рецептора P2X. Иммунодепрессанты также включают ИДО (изодецилоктилсульфат), витамин D3, циклоспорины, такие как циклоспорин А, ингибиторы рецептора арилгидрокарбона, ресвератрол, азатиопурин (Aza), 6-меркаптопурин (6-MP), 6-тиогуанин (6-TG), FK506, санглиферин А, сальмерерол, микофенолят мофетил (MMF), аспирин и другие ингибиторы ЦОГ (циклооксигеназы), нифлумовую кислоту, эстриол и триптолипид. При различных способах иммунодепрессант может содержать любой из названных агентов.

Иммунодепрессант может быть соединением, которое оказывает иммунодепрессивный (т. е. толерогенный) эффект на APC прямо или соединением, которое оказывает иммунодепрессивный (т. е. толерогенный) эффект опосредованно (т. е. будучи каким-либо образом обработанным после введения). Иммунодепрессанты, таким образом, включают неактивные формы лекарства любого из соединений, предоставленных в настоящем документе.

Иммунодепрессанты также включают нуклеиновые кислоты, которые кодируют пептиды, полипептиды или белки, предоставленные в настоящем документе, вызывающие иммунодепрессивный (т. е. толерогенный) иммунный ответ. В вариантах осуществления, таким образом, иммунодепрессант является нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид, полипептид или белок, который вызывает иммунодепрес-

сивный (т. е. толерогенный) иммунный ответ, и эта нуклеиновая кислота связана с синтетическим наноносителем.

Нуклеиновая кислота может являться ДНК или РНК, такой как мРНК. В вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат комплемент, например первичный комплемент, или вырожденный вариант (из-за вырождения генетического кода) любой из названных нуклеиновых кислот. В вариантах осуществления нуклеиновая кислота является экспрессирующим вектором, который может быть транскрибирован при перенесении в линию клеток. В вариантах осуществления экспрессирующий вектор может включать, кроме прочего, плазмиду, ретровирус или аденовирус. Нуклеиновые кислоты могут быть изолированы или синтезированы стандартными методами молекулярной биологии, методом ПНР (полимеразной цепной реакции) для получения фрагмента нуклеиновой кислоты, который затем очищают и клонируют в экспрессирующий вектор. Дополнительные методы, полезные в применении данного изобретения, можно найти в *Current Protocols in Molecular Biology 2007* by John Wiley and Sons, Inc.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)* Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Cold Spring Harbor.

При различных способах иммунодепрессанты, предоставленные в настоящем документе, связаны с синтетическими наноносителями. Предпочтительно иммунодепрессант также является составляющей, которая дополняет вещество, составляющее структуру синтетического наноносителя. Например, в одном варианте осуществления, где синтетический наноноситель состоит из одного или нескольких полимеров, иммунодепрессант является соединением, которое дополняет один или несколько полимеров и связывается ими. В качестве другого примера в одном варианте осуществления, где синтетический наноноситель состоит из одного или нескольких липидов, иммунодепрессант также является соединением, которое дополняет один или несколько полимеров и связывается ими. В вариантах осуществления, например, когда вещество синтетического наноносителя также вызывает иммунодепрессивный (т. е. толерогенный) эффект, иммунодепрессант является составляющей, дополняющей вещество синтетического наноносителя, что приводит к иммунодепрессивному (т. е. толерогенному) эффекту.

Другие примеры иммунодепрессантов включают синтетические препараты, природные вещества, антитела (т. е. антитела против CD20, CD3, CD4), биологические препараты, углеводные препараты, наночастицы, липосомы, РИНА, антисмысловые нуклеиновые кислоты, аптамеры, метотрексат, нестероидные противовоспалительные препараты; финголимод; натализумаб; алемтузумаб; анти-CD3; такролимус (FK506) и т. п., но не ограничиваются ими, помимо того иммунодепрессанты, известные в данной области, и в этом отношении данное изобретение не ограничено.

"Нагрузка" иммунодепрессанта или антигена APC, презентирующего терапевтический белок, является количеством иммунодепрессанта или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, связанным с синтетическим наноносителем, основанным на общей массе веществ на всем синтетическом наноносителе (вес./вес.). Как правило, нагрузка рассчитывается в среднем на популяцию синтетического наноносителя. В одном варианте осуществления средняя нагрузка иммунодепрессанта на первое множество синтетических наноносителей находится в диапазоне от 0,0001 до 50%. В другом варианте осуществления средняя нагрузка антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, на первое и/или второе множество синтетических наноносителей находится в диапазоне от 0,0001 до 50%. В другом варианте осуществления нагрузка иммунодепрессанта и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, находится в диапазоне от 0,01 до 20%. В последующем варианте осуществления нагрузка иммунодепрессанта и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, находится в диапазоне от 0,1 до 10%. В последующем варианте осуществления нагрузка на иммунодепрессант и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, находится в диапазоне от 1 до 10%. В другом варианте осуществления средняя нагрузка иммунодепрессанта и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, составляет по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,2%, по меньшей мере 0,3%, по меньшей мере 0,4%, по меньшей мере 0,5%, по меньшей мере 0,6%, по меньшей мере 0,7%, по меньшей мере 0,8%, по меньшей мере 0,9%, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19% или по меньшей мере 20% на популяцию синтетических наноносителей. В последующем варианте осуществления средняя нагрузка иммунодепрессанта и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, составляет 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% на популяцию синтетических наноносителей. При некоторых вышеуказанных вариантах осуществления средняя нагрузка иммунодепрессанта и/или антигена, презентиремого терапевтическим белком APC, составляет не более 25% на популяцию синтетических наноносителей. В разных вариантах осуществления нагрузку рассчитывали так, как описано в примерах.

При исполнении любых из предоставленных композиций и способов нагрузку рассчитывают следующим способом: Приблизительно 3 мг синтетических наноносителей центрифугируют, чтобы отде-

лить надосадочную жидкость от осадка синтетического наноносителя. В осадок добавляют ацетонитрил, обрабатывают образец ультразвуком и центрифугируют, чтобы отделить любую нерастворимую фракцию. Надосадочную жидкость и осадок исследуют методом обращенно-фазной хроматографии, при этом показатель оптической плотности составляет 278 нм. Микрограмм (мкг), обнаруженный в осадке, используют для подсчета процента захвата (нагрузки), мкг надосадочной жидкости и осадке используют, чтобы подсчитать общий уловленный мкг.

"Поддерживающая доза" относится к дозе, вводимой пациенту после того, как начальная доза вызвала иммунодепрессивный (т. е., толерогенный) ответ у субъекта, в целях поддержания желательного иммунодепрессивного (т. е., толерогенного) ответа. Поддерживающая доза, например, может быть такой, которая поддерживает толерогенный эффект, полученный после начальной дозы, предотвращает нежелательный иммунный ответ у субъекта или предотвращает отнесение субъекта к группе риска возникновения нежелательного иммунного ответа, включая нежелательный уровень иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления поддерживающая доза является достаточной для поддержания соответственного желательного иммунного ответа.

"Максимальный размер синтетического наноносителя" означает наибольший размер наноносителя, измеряемый вдоль любой оси синтетического наноносителя. "Минимальный размер синтетического наноносителя" означает наименьший размер синтетического наноносителя, измеряемый вдоль любой оси синтетического наноносителя. Например, для сферического синтетического наноносителя максимальный и минимальный размеры синтетического наноносителя будут практически одинаковыми и будут равны его диаметру. Соответственно для кубического синтетического наноносителя минимальный размер синтетического наноносителя будет наименьшим из значений его высоты, ширины или длины, а максимальный размер синтетического наноносителя будет наибольшим из значений 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 относительно общего количества синтетических наноносителей в образце равен или 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 относительно общего количества синтетических наноносителей в образце равен или меньше 5 $\mu\text{м}$. Предпочтительно минимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце относительно общего количества синтетических наноносителей в образце больше 110 нм, более предпочтительно больше 120 нм, более предпочтительно больше 130 нм и еще более предпочтительно больше 150 нм. Соотношение максимального и минимального размеров изобретенных синтетических наноносителей могут отличаться в зависимости от варианта осуществления изобретения. Например, соотношения максимального и минимального размеров синтетических наноносителей могут находиться в диапазоне от 1:1 до 1000000:1, предпочтительно от 1:1 до 100000:1, более предпочтительно от 1:1 до 10000:1, более предпочтительно от 1:1 до 1000:1, еще более предпочтительно от 1:1 до 100:1 и наиболее предпочтительно от 1:1 до 10:1. Предпочтительно максимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце по отношению к общему количеству синтетических наноносителей в образце равен или меньше 3 $\mu\text{м}$, более предпочтительно равен или меньше 2 $\mu\text{м}$, более предпочтительно равен или меньше 1 $\mu\text{м}$, более предпочтительно равен или меньше 800 нм, еще более предпочтительно равен или меньше 600 нм и наиболее предпочтительно равен или меньше 500 нм. В предпочтительных вариантах осуществления минимальный размер по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце по отношению к общему количеству 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 наиболее предпочтительно равен или больше 150 нм. Измерение размеров синтетического наноносителя (например, диаметра) производят путем суспендирования синтетических наноносителей в жидкой (обычно водной) среде с использованием динамического рассеяния света (DLS) (например, используя аппарат Brookhaven ZetaPALS). Например, суспензию синтетических наноносителей можно разбавить из водного буфера в очищенную воду до достижения конечной концентрации суспензии синтетических наноносителей приблизительно от 0,01 до 0,1 мг/мл. Разбавленную суспензию можно получить непосредственно внутри или перенести в подходящую кювету для DLS-анализа. Кювету затем помещают в DLS, приводят к контролируемой температуре, а затем проверяют на наличие достаточного времени для приобретения стабильного и воспроизводимого распределения на основе соответствующих входов для вязкости среды и индексы преломления образца. Затем регистрируют эффективный диаметр или среднее распределения. "Величина", или "размер", или "диаметр" синтетических наноносителей относится к среднему значению дисперсного состава частиц, полученному при динамическом рассеянии света.

"МНС" относится к главному комплексу гистосовместимости, большой области генома или семейству генов, обнаруженных у большинства позвоночных, кодирующим молекулы МНС, которые прояв-

ляют фрагменты или эпитопы процессируемых белков на поверхности клетки. Презентация МНС: пептид на поверхности клетки позволяет исследование иммунным клеткам, обычно Т-клеткам. Существуют два общих класса молекул МНС: класс I и класс II. Обычно молекулы МНС класса I находятся на поверхности клеток, содержащих ядра, и презентируют пептиды цитотоксическим Т-клеткам. Молекулы МНС класса II находятся на поверхности определенных иммунных клеток, преимущественно макрофагов, В-клеток и дендритных клеток, совокупность которых известна под названием профессиональные АРС. Наиболее известными генами области МНС являются гены подгруппы, кодирующие антиген-презентирующие белки на поверхности клеток. У человека эти гены называют антигенами лейкоцита человека (HLA).

"Не содержащий концевую метоксигруппу полимер" относится к полимеру, по меньшей мере один конец молекулы которого оканчивается группой, отличной от метоксильной группы. В некоторых вариантах осуществления у полимера есть по меньшей мере два конца молекулы, которые оканчиваются группой, отличной от метоксильной группы. В других вариантах осуществления ни один конец молекулы полимера не оканчивается метоксильной группой. "Неметокситерминированный плюроновый полимер" относится к любому полимеру, кроме линейного плюронового полимера, оба конца молекулы которого оканчиваются метоксильной группой. Полимерные наночастицы, как представлено в настоящем документе, включают не содержащие концевую метоксигруппу полимеры или не содержащие концевую метоксигруппу плюроновые полимеры.

"Полученный" означает взятый непосредственно из вещества и применяемый практически без модификации и/или обработки.

"Фармацевтически приемлемый наполнитель" означает фармакологически неактивный материал, применяемый вместе с указанными синтетическими наноносителями для составления композиций по настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемые наполнители включают ряд материалов, известных в настоящем уровне техники, в том числе без ограничения сахараиды (такие как глюкоза, лактоза и т. п.), консерванты, такие как противомикробные средства, восстанавливающие средства, окрашивающие средства, солевой раствор (такой как фосфатно-солевой буфер) и буферы.

"Протокол" относится к любому режиму дозирования одного или нескольких веществ, вводимых пациенту. Режим дозирования может включать количество, частоту и/или способ введения. В некоторых вариантах осуществления такой протокол может быть применен при введении одной или нескольких композиций по настоящему изобретению одному или нескольким испытуемым. Иммунные ответы у этих испытуемых могут в дальнейшем быть измерены, чтобы определить, был ли протокол эффективным для уменьшения нежелательного иммунного ответа или вызова желательного иммунного ответа (т. е. стимуляции толерогенного эффекта). Любой другой терапевтический и/или профилактический эффект также может быть измерен вместо упомянутых иммунных ответов или в дополнение к ним. Дал протокол желательный эффект или нет можно определить любыми способами, предоставленными в настоящем документе, или другими, известными в данной области. Например, можно получить популяцию клеток от субъекта, которого лечат предложенной в настоящем документе композицией в соответствии со специфическим протоколом, чтобы определить, произошли ли вызов, активация, уменьшение количества и т. п. специфических иммунных клеток, цитокинов, антител и т. п. Методы, пригодные для определения присутствия и/или количества иммунных клеток, включают проточные цитометрические методы (например, FACS) и иммуногистохимические методы, но не ограничены ими. Антитела и другие связывающие агенты для специфического окрашивания иммунных клеточных маркеров применяются в промышленных масштабах. Подобные комплекты, как правило, содержат окрашивающие реагенты для множественных антигенов, которые позволяют провести FACS-анализ, сепарацию и/или количественную оценку желательной популяции клеток из их гетерогенной популяции.

"Обеспечение субъекта" является любым действием или комплексом действий, которые позволяют врачу войти в контакт с субъектом и вводить ему композицию, предоставленную выше в настоящем документе, или применять способ, описанный выше в настоящем документе. Предпочтительно субъектом является лицо, которое нуждается в толерогенных иммунных ответах, предоставленных в настоящем документе. Действие или комплекс действий могут являться напрямую или косвенно, такими как, но не ограниченными, независимой третьей стороной, которая принимает действия с опорой на слова или поступки другого.

"Субъект" относится к животным, в том числе теплокровным животным, например человеку и приматам; птицам; домашним или сельскохозяйственным животным, например кошкам, собакам, овцам, козам, крупному рогатому скоту, лошадям и свиньям; лабораторным животным, например мышам, крысам и морским свинкам; рыбам; рептилиям; диким и живущим в зоопарках животным и т. п.

"Практически не содержит эпитопов В-клеток" означает отсутствие эпитопов В-клеток в количестве (самих клеток, в контексте антигена, связанных с носителем или в составе изобретенной композиции), достаточном для существенной активации ответа В-клеток. В вариантах осуществления композиция, практически не содержащая эпитопов В-клеток, не содержит заметного количества антигена эпитопов В-клеток. В других вариантах осуществления такая композиция может содержать заметное количество антигена эпитопов В-клеток, однако это количество неэффективно для заметного иммунного ответа В-

клеток (самих клеток, в контексте антигена, связанных с носителем или в составе изобретенной композиции), такого как образование антиген-специфических антител или пролиферации антиген-специфических В-клеток и/или их активности, или неэффективно для вызова заметного измеримого иммунного ответа В-клеток (самих клеток, в контексте антигена, связанных с носителем или в составе изобретенной композиции). В некоторых вариантах осуществления заметный измеримый иммунный ответ В-клеток является таким, который вызывает или, вероятно, вызовет побочный эффект у субъекта. В других вариантах осуществления заметный измеримый иммунный ответ В-клеток имеет более высокий уровень такого же типа иммунного ответа (т. е. образование антиген-специфических антител или пролиферация антиген-специфических В-клеток и/или их активность), возникающего под контролем антигена (т. е. такого, который не содержит антигены эпитопов В-клеток или не стимулирует иммунные ответы В-клеток). В некоторых вариантах осуществления заметный измеримый иммунный ответ В-клеток, например измерение титра антитела (например, с помощью ELISA), является 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 6-кратным, 7-кратным, 8-кратным, 9-кратным, 10-кратным, 15-кратным, 20-кратным или более многократным, чем аналогичный ответ, продуцированный в контроле (например, при контрольном антигене). В других вариантах осуществления композиции, практически не содержащая эпитопов В-клеток, вызывает появление небольшого титра антиген-специфических антител или не вызывает его появления вообще (самих клеток в контексте антигена, связанных с носителем, или в составе изобретенной композиции). Такие композиции включают композиции, вызывающие титр антитела (как значение ЕС₅₀) меньше 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20 или 10. В других вариантах осуществления заметный измеримый иммунный ответ В-клеток экспрессируется при таком уровне количества или пролиферации В-клеток, который составляет 10, 25, 50, 100% или 2-кратен, 3-кратен, 4-кратен, 5-кратен, 6-кратен, 7-кратен, 8-кратен, 9-кратен, 10-кратен, 15-кратен, 20-кратен или более многократен по сравнению с аналогичным ответом в контроле. Другие способы измерения ответов В-клеток известны специалистам в данной области.

В вариантах осуществления, чтобы убедиться в том, что композиция практически не содержит эпитопов В-клеток, антигены выбирают таким образом, что они не содержат эпитопов В-клеток, связанных с синтетическими наноносителями, представленными в настоящем документе. В других вариантах осуществления, чтобы убедиться в том, что композиция практически не содержит антигенов эпитопов В-клеток, синтетические наноносители, связанные с антигеном, производят и тестируют на иммунные ответы В-клеток (например, продукцию антиген-специфических антител, пролиферацию и/или активность В-клеток). Композиции, обладающие желательными свойствами, в дальнейшем могут отбирать.

"Синтетический(ие) наноноситель(и)" относится к отвлеченному объекту, не существующему в природе, который обладает по меньшей мере одним измерением, размер которого меньше или равен 5 мкм. Наночастицы альбумина, как правило, добавляют в качестве синтетического наноносителя, однако при некоторых способах синтетические наноносители не включают наночастицы альбумина. В вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители не включают хитозан. В других вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители не включают липидные наночастицы. В других вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители не включают фосфолипид.

А синтетический наноноситель может являться одной основанной на липидах наночастицей (также упоминаемой в настоящем документе как липидная наночастица, т. е. большая часть составляющего ее вещества является липидом) или их совокупностью, полимерными наночастицами, металлическими наночастицами, эмульсиями на основе сурфактантов, дендримерами, бакиболлами, нанонитями, вирусоподобными частицами (т. е. частицами, основой строения которых являются вирусные белки, но которые не являются инфекционными или имеют низкую инфекционность), пептидными или основанными на белках частицами (также упоминаемыми в настоящем документе как белковые частицы, т. е. частицы, большая часть составляющего вещества которых является пептидами или белками) (такие как наночастицы альбумина) и/или наночастицами, разработанными из совокупности наноматериалов, например липидно-полимерные частицы, но не ограничиваются ими. Синтетические наноносители могут иметь различные формы, в том числе сферическую, кубическую, пирамидальную, вытянутую, цилиндрическую, тороидальную и другие, но не ограничены ими. Синтетические наноносители в соответствии с изобретением имеют одну или несколько поверхностей. Например, синтетические наноносители, которые могут быть адаптированы для применения в практике настоящего изобретения, включают: (1) био-разлагаемые наночастицы, как раскрыто в патенте США 5543158, Gref et al., (2) полимерные наночастицы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20060002852, Saltzman et al., (3) наночастицы, конструируемые литографским способом, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20090028910, DeSimone et al., (4) раскрытие сущности изобретения WO 2009051837, von Andrian et al., (5) наночастицы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20080145441, Penades et al., (6) белковые наночастицы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20090226525, de los Rios et al., (7) вирусоподобные частицы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20060222652, Sebbel et al., (8) связанные с нуклеиновой кислотой вирусоподобные частицы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20060251677, Bachmann et al., (9) вирусоподобные частицы, как описано в

WO 2010047839A1 или WO 2009106999A2, (10) нанопреципитированные наночастицы, как раскрыто в P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010), или (11) апоптотические клетки, апоптозные тельца или синтетические или полусинтетические имитаторы, как раскрыто в опубликованной заявке на патент США 20020086049. При различных способах синтетические наноносители могут находиться в соотношении больше чем 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или больше чем 1:10.

Синтетические наноносители в соответствии с изобретением, имеющие минимальный размер, равный или меньший около 100 нм, предпочтительно равный или меньший 100 нм, не содержат поверхности с гидроксильными группами, активирующими комплемент, или альтернативно, содержат поверхность, которая состоит в основном из групп, активирующих комплемент, но не являющихся гидроксильными группами. При предпочтительном способе исполнения синтетические наноносители в соответствии с изобретением, минимальный размер которых равен или меньше около 100 нм, предпочтительно равен или меньше 100 нм, не содержат поверхность, которая в значительной степени активирует комплемент, или альтернативно, содержат поверхность, которая состоит преимущественно из групп, которые не активируют комплемент в значительной степени. Более желательно, чтобы синтетические наноносители в соответствии с изобретением, имеющие минимальный размер, равный или меньший около 100 нм, предпочтительно равный или меньший 100 нм, не содержали поверхность, активирующую комплемент, или альтернативно, содержали поверхность, состоящую преимущественно из групп, которые не активируют комплемент. В вариантах осуществления синтетические наноносители не включают вирусоподобные частицы. При различных способах синтетические наноносители могут находиться в соотношении, большем чем 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или 1:10.

"Антиген Т-клетки" означает антиген CD4+Т-клетки или антиген CD8+Т-клетки. "Антиген CD4+Т-клетки" означает любой антиген, который распознается CD4+Т-клетками и запускает их иммунный ответ, т. е. антиген, который специфически распознается рецептором Т-клетки на поверхности CD4+Т-клетки путем презентации антигена или его части молекулой главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС). "Антиген CD8+Т-клетки" означает любой антиген, который распознается CD8+Т-клетками и запускает их иммунный ответ, т. е. антиген, который специфически распознается рецептором Т-клетки на поверхности CD8+Т-клетки путем презентации антигена или его части молекулой главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС). В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки одновременно является антигеном В-клетки. В других вариантах осуществления антиген Т-клетки не является одновременно антигеном В-клетки. Антигены Т-клетки обычно являются белкам и или пептидами.

"Терапевтический белок" относится к любому белку или белковой заместительной терапии, применяемой к субъекту и имеющей терапевтический эффект. Такие виды терапии включают белковую заместительную и белковую дополнительную терапию. Такие виды терапии также включают введение экзогенного или чужеродного белка, применение различных видов терапии антителами и клеточной терапии. Терапевтические белки включают ферменты, кофакторы ферментов, гормоны, факторы свертываемости крови, цитокин, факторы роста, моноклональные антитела и поликлональные антитела. Примеры других терапевтических белков приведены в тексте настоящего документа. Терапевтические белки могут быть образованы в клетках, на их поверхности или их посредством и получены из таких клеток и введены в форме таких клеток. В вариантах осуществления терапевтический белок образуется в клетках млекопитающих, насекомых, дрожжей, бактерий, растений, трансгенных животных клеток, трансгенных растительных клеток, на их поверхности или их посредством, и т. д. Терапевтический белок может рекомбинантно образовываться в подобных клетках. Терапевтический белок может образовываться в трансформированной вирусом клетке, на ее поверхности или посредством ее. Терапевтический белок также может образовываться в аутологических клетках, трансфицированных, трансдуцированных или измененных иным способом, на их поверхности или посредством. Альтернативно, терапевтический белок может быть введен в виде нуклеиновой кислоты или путем внесения нуклеиновой кислоты в вирус, вирусоподобную частицу, липосому и т. д. Альтернативно, терапевтический белок можно получить из таких форм и ввести как собственно терапевтический белок. Субъекты, таким образом, включают любой субъект, который получал, получает или будет получать что-либо из вышеупомянутого. Такой субъект содержит субъекты, которые получали, получают или будут получать генную терапию, аутологические клетки, трансфицированные, трансдуцированные или измененные иным способом, чтобы экспрессировать терапевтический белок, полипептид или пептид; или клетки, экспрессирующие терапевтический белок, полипептид или пептид.

"Антигены, презентруемые терапевтическим белком APC" означает антиген, связанный с терапевтическим белком (т. е. терапевтическим белком или его фрагментом, который может генерировать иммунный ответ на терапевтический белок (т. е. образование антител, специфических к терапевтическому белку)). Как правило, антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, могут быть представлены для распознавания иммунной системой (т. е. клетками иммунной системы, такими как антиген-презентирующими клетками, включая дендритные клетки, В-клетки или макрофаги, но не ограничиваясь ими), антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, могут быть презентрованы или распо-

знаны, например, Т-клетками. Такие антигены могут быть распознаны Т-клетками и запустить их иммунный ответ путем презентации эпитопа антигена молекулы МНС класса I или II. Антигены, презентируемые терапевтическим белком APC, как правило, включают белки, полипептиды, пептиды, липобелки и содержатся или экспрессируются в клетках, на них или их посредством. Антигены терапевтических белков при некоторых способах связаны с синтетическими наноносителями и включают МНС класса I-рестриктированные и/или МНС класса II-рестриктированные эпитопы и/или эпитопы В-клеток. В других вариантах осуществления антигены не включают эпитопы В-клеток, как, например, когда присоединение эпитопов В-клеток обостряет нежелательный иммунный ответ. В других вариантах осуществления антигены включают МНС класса II-рестриктированные эпитопы и преимущественно не содержат эпитопов В-клеток. Предпочтительно, чтобы один или несколько толерогенных иммунных ответов, специфических к терапевтическому белку, были вызваны представленной в настоящем документе композицией.

"Толерогенный иммунный ответ" означает любой иммунный ответ, ведущий к иммунодепрессии, специфической к антигену или клетке, ткани, органу и другому, экспрессирующему этот антиген. Такие иммунные ответы включают уменьшение, задержку или ингибирование нежелательного иммунного ответа, специфического к антигену или клетке, ткани, органу и другому, экспрессирующему этот антиген. Такие иммунные ответы также включают любую стимуляцию, продукцию, индукцию, стимулирование или рекрутинг желательного иммунного ответа, специфического к антигену или клетке, ткани, органу и другому, экспрессирующему этот антиген. Толерогенные иммунные ответы, таким образом, включают отсутствие или уменьшение нежелательного иммунного ответа на антиген, которые могут происходить посредством участия антиген-реактивных клеток, а также в присутствии или стимуляции депрессивных клеток. Толерогенные иммунные ответы, как показано в настоящем документе, включают иммунологическую толерантность. "Генерировать толерогенный иммунный ответ" относится к вызову любого из вышеупомянутых иммунных ответов, специфических к антигену или клетке, ткани, органу и подобному, экспрессирующему такой антиген.

Толерогенный иммунный ответ может являться результатом презентирования главному комплексу гистосовместимости класса I и/или главному комплексу гистосовместимости класса II и/или презентирования В-клеткам и/или презентирования CD1d и т. д.

Толерогенные иммунные ответы включают любое уменьшение, задержку или ингибирование пролиферации и/или активности CD4+Т-клеток, CD8+Т-клеток или В-клеток. Толерогенные иммунные ответы также включают уменьшение продукции антиген-специфических антител. Толерогенные иммунные ответы также могут включать любой ответ, ведущий к стимуляции, индукции, продукции или рекрутингу регуляторных клеток, например CD4+Т-регуляторных клеток, CD8+Т-регуляторных клеток, В-регуляторных клеток и т. д. В некоторых вариантах осуществления толерогенный иммунный ответ приводит к обращению в регуляторный фенотип, характеризующийся продукцией, индукцией, стимуляцией или рекрутингом регуляторных клеток.

Толерогенные иммунные ответы также включают любой ответ, ведущий к стимуляции, продукции или рекрутингу CD4+Т-регуляторных клеток или CD8+Т-регуляторных клеток. CD4+Т-регуляторные клетки могут экспрессировать фактор транскрипции FoxP3 и ингибировать воспалительные ответы или аутоиммунные воспалительные заболевания (Human regulatory T cells in autoimmune diseases. Cvetanovich GL, Hafler DA. *Curr Opin Immunol.* 2010 Dec; 22(6):753-60. Regulatory T cells and autoimmunity. Vila J., Isaacs J.D., Anderson A.E. *Curr Opin Hematol.* 2009 Jul;16(4):274-9). Такие клетки также подавляют помощь Т-клеток В-клеткам и индуцируют толерантность как к собственным, так и к чужеродным антигенам (Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. Miyara M., Wing K., Sakaguchi S. J. *Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):749-55). CD4+Т-регуляторные клетки распознают антиген, когда он презентируется белкам и класса II на APC. CD8+Т-регуляторные клетки, распознающие антиген, презентируемый классом I (и Qa-1), могут также подавлять помощь Т-клеток В-клеткам и приводить к активации антиген-специфической депрессии, вызывающей толерантность как к собственным, так и к чужеродным антигенам. Нарушение взаимодействия между Qa-1 и CD8+Т-регуляторными клетками, как было показано, разрегулирует иммунные ответы и приводит к развитию воспаления, обусловленного аутоантителом, и аутоиммунной летальной системной красной волчанки (Kim et al., *Nature.* 2010 Sep 16, 467 (7313): 328-32). CD8+Т-регуляторные клетки также, как было показано, ингибируют модели аутоиммунных воспалительных заболеваний, включая ревматоидный артрит и колит (CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. Oh S., Rankin A.L., Caton A.J. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):97-111. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. Boden EK, Snapper SB. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Nov;24(6):733-41). В некоторых вариантах осуществления предоставленные композиции могут эффективно вызывать оба типа ответов (CD4+Т-регуляторные клетки и CD8+Т-регуляторные клетки). В других вариантах осуществления FoxP3 может быть индуцирован в других иммунных клетках, таких как макрофаги, iNKT и др., и предоставленные композиции также могут вызывать один или несколько подобных ответов.

Толерогенные иммунные ответы также включают индукцию регуляторных кининов, например, Т-регуляторных цитокинов; индукцию ингибиторных цитокинов; ингибирование воспалительных цитокинов (например, IL-4, IL-1b, IL-5, TNF- α , IL-6, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22,

IL-23, M-CSF, реактивного белка С, белка острой фазы, хемокинов (например, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIG, ITAC или IP-10), продукцию противовоспалительных цитокинов (например, IL-4, IL-13, IL-10 и др.), хемокинов (например, CCL-2, CXCL8), протеаз (например, MMP-3, MMP-9), лейкотриенов (например, CysLT-1, CysLT-2), простагландинов (например, PGE2) или гистаминов; ингибирование поляризации иммунного ответа на Th17, Th1 или Th2; ингибирование эффекторных клеткоспецифических цитокинов: Th17 (например, IL-17, IL-25), Th1 (IFN- γ), Th2 (например, IL-4, IL-13); ингибирование Th1-, Th2- или Th17-специфических факторов транскрипции; ингибирование пролиферации эффекторных Т-клеток; индукцию апоптоза эффекторных Т-клеток; индукцию генов, специфических для толерогенных дендритных клеток, индукцию экспрессии FoxP3, ингибирование индукции IgE или IgE-опосредованных иммунных ответов, ингибирование гуморальных иммунных ответов (например, образование антиген-специфических антител); ингибирование клеточного ответа при участии Т-хелперов; образование TGF- β и/или IL-10; ингибирование эффекторной функции аутоантител (например, ингибирование элиминации клеток, повреждения клетки или ткани или активации комплемента) и т. д.

Любой из вышеперечисленных эффектов может быть измерен *in vivo* на одной или нескольких животных моделях или может быть измерен *in vitro*. Специалисту в данной области известны подобные измерения *in vivo* или *in vitro*. Нежелательные иммунные ответы или толерогенные иммунные ответы могут быть отслежены, например, при помощи методов измерения количества и/или функций иммунных клеток, тетрамерного анализа, ELISPOT, проточного цитометрического анализа экспрессии цитокина, секреции цитокина, анализа сывороточного спектра цитокина, анализа спектра экспрессии гена, анализа спектра белка, анализа маркеров поверхности клетки, ПЦР-определение использования гена рецепторами иммунной клетки (см. T. Clay et al., "Assays for Monitoring Cellular Immune Response to Active Immunotherapy of Cancer" *Clinical Cancer Research* 7:1127-1135 (2001)) и т. д. Нежелательные иммунные ответы или толерогенные иммунные ответы могут также быть отслежены, например, при помощи методов измерения уровней белка в плазме или сыворотке, пролиферации иммунных клеток и/или функционального анализа и т. д. В некоторых вариантах осуществления толерогенные иммунные ответы могут быть отслежены при помощи оценки индукции FoxP3. Кроме того, в примерах более детально описаны специфические методы.

Предпочтительно, чтобы толерогенные иммунные ответы приводили к ингибированию развития, прогрессирования или патологии болезней, расстройств или состояний, описанных в настоящем документе. Приводят ли или нет изобретательские композиции к ингибированию развития, прогрессирования или патологии болезней, расстройств или состояний, описанных в настоящем документе, можно определить, используя животные модели болезней, расстройств или состояний. В некоторых вариантах осуществления уменьшение нежелательного иммунного ответа или вызова толерогенного иммунного ответа могут быть измерены путем определения конечных клинических результатов, клинической эффективности, клинических признаков, биомаркеров заболевания и/или клинических показателей. Нежелательные иммунные ответы или толерогенные иммунные ответы могут также быть измерены при помощи диагностических тестов, выявляющих присутствие или отсутствие заболевания, нарушения или состояния, как описано выше. Нежелательные иммунные ответы могут помимо того быть измерены методами измерения уровней терапевтических белков и/или их функций у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления мониторинг или измерение вызова нежелательного иммунного ответа или толерогенного иммунного ответа у субъекта может быть проведено до введения композиции синтетических наноносителей, предоставленных в настоящем документе, и/или до введения терапевтического белка. В других способах измерение вызова нежелательного иммунного ответа или толерогенного иммунного ответа может быть произведено после введения композиции синтетических наноносителей, предоставленных в настоящем документе, и/или после введения терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления измерение производят после введения композиции синтетических наноносителей, но до введения терапевтического белка. В других вариантах осуществления производят после введения терапевтического белка, но до введения композиции. В других вариантах осуществления измерение производят до введения и синтетических наноносителей, и терапевтического белка, в то время как в некоторых вариантах исполнения изобретения измерение производят после введения и синтетических наноносителей, и терапевтического белка. В других вариантах осуществления измерение производят как до введения синтетических наноносителей и/или терапевтического белка, так и после него. В других способах измерение производят больше одного раза, чтобы определить, что у субъекта поддерживается желательный иммунный статус, причем субъект получал, получает или будет получать терапевтический белок.

Ответ антител может быть измерен путем определения титров одного или нескольких антител. "Титр антитела" означает измеримый уровень продукции антител. Методы определения титров антител известны в этой области и включают ферментсвязанный иммуносорбентный метод исследования (ELISA). В вариантах осуществления ответ антитела может быть измерен количественно, например в виде количества антител, концентрации антител или титра. Показатели могут быть абсолютными или относительными. Методы количественного анализа ответа антитела включают методы захвата антител,

методы ELISA, методы ингибирования абсорбции жидкой фазы (ILPAA), методы ракетного иммуноэлектрофореза (RIE) и методы линейного иммуноэлектрофореза (LIE). Когда ответ антитела сравнивают с ответом другого антитела по такому же количественному показателю (например, титру), предпочтительно использовать метод измерения (например, ELISA) для сравнения.

Метод ELISA для определения титра антитела, например типичного бутербродного ELISA, может состоять из таких этапов: (i) приготовление покровного материала для ELISA-планшета, такого, что исследуемое антитело связывается с полимером субстрата или другим подходящим материалом, (ii) приготовление покровного материала в водном растворе (например, PBS) и добавление покровного материала в лунки многолуночного планшета для экспозиции покровного материала в лунках в течение ночи, (iii) тщательная отмывка многолуночного планшета отмывочным буфером (например, 0,05% Tween-20 в PBS) для удаления покровного материала, (iv) блокирование планшета для неспецифического связывания при помощи разведенного раствора (например, 10% зародышевой бычьей сыворотки в PBS), (v) отмывка блокатора/разведенного раствора с планшета отмывочным буфером, (vi) разведение образца(ов) сыворотки, содержащих антитела и соответствующие стандарты (положительные контроли) растворителем, как требуется для получения концентрации, достаточной для получения ответа ELISA, (vii) серийное разведение образцов плазмы в многолуночном планшете, чтобы охватить серию концентраций, подходящих для генерации кривой ответа ELISA, (viii) инкубирование планшета, чтобы обеспечить связывание антитела с мишенью, (ix) отмывка планшета отмывочным буфером, чтобы удалить антитела, не связанные с антигеном, (x) добавление соответствующей концентрации вторичного идентифицирующего антитела в том же растворителе, например биотине, связанном с идентифицирующим антителом, которое способно связывать первичное антитело, (xi) инкубирование планшета с внесенным идентифицирующим антителом с последующей отмывкой отмывочным буфером, (xii) добавление фермента, например стрептавидина-HRP (пероксидаза хрена), который связывает биотинсвязанные антитела, и инкубирование, (xiii) отмывка многолуночного планшета, (xiv) добавление субстрата(ов) (например, раствор ТМВ) в планшет, (xv) применение стоп-раствора (например, 2 н серной кислоты) по завершении проявления цвета, (xvi) определение оптической плотности лунок планшета и специфической длины волн субстрата (450 нм с субстракцией чтения при 570 нм), (xvi) построение соответствующей данным многопараметральной кривой и определение половины максимальной эффективной концентрации (EC50) как концентрации на кривой, при которой достигается половина максимального значения OD.

"Нежелательный иммунный ответ" относится к любому нежелательному иммунному ответу, который вызван экспозицией антигену, вызывает или усугубляет заболевание, нарушение или состояние, как описано в настоящем документе, или их симптом, или является признаком заболевания, нарушения или состояния, как описано в настоящем документе. Такие иммунные ответы, как правило, отрицательно влияют на здоровье субъекта или являются симптоматикой негативного влияния на здоровье субъекта. Нежелательные иммунные ответы включают продукцию антиген-специфических антител, пролиферацию и/или активность антиген-специфических В-клеток или пролиферацию и/или активность антиген-специфических CD4+Т-клеток.

С. Композиции изобретения.

Настоящим предлагаются композиции толерогенного синтетического наноносителя, содержащие иммунодепрессанты и терапевтические белки-презентируемые APC антигены, и родственные способы. Такие композиции и способы нужны для уменьшения вызова нежелательных иммунных ответов и стимуляции вызова толерогенных иммунных ответов, специфических к терапевтическим белкам. Композиции можно вводить субъектам, для которых желательно получение толерогенного иммунного ответа на терапевтические белки. Такими субъектами являются те, кто получал, получают или будут получать терапевтический белок. В вариантах осуществления субъекту вводят синтетические наноносители, представленные в настоящем документе, а затем вводят один или несколько терапевтических белков. В других вариантах осуществления субъекту сначала вводят терапевтический белок, а затем предоставленные синтетические наноносители. В других вариантах осуществления синтетические наноносители и один или несколько терапевтических белков вводят одновременно.

Как указано выше, синтетические наноносители разработаны так, чтобы включить иммунодепрессанты и при некоторых способах антиген, против которого желательно возникновение толерогенного эффекта. В вариантах осуществления антигены включают МНС класса II-рестриктированные эпитопы, которые при презентации в комплексе с иммунодепрессантом могут вызывать толерогенные эффекты, такие как уменьшение пролиферации и/или активности антиген-специфических CD4+Т-клеток. Вызванные толерогенные эффекты также включают уменьшение пролиферации и/или активности антиген-специфических В-клеток и/или уменьшение продукции антиген-специфического антитела. В соответствии с изобретением может применяться большое разнообразие синтетических наноносителей. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются сферами или сфероидными. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители плоские или листообразные. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются кубами или кубоидами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители овальные или эллиптические. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители имеют форму цилиндров, конусов или пирамид.

В некоторых вариантах осуществления желательно применять множество синтетических наноносителей, относительно однородных по размеру, форме и/или составу, так что каждый синтетический наноноситель имеет аналогичные свойства. Например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% синтетических наноносителей от их общего числа могут иметь минимальный размер или максимальный размер, находящийся в пределах 5, 10 или 20% среднего диаметра или среднего размера синтетических наноносителей. В некоторых вариантах осуществления множество синтетических наноносителей может быть гетерогенной по размеру, форме и/или составу.

Синтетические наноносители могут быть твердыми, полыми и состоять из одного или нескольких слоев. В некоторых вариантах осуществления каждый слой имеет особенный состав и особенные свойства относительно другого слоя (слоев). В качестве примера синтетические наноносители могут иметь сердцевинно-оболочное строение, при котором сердцевина является одним слоем (например, полимерной жилой), а оболочка является вторым слоем (например, билипидным слоем или одинарным слоем). Синтетические наноносители могут включать совокупность разных слоев.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут дополнительно включать один или несколько липидов. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать липосому. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать билипидный слой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать липидный монослой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать мицеллу. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать сердцевину, содержащую полимерную матрицу, окруженную липидным слоем (например, билипидным слоем, липидным монослоем и т. д.). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать неполимерную сердцевину (например, частицу металла, квантовую точку, керамическую частицу, костную частицу, вирусную частицу, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и т. д.), окруженную липидным слоем (например, билипидным слоем, липидным монослоем и т. д.).

В других вариантах осуществления синтетические наноносители могут содержать частицы металла, квантовые точки, керамические частицы и т. д. В некоторых вариантах осуществления неполимерный синтетический наноноситель является агрегатом неполимерных компонентов, например агрегатом атомов металла (например, атомов золота).

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут дополнительно содержать один или несколько амфифильных компонентов. В некоторых вариантах осуществления амфифильная составляющая может придавать синтетическим наноносителям повышенную стабильность, улучшенную однородность или повышенную вязкость. В некоторых вариантах осуществления амфифильные составляющие могут быть связаны с внутренней поверхностью липидной мембраны (например, билипидным слоем, липидным монослоем и т. д.). Многие амфифильные составляющие, известные в данной области, пригодны для применения в создании синтетических наноносителей в соответствии с настоящим изобретением. Такие амфифильные составляющие включают фосфоглицериды; фосфатидилхолины; дипальмитоил фосфатидилхолин (DPPC); диолеил фосфатидилэтанолламин (DOPE); диолеилоксипропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеилфосфатидилхолин; холестерол; эфир холестерола; диацилглицерол; диацилглицеролсукцинат; дифосфатидилглицерол (DPPG); гександеканол; спирты жирного ряда, такие как полиэтиленгликоль (PEG); полиоксипропилен-9-лаурилэфир; поверхностно-активные жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота или олеиновая кислота; жирные кислоты; моноглицериды жирных кислот; диглицериды жирных кислот; амиды жирных кислот; сорбитан триолеат (Span®85) гликохолат; сорбитан монолаурат (Span®20); полисорбат 20 (Tween®20); полисорбат 60 (Tween®60); полисорбат 65 (Tween®65); полисорбат 80 (Tween®80); полисорбат 85 (Tween®85); полиоксипропилен моностеарат; сурфактин; полокссомер; сорбитановый эфир жирной кислоты, например сорбитан триолеат; лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинозитол; сфингомиелин; фосфатидилэтанолламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидную кислоту; цереброзиды; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерол; стеариламин; додециламин; гексадециламин; ацетилпальмитат; глицеролтриолеат; гексадецилстерат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль) 5000-фосфатидилэтанолламин; поли(этиленгликоль) 400-моностеарат; фосфолипиды; синтетические и/или природные детергенты с высокими сурфактантными свойствами; деоксихолаты; циклодекстрины; хаотропные соли; агенты для образования пар ионов и комбинации вышеперечисленного, но не ограничены ими. Амфифильная составляющая может состоять из смеси различных амфифильных составляющих. Специалисты в данной области поймут, что это примерный, а не исчерпывающий список веществ, проявляющих поверхностную активность. Любая амфифильная составляющая может быть использована в производстве синтетических наноносителей для применения в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут дополнительно содержать один или несколько углеводов. Углеводы могут быть природными или синтетическими. Углевод может быть деривированным природным углеводом. В некоторых вариантах осуществления углевод содержит моносахарид или дисахарид, например глюкозу, фруктозу, галактозу, рибозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую кислоту, галактуроновую

кислоту, маннуроновую кислоту, глюкозамин и нейраминовою кислоту, но не ограничен ими. В некоторых вариантах осуществления углеводов является полисахаридом, включая пуллулан, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС), гидроксцеллюлозу (НС), метилцеллюлозу (МС), декстран, циклодекстран, гликоген, гидроксизетилкрахмал, каррагенан, гликон, амилозу, хитозан, N,O-карбоксиметилхитозан, альгин и альгиновую кислоту, крахмал, хитин, инулин, конджак, глюкоманнан, пустилан, гепарин, гиалуроновую кислоту, курдлан и ксантан, но не ограничен ими. В различных вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители не включают (или специфически исключают) углеводы, такие как полисахариды. В некоторых вариантах осуществления углеводов может содержать производное углевода, например сахароспирт, включая маннитол, сорбитол, ксилитол, эритриол, мальтитол и лактиол, но не ограничиваясь ими.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут содержать один или несколько полимеров. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители включают один или несколько полимеров, которые являются несетоксигтерминированными плуроновыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97 или 99% (вес./вес.) полимеров, составляющих синтетические наноносители, являются не содержащими концевую метоксигруппу плуроновыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления все полимеры, составляющие синтетические наноносители, являются не содержащими концевую метоксигруппу плуроновыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители включают один или несколько не содержащих концевую метоксигруппу плуроновых полимеров. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97 или 99% (вес./вес.) полимеров, составляющих синтетические наноносители, являются не содержащими концевую метоксигруппу полимерами. В некоторых вариантах осуществления все полимеры, составляющие синтетические наноносители, являются не содержащими концевую метоксигруппу полимерами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители содержат один или несколько полимеров, которые не включают плуроновый полимер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97 или 99% (вес./вес.) полимеров, составляющих синтетические наноносители, не включают плуроновый полимер. В некоторых вариантах осуществления все полимеры, составляющие синтетические наноносители, не включают плуроновый полимер. В некоторых вариантах осуществления такой полимер может быть окружен слоем покрытия (например, липосомой, липидным монослоем, мицеллой и т. д.). В некоторых вариантах осуществления различные элементы синтетических наноносителей могут быть связаны с полимером.

Иммунодепрессанты и/или антигены могут быть связаны с синтетическими наноносителями рядом способов. Как правило, соединение может являться результатом образования связи между иммунодепрессантами и/или антигенами и синтетическими наноносителями. Образование связи может привести к присоединению иммунодепрессантов и/или антигенов к поверхности синтетических наноносителей и/или их заключению в синтетические наноносители (инкапсуляции). В некоторых вариантах осуществления, однако, иммунодепрессанты и/или антигены инкапсулируются синтетическими наноносителями скорее благодаря структуре синтетических наноносителей, чем путем присоединения к синтетическим наноносителям. В более предпочтительных вариантах осуществления синтетический наноноситель содержит полимер, как предоставлено в настоящем документе, и иммунодепрессанты и/или антигены, связанные с полимером.

Когда присоединение происходит в результате возникновения связи между иммунодепрессантами и/или антигенами и синтетическими наноносителями, присоединение может происходить за счет соединительной доли. Соединительная доля может являться группой, посредством которой иммунодепрессант и/или антиген соединяется с синтетическим наноносителем. Такие доли включают ковалентные связи, например амидную связь сложноэфирную связь, а также отдельные молекулы, которые связывают (ковалентно или нековалентно) иммунодепрессант и/или антиген с синтетическим наноносителем. Такие молекулы включают линкеры или полимеры или их элементарное звено. Например, соединительная доля может содержать заряженный полимер, с которым иммунодепрессант и/или антиген связываются электростатически. В качестве другого примера соединительная доля может содержать полимер или его номер, к которым происходит ковалентное присоединение.

В более предпочтительных вариантах осуществления синтетические наноносители включают полимер, как предоставлено в настоящем документе. Эти синтетические наноносители могут полностью состоять из полимера или могут состоять из смеси полимеров и других веществ.

В некоторых вариантах осуществления полимеры синтетического наноносителя соединяются, образуя полимерную матрицу. В некоторых вариантах осуществления составляющая, например иммунодепрессант или антиген, может ковалентно присоединяться к одному или нескольким полимерам полимерной матрицы. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связь образуется посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления составляющая может нековалентно присоединяться к одному или нескольким полимерам полимерной матрицы. Например, в некоторых вариантах осуществления составляющая может быть инкапсулирована или окружена полимерной матрицей или диспергирована в ней.

Альтернативно или дополнительно составляющая может быть связана с одним или несколькими полимерами полимерной матрицы гидрофобными взаимодействиями, взаимодействиями зарядов, силами ван дер Ваальса и т. д. Известно большое количество конвенционных полимеров и способов образования из них полимерных матриц.

Полимеры могут быть природными или искусственными (синтетическими). Полимеры могут являться гомополимерами или сополимерами, содержащими два или более мономеров. В смысле последовательности сополимеры могут быть случайными, блок-сополимерами или содержать комбинацию случайных или блочных последовательностей. Как правило, полимеры в соответствии с настоящим изобретением являются органическими полимерами.

В некоторых вариантах осуществления полимер содержит полиэфир, поликарбонат, полиамид, или полиэстер, или их мономер. В других вариантах осуществления полимер содержит поли(этиленгликоль) (PEG), полипропиленгликоль, поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер молочной и гликолевой кислот, или поликапролактон, или их мономер. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы полимер был биоразлагаемым. Таким образом, в этих вариантах осуществления предпочтительно, чтобы полимер включал полиэфир, такой как поли(этиленгликоль), или полипропиленгликоль, или их его мономер, блок-сополимер полиэфира и биоразлагаемый полимер, так чтобы полимер был биоразлагаемым. В других вариантах осуществления полимер не содержит исключительно полиэфир или его мономер, такой как поли(этиленгликоль) или полипропиленгликоль или его мономер.

Другими примерами полимеров, пригодных для применения в настоящем изобретении, являются полиэтилены, поликарбонаты (например, поли(1,3-диоксан-2он)), полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)), полипропилфумераты, полиамиды (например, поликапролактон), полиацеталы, полиэфиры, полиэстеры (например, полилактид, полигликолид, полилактид-со-гликолид, поликапролактон, полигидроксикислота (например поли(β -гидроксиалканоксид))), поли(ортоэстеры), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полимочевины, полистиролы и полиамины, полилизин, сополимеры полилизин-PEG и сополимеры поли(этиленмина) и поли(этиленмин)-PEO, но не ограничиваясь ими.

В некоторых вариантах осуществления полимеры в соответствии с настоящим изобретением включают полимеры, разрешенные к применению для человека U.S. Food and Drug Administration (FDA) в 21 C.F.R. § 177.2600, включая полиэстеры (например, полимолочную кислоту, сополимер молочной и гликолевой кислот, поликапролактон, поливалеролактон, поли(1,3-диоксан-2он)); полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)); полиэфиры (например, полиэтиленгликоль); полиуретаны; полиметакрилаты; полиакрилаты и полицианоакрилаты, но не ограничиваясь ими.

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, тиоловую группу, аминогруппу). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофильную полимерную матрицу, создает гидрофильную среду в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть гидрофобными. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофобную полимерную матрицу, создает гидрофобную среду в синтетическом наноносителе. Выбор гидрофобного или гидрофильного полимера может оказывать влияние на природу связываемых синтетическим наноносителем (например, присоединяемых) веществ.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы одной или несколькими соединительными долями и/или функциональными группами. В соответствии с настоящим изобретением могут применяться различные соединительные доли или функциональные группы. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы полиэтиленгликолем (PEG), углеводом и/или ациклическими полиацеталами, полученными из полисахаридов (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Определенные варианты осуществляют, применяя общие указания в патенте США № 5543158, Gref et al., или в публикации международной заявки WO 2009051837, Von Andrian et al.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы липидом или группой жирной кислоты. В некоторых вариантах осуществления группой жирной кислоты может быть одна или несколько из масляной, капроновой, каприловой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой, бегеновой или лигноцериновой кислот. В некоторых вариантах осуществления группой жирной кислоты может быть одна или несколько из пальмитолеиновой, олеиновой, вакценовой, линолевой, альфа-линолевой, гамма-линолевой, арахидиновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой или эруковой кислот.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут являться полиэстерами, включая сополимеры, содержащие мономеры молочной и гликолевой кислот, такие как сополимер молочной и гликолевой кислот и поли(лактид-со-гликолид), совокупность которых упоминается в настоящем документе как "PLGA"; и гомополимерами, содержащими мономеры гликолевой кислоты, которые упоминаются в настоящем документе как "PGA," и мономеры 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,

совокупность которых упоминается в настоящем документе как "PLA." В некоторых вариантах осуществления примерами полиэстеров являются, например, полигидроксикислоты; PEG сополимеры и сополимеры лактида и гликолида (например, PLA-PEG сополимеры, PGA-PEG сополимеры, PLGA-PEG сополимеры и их производные. В некоторых вариантах осуществления полиэстеры включают, например, поли(капролактон), поли(капролактон)-PEG сополимеры, поли(L-лактид-со-L-лизин), полиэстер серина, поли(4-гидрокси-L-пролин эстер), поли[α -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] и их производные.

В некоторых вариантах осуществления полимер может являться PLGA. PLGA является биологически совместимым и биоразлагаемым сополимером молочной и гликолевой кислот, и различные формы PLGA характеризуются соотношением молочная кислота:гликолевая кислота. Молочная кислота может являться L-молочной кислотой, D-молочной кислотой или D,L-молочной кислотой. Степень деградации PLGA можно менять, изменяя соотношение молочная кислота:гликолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления PLGA, используемые в соответствии с настоящим изобретением, характеризуются отношением 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 являться одним или несколькими акриловыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилат, цианоэтилметакрилат, сополимеры аминоалкилметакрилата, поли(акриловой кислоты), поли(метакриловой кислоты), сополимер метакриловой кислоты и алкиламида, поли(метилметакрилата), поли(ангидрида метакриловой кислоты), метилметакрилата, полиметакрилата, сополимер поли(метилметакрилата), полиакриламид, сополимер аминоалкилметакрилата, сополимер глицидилметакрилата, полицианоакрилата и комбинациями, содержащими один или несколько из вышеупомянутых полимеров. Акриловый полимер может содержать полностью полимеризованные сополимеры эстеров акриловой и метакриловой кислот с низким числом четвертичных аммониевых групп.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть катионными. Как правило, катионные полимеры способны конденсировать и/или защищать негативно заряженные нити нуклеиновых кислот (например, ДНК или ее производных). Аминосодержащие полимеры, такие как дендримеры поли(лизина) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97; и Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), поли(этиленimina) (PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1995, 92:7297) и поли(амидоamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:4897; Tang et al., 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7:703; and Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4:372) являются положительно заряженными при физиологических значениях pH, образуют с нуклеиновыми кислотами ионные пары и проводят трансфекцию во многих линиях клеток. В различных вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители могут не содержать (или могут исключать) катионные полимеры.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут являться способными к разложению полиэстерами, 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; and Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Примерами таких полиэстеров являются поли(L-лактид-со-L-лизин) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), полиэстер серина (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), поли(4-гидрокси-L-пролин эстер) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; and Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633) и поли(4-гидрокси-L-пролин эстер) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; and Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

Свойства этих и других полимеров и способы их получения хорошо известны в данной области (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, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; и Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). В более общем виде разнообразие методов синтеза отдельных подходящих полимеров описано 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. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут являться дендримерами. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть практически сшитыми друг с другом поперечными мостиками. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть практически не связанными друг с другом поперечными мостиками. В некоторых вариантах осуществления полимеры можно применять в соответствии с настоящим изобретением, не подвергая их сшиванию поперечными мостиками. Помимо того, следует понимать, что изобретательские синтетические наноносители могут содержать блок-сополимеры, графт-сополимеры, комбинации, смеси и/или продукты присоединения упомянутых или других полимеров. Специалисты в данной области поймут, что приведенный в настоящем документе

список полимеров, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, является примерным, но не исчерпывающим.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители не включают полимерный компонент. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут содержать металлические частицы, квантовые точки, керамические частицы и т. д. В некоторых вариантах осуществления неполимерный синтетический наноноситель является агрегатом неполимерных компонентов, например агрегатом атомов металла (например, атомов золота).

Композиции в соответствии с изобретением включают синтетические наноносители в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как консерванты, буферы, раствор солей или раствор фосфатного буфера. Композиции можно производить, используя конвенционные фармацевтические составляющие и технологии для получения полезных лекарственных форм. В различных вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители суспендированы в стерильном растворе солей для инъектирования вместе с консервантом.

В различных вариантах осуществления при приготовлении синтетических наноносителей в роли носителей могут быть полезны методы присоединения компонентов к синтетическим наноносителям. Если компонент является малой молекулой, предпочтительно связывать компонент с полимером до присоединения синтетических наноносителей. В различных вариантах осуществления также более желательно применять синтетические наноносители с поверхностными группами, которые служат для присоединения компонента к синтетическому наноносителю, а не для присоединения компонента к полимеру в конструкции синтетических наноносителей.


В некоторых вариантах осуществления связующим звеном может являться ковалентный линкер. В различных вариантах осуществления пептиды в соответствии с изобретением могут ковалентно присоединяться к внешней поверхности посредством линкера 1,2,3-триазол при помощи 1,3-диполярного циклоприсоединения азидогрупп на поверхности наноносителя к антигену или иммунодепрессанту, содержащему алкиновую группу, или при помощи 1,3-диполярного циклоприсоединения алкинов на поверхности наноносителя к антигенам или иммунодепрессантам, несущим азидогруппу. Такие реакции циклоприсоединения предпочтительней проводить в присутствии катализатора Cu(I) с Cu(I)-лигандом и восстановителем, который восстанавливает соединение Cu(II) до каталитически активного соединения Cu(I). Такое Cu(I)-катализированное азидоалкиновое циклоприсоединение (CuAAC) также упоминается как клик-реакция.

Кроме того, ковалентное присоединение может содержать ковалентный линкер, который содержит амидный линкер, дисульфидный линкер, тиоэфирный линкер, гидразоновый линкер, иминовый или оксимовый линкер, мочевиновый или тиомочевиновый линкер, имиридиновый линкер, аминовый линкер и сульфонамидный линкер.

Амидный линкер образован при помощи амидной связи между амином одного компонента, такого как антиген или иммунодепрессант, с карбоксильной группой другого компонента, такого как наноноситель. Амидная связь в линкере может образовываться при помощи любой из конвенционных реакций образования амидной связи с соответственно защищенными аминокислотами и активированной карбоксильной кислотой с N-гидроксисукцинимид-активированным эстером.

Дисульфидный линкер образуется через образование дисульфидной (S-S) связи между двумя атомами серы в форме, например, R1-S-S-R2. Дисульфидная связь может образовываться при обмене тиола между компонентом, содержащим тиоловую/меркаптановую группу(-SH), с другой активированной тиоловой группой на полимере или наноносителе, содержащем тиоловые/меркаптановые группы, с компонентом, содержащим активированную тиоловую группу.



Триазоловый линкер, особенно 1,2,3-триазол формы , где R1 и R2 могут быть любыми химическими составляющими, образуется во время 1,3-диполярного присоединения азиды, присоединенного к одному компоненту, например наноносителю, с терминальным алкином, присоединенным к другому компоненту, например иммунодепрессанту или антигену. 1,3-Диполярное циклоприсоединение происходит в присутствии или без присутствия катализатора, предпочтительно Cu(I), который связывает два компонента через 1,2,3-триазол. Химизм этого процесса детально описан в Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002) and Meldal, et al, *Chem. Rev.*, 2008, 108(8), 2952-3015 и обычно упоминается как клик-реакция или CuAAC.

В вариантах осуществления получают полимер, содержащий азидную или алкиновую группу, концевую относительно полимерной цепи. Этот полимер далее применяют для получения синтетического наноносителя таким образом, что большинство алкиновых и азидных групп расположены на поверхности этого наноносителя. Альтернативно, синтетический наноноситель получают другим путем и последовательно функционализируют его алкиновыми или азидными группами. Компонент получают в присутствии алкина (если полимер содержит азид) или азиды (если полимер содержит алкиновую группу). Затем компонент реагирует с наноносителем через 1,3-диполярное циклоприсоединение с катализатором

или без него, что ковалентно связывает компонент к частице при помощи 1,4-распределенного 1,2,3-триазолового линкера.

Тиозфирный линкер образуется путем образования сульфур-карбоновой (тиозфирной) связи, например в форме R1-S-R2. Тиозфир может быть образован посредством алкилирования тиол/меркаптановой группы (-SH) одного компонента алкилирующей группы, например галидом или эпоксидом, второго компонента. Тиозфирные линкеры могут также быть образованы посредством присоединения по Михаэлю тиол/меркаптановой группы одного компонента к электронодефицитной алкеновой группе второго компонента, содержащего малеимидную или винил-сульфоновую группу в роли акцептора Михаэля. По-другому тиозфирные линкеры можно получить при помощи радикальной тиоловой реакции между тиол/меркаптановой группой одного компонента и алкеновой группой второго компонента.

Гидразоновый линкер получают посредством реакции между гидразидной группой одного компонента и альдегидной/кетонной группой второго компонента.

Гидразидный линкер образуется при помощи реакции между гидразидной группой одного компонента и карбоксильной группой второго компонента. Такие реакции, как правило, осуществляют, используя тот же химизм, что и при получении амидной связи, при которой карбоновая кислота активируется активирующим реагентом.

Иминный или оксимный линкер образуется посредством реакции между аминной или N-алкоксиаминной (или аминокси) группой одного компонента с альдегидной или кетонной группой второго компонента.

Мочевинный или тиомочевинный линкер образуется посредством реакции между аминогруппой одного компонента и изоцианатной или тиоцианатной группой второго компонента.

Амидиновый линкер образуется посредством реакции между аминогруппой одного компонента и амидозфирной группой второго компонента.

Аминный линкер получают при помощи реакции алкилирования аминогруппы одного компонента алкилирующей группой, например галидной, эпоксидной или сульфонатэфирной группой, второго компонента. Альтернативно аминный линкер также можно получить путем восстановительного аминирования аминогруппы одного компонента альдегидной или кетонной группой второго компонента в присутствии приемлемого восстановителя, например цианоборгидрида натрия или триацетоксиборогидрида натрия.

Сульфонамидный линкер образуется посредством реакции между аминогруппой и сульфонилгалд-ной (например, сульфонилхлоридной) группой второго компонента.

Сульфоновый линкер получают посредством присоединения по Михаэлю нуклеофила к винил сульфону. На поверхности наночастицы или присоединенным к компоненту может быть как винил сульфон, так и нуклеофил.

Компонент также может быть сопряжен с наночастицей посредством нековалентных способов сопряжения. Например, негативно заряженный антиген или иммунодепрессант может быть сопряжен с позитивно заряженным наночастицей посредством электростатической адсорбции. Компонент, содержащий металлический лиганд, также может быть сопряжен с наночастицей, содержащим металлический комплекс, посредством комплекса металл-лиганд.

В различных вариантах осуществления может быть присоединен к полимеру, полимолочной кислоте-полиэтиленгликолю до того, как произойдет агрегация синтетического наночастицы, или до образования синтетического наночастицы с реактивными или активируемыми группами на поверхности. В последнем случае компонент можно получить, используя группу, совместимую с химизмом присоединения, характерным для поверхности. В других вариантах осуществления пептидный компонент может присоединяться к VLP или липосомам посредством приемлемого линкера. Линкер представляет собой соединение или реагент, который способен соединить две молекулы вместе. В варианте осуществления линкер может представлять собой гомобифункциональный или гетеробифункциональный реагент, описываемый в Hermanson, 2008. Например, VLP или липосомный синтетический наночастица, содержащий карбоксильную группу на поверхности, можно обрабатывать гомобифункциональным линкером, дигидразидом адипиновой кислоты (ADH) в присутствии EDC для образования соответствующего синтетического наночастицы с ADH-линкером. Полученный при помощи ADH-линкера синтетический наночастица в дальнейшем сопрягают с пептидным компонентом, содержащим кислотную группу, посредством другого конца ADH-линкера на NC, чтобы вызвать сопряжение с соответствующими VLP или пептидом липосомы.

Подробное описание доступных методов сопряжения содержится в Hermanson G.T. "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008. Помимо ковалентного присоединения компонент может быть связан при помощи адсорбции с заранее сформированным синтетическим наночастицей или может быть связан путем инкапсуляции во время формирования синтетического наночастицы.

Любой иммунодепрессант, как предоставлено в настоящем документе, может быть связан с синтетическим наночастицей. Иммунодепрессанты включают статины; ингибиторы mTOR, такие как рапа-

мицин или аналог рапамицина; TGF- β сигнальные агенты; агонисты рецептора TGF- β ; ингибиторы деацетилазы гистонов (HDAC); кортикостероиды; ингибиторы митохондриальной функции, такие как ротенон; ингибиторы P38; агонисты NF- κ B; агонисты рецепторов аденозина; агонисты простагландина E2; ингибиторы фосфодиэстеразы, такие как ингибитор фосфодиэстеразы 4; ингибиторы протеасомы; ингибиторы киназы; агонисты рецепторов, связанных с G-белком; антагонисты рецепторов, связанных с G-белком; глюкокортикоиды; ретиноиды; ингибиторы цитокинов; ингибиторы рецепторов цитокинов; активаторы рецепторов цитокинов; антагонисты рецепторов, активируемых пролиферацией пероксисомы; агонисты рецепторов, активируемых пролиферацией пероксисомы; ингибиторы деацетилазы гистонов; ингибиторы кальциневрина; ингибиторы фосфатазы и окисленных АТФ, но не ограничены ими. Иммунодепрессанты также включают IDO, витамин D3, циклоспорин А, ингибиторы рецептора арил-гидрокарбона, ресвератрол, азатиопурин, 6-меркаптопурин, аспирин, нифлумовую кислоту, эстриол, триполид, интерлейкины (например, IL-1, IL-10), циклоспорин А, цитокины различных малых интерферирующих РНК или рецепторы цитокинов и подобное.

Примерами статинов могут служить аторвастатин (LIPITOR®, TORVAST®), церивастатин, флувастатин (LESCOL®, LESCOL® XL), ловастатин (MEVACOR®, ALTOCOR®, ALTOPREV®), мевастатин (COMPACTIN®), питаваастатин (LIVALO®, PIAVA®), розувастатин (PRAVACHOL®, SELEKTINE®, LIPOSTAT®), розувастатин (CRESTOR®) и симвастатин (ZOCOR®, LIPEX®).

Примерами ингибиторов mTOR могут служить рапамицин, его аналоги (например, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-металлилрапамицин (C20-Marap), C16-(S)-бутилсульфонамилорапамицин (C16-Bsrap), C16-(S)-3-метилиндолрапамицин (C16-iRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), хризофановая кислота (хризофанол), дефоролимус (MK-8669), эверолимус (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, темзирилимус и WYE-354 (available from Selleck, Houston, TX, USA).

Примерами сигнальных агентов TGF- β лиганды TGF- β (например, активин А, GDF1, GDF11, морфогенные белки кости, узлы TGF- β) и их рецепторы (например, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGF β RI, TGF β RII), R-SMADS/co-SMADS (например, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8) и ингибиторы лигандов (например, фоллистатин, ноггин, хордин, DAN, lefty, LTBP1, THBS1, декорин).

Примерами ингибиторов митохондриальной функции могут служить атрактилозид (дикалиевая соль), бонгкрековая кислота (триаммонийная соль), карбонилцианид m-хлорфенилгидразол, карбоксиатрактилозид (например, полученный из *Atractylis gummifera*), CGP-37157, (-)-дегуелин (например, полученный из *Mundulea sericea*), F16, доменный пептид связывания II VDAC гексокиназы, олигомицин, ротенон, Ru360, SFK1 и валиномицин (например, полученный из *Streptomyces fulvissimus*) (EMD4Biosciences, USA).

Примерами ингибиторов P38 могут служить SB-203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфинилфенил)-5-(4-пиридил)1H-имидазол), SB-239063 (транс-1-(4-гидроксициклофенил)-4-(фторфенил)-5-(2-метокси-пиримидин-4-ил) имидазол), SB-220025 (5-(2-амино-4-пиримидинил)-4-(4-фторфенил)-1-(4-пиперидинил)имидазол) и ARRY-797.

Примерами ингибиторов NF (например, NF- κ B) могут служить IFRD1, 2-(1,8-нафтиридин-2-ил)-фенол, 5-аминосалициловая кислота, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (фенетилэстер кофейной кислоты), диэтилмалеат, ингибитор IV IKK-2, IMD 0354, лактаистин, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], ингибитор III активации NF κ B, ингибитор II активации NF κ B, JSH-23, партенолид, оксид фениларсина (PAO), PPM-18, аммонийная соль пирролидиндитиокарбаминовой кислоты, QNZ, RO 106-9920, рокагламид, рокагламид AL, рокагламид C, рокагламид I, рокагламид J, рокаглаол, (R)-MG-132, салицилат натрия, триптолид (PG490), веделолактон.

Примерами агонистов рецептора аденозина могут служить CGS-21680 и ATL-146e.

Примерами агонистов простагландина E2 могут служить E-простаноид 2 и E-простаноид 4.

Примерами ингибиторов фосфодиэстеразы (неселективных и селективных ингибиторов) могут служить кофеин, аминофиллин, IBMX (3-изобутил-1-метилксантин), параксантин, пентоксифиллин, теобромин, теофиллин, метилированные скантины, винпоцетин, EHNA (эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)аденин), анагредид, эноксимон (PERFAN™), милринон, левосимендон, мезембрин, ибудиаст, пикламиласт, лутеолин, дротаверин, рофлумиласт (DAXAS™, DALIRESP™), силденафил (REVATION®, VIAGRA®), тадалафил (ADCIRCA® CIALIS®), варденафил (LEVITRA®, STAXYN®), уденафил, аванафил, икариин, 4-метилпиперазин и пиразолопиримидин-7-1.

Примерами ингибиторов протеасомы могут служить бортезомиб, дисульфирам, эпигаллокатехин-3-галлат и салиноспирамид А.

Примерами ингибиторов киназы могут служить бевацизумаб, BIBW 2992, цетуксимаб (ERBITUX®), иматиниб (GLEEVEC®), трастузумаб (HERCEPTIN®), гефитиниб (IRESSA®), ранибизумаб (LUCENTIS®), пегатиниб, сорафениб, дасатиниб, сунитиниб, эрлотиниб, нилотиниб, лапатиниб, панитумумаб, вандетаниб, E7080, пазопаниб, мубритиниб.

Примерами глюкокортикоидов могут служить гидрокортизон (кортизол), кортизон ацетат, предни-

зон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон, триамцинолон, беклометазон, флудрокортизон ацетат (DOCA) и альдостерон.

Примерами ретиноидов могут служить ретинол, ретиналь, третиноин (ретиноевая кислота, RETIN-A®), изотретиноин ACCUTANE®, AMNESTEEM®, CLARAVIS®, SOTRET®, алитретиноин (PAN-RETIN®), этретинат (TEGISON™) и его метаболит ацитреин (SORIATANE®), тазаротен (TAZORAC®, AVAGE®, ZORAC®), бексаротен (TARGRETIN®) и адапален (DIFFERIN®).

Примерами ингибиторов цитокина могут служить антагонист или рецептор IL 1ra, IL1, IGFBP, TNF-BF, уромодулин, альфа-2-макроглобулин, циклоспорин А, пентамидин и пентоксифиллин (PENTOPAK®, PENTOXIL®, TRENTAL®).

Примерами рецепторов или антагонистов, активируемых пролиферацией пероксисомы, могут служить GW9662, антагонист III PPAR γ , G335, T0070907 (EMD4Biosciences, США).

Примерами рецепторов или агонистов, активируемых пролиферацией пероксисомы, могут служить пиоглитазон, циглитазон, клофибрат, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, активатор PPAR γ , Fmoc-Leu, троглитазон и WY-14643 (EMD4Biosciences, США).

Примерами ингибиторов деацетилазы гистонов могут служить гидроксамовые кислоты (или гидроксаматы), такие как трихостатин А, циклические тетрапептиды (такие как трапоксин В) и депсипептиды, бензамиды, электрофильные кетоны, соединения алифатических кислот, такие как фенилбутират и вальпроовая кислота, гидроксамовые кислоты, такие как вориносат (SAHA), белиносат (PXD101), LAQ824 и панобиносат (LBH589), бензамиды, такие как энтиносат (MS-275), CI994 и моцетиносат (MGCD0103), накотинамид, производные НАД, дигидрокумарин, нафтопиранон и 2-гидроксинафальдегиды.

Примерами ингибиторов кальциневрина могут служить циклоспорин, пимекролимус, воклоспорин и такролимус.

Примерами ингибиторов фосфатазы могут служить BN82002 гидрохлорид, CP-91149, каликулин А, кантаридиновая кислота, кантаридин, циперметрин, этил-3,4-дефостатин, натриевая соль фостриецина, MAZ51, метил-3,4-дефостатин, NSC 95397, норкантаридин, аммониевая соль акадаиковой кислоты, полученная из *procentrum concavum*, окадаиковая кислота, калиевая соль акадаиковой кислоты, натриевая соль окадаиковой кислоты, фениларсиноксид, разнообразные смеси ингибиторов фосфатазы, белок фосфатаза 1С, ингибитор белка фосфатазы 2А, белок фосфатаза 2А1, протеин фосфатаза 2А2, натрий ортова-надат.

В некоторых вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, как описано в настоящем документе, также связаны с синтетическими наноносителями. В некоторых вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, связаны с одними и теми же или с различными синтетическими наноносителями, с которыми связаны иммунодепрессанты. В других вариантах осуществления антигены, презентруемые терапевтическим белком APC, не связаны с синтетическими наноносителями. Антиген, презентруемый терапевтическим белком APC, содержит какой-либо из терапевтических белков или их фрагментов или производных, предоставленных в данном документе.

Терапевтические белки включают инфузируемые терапевтические белки, ферменты, кофакторы ферментов, гормоны, факторы свертывания крови, цитокины и интерфероны, факторы роста, моноклональные антитела и поликлональные антитела (например, вводимые субъекту для заместительной терапии) и белки, связанные с болезнью Помпе (например, альфа-глюкозидаза альфа, rhGAA (например, миозим и люмизим (Genzyme)), но не ограничены ими. Терапевтические белки также включают белки, вовлеченные в каскад свертывания крови. Терапевтические белки включают фактор VIII, фактор VII, фактор IX, фактор V, фактор фон Виллебранда, фактор фон Хельдебранта, тканевой активатор плазминогена, инсулин, гормон роста, эритропоэтин альфа, VEGF, тромбозпоэтин, лизозим, антитромбин и подобные. Терапевтические белки также включают адипокины, такие как лептин и адипонектин. Другие примеры терапевтических белков описаны ниже и в тексте настоящего документа. Также включены фрагменты или производные любого из терапевтических белков, предоставленного как антиген.

Примерами терапевтических белков, применяемых в ферментной заместительной терапии у субъектов, стареющих от лизосомальной болезни накопления, могут служить имиглюцераза для введения синдрома Гоше (например, церезим™), а-галактозидаза А (a-gal А) для введения болезни Фабри (например, альгазидаза бета, фабризим™), кислая а-глюкозидаза (GAA) для введения болезни Помпе (например, альфа-глюкозидаза альфа, люмизим™, миозим™), арилсульфатаза В для введения мукополисахаридозов (например, ларонидаза, альдуразим™ идурсульфатаза, элапраза™, арилсульфатаза В, наглазим™), но не ограничены ими.

Примерами ферментов могут служить оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы.

Примерами гормонов могут служить мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин), серотонин, тироксин (или тиреоидтиронин) (тиреоидный гормон), трийодтиронин (тиреоидный гормон), эпинефрин (или адреналин), норэпинефрин (или норадреналин), дофамин (или гормон-ингибитор пролактина), антимюл-

леров гормон (или фактор или гормон-ингибитор мюллера гормона), адипонектин, адренокортикотропный гормон (или кортикотропин), ангиотензиноген и ангиотензин, антидиуретический гормон (или вазопрессин, вазопрессин аргинин), предсердный натрийуретический пептид (или атриопептин), кальцитонин, холецистокинин, кортикотропин-высвобождающий гормон, эритроэпоэтин, фолликулостимулирующий гормон, гастрин, грелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид (GLP-1), GIP, гонадотропин-высвобождающий гормон, гормон, высвобождающий гормон роста, хорионический гонадотропин человека, плацентарный лактоген человека, гормон роста, ингибин, инсулин, инсулиноподобный фактор роста (или соматомедин), лептин, лютеинизирующий гормон, меланоцитстимулирующий гормон, орексин, окситоцин, паратиреоидный гормон, пролактин, релаксин, секретин, соматостатин, тромбоэпоэтин, тиреостимулирующий гормон (или тиреотропин), тиреотропин-высвобождающий гормон, кортизол, альдостерон, тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростенедион, дигидротестостерон, эстрадиол, эстрон, эстриол, прогестерон, кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D3), кальцидиол (25-гидроксивитамин D3), простагландины, лейкотриены, простагландин, тромбосан, пролактин-высвобождающий гормон, липотропин, нейропептид Y, гистамин, эндотелин, панкреатический полипептид, натрийуретический пептид головного мозга, ренин и энкефалин.

Примерами крови и свертываемости крови могут служить фактор I (фибриноген), фактор II (протромбин), тканевой фактор, фактор V (проакселерин, лабильный фактор), фактор VII (стабильный фактор, проконвертин), фактор VIII (антигемофилический глобулин), фактор IX (тромбопластин плазмы), фактор X (фактор Стюарта-Прауэра), фактор Ха, фактор XI, фактор XII (фактор Хагемана), фактор XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), фактор фон Виллебранда, прекалликреин (фактор Флетчера), высокомолекулярный кининоген (HMWK) (фактор Фитцджеральда), фибронектин, фибрин, тромбин, анти-тромбин III, кофактор гепарина II, белок C, белок S, белок Z, белок Z-зависимый протеазный ингибитор (ZPI), плазминоген, альфа 2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназа, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI1), ингибитор-2 активатора плазминогена (PAI2), раковый прокоагулянт и эритроэпоэтин альфа (эпоген, прокрит).

Примерами цитокинов могут служить лимфокины, интерлейкины и хемокины, цитокины типа 1, такие как IFN- γ , TGF- β , и цитокины типа 2, такие как IL-4, IL-10 и IL-13.

Примерами факторов роста могут служить аденомедуллин (AM), ангиоэпоэтин (Ang), фактор аутокринной моторики, морфогенетические белки кости (BMP), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритроэпоэтин (EPO), фибробластный фактор роста (FGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор стимулирования образования колоний гранулоцитов (G-CSF), фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов (GM-CSF), фактор дифференциации и роста д-9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста производных гепатоцитов (HDGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор стимуляции миграции, миостатин (GDF-8), фактор роста нервной ткани (NGF) и другие нейротрофины, фактор роста тромбоцитов (PDGF), тромбоэпоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор некроза опухолей альфа (TNF- α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), сигнальный путь Wnt, плацентарный фактор роста (PlGF), [(зародышевый бычий соматотропин)] (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7.

Примерами моноклональных антител могут служить абавогемаб, абциксимаб, адалимумаб, адекатумаб, афелиумаб, афутумаб, алализемаб пегол, ALD, алемтузумаб, альтумаб пентетат, анатумаб мафенатокс, анрукинумаб, антитимоцитглобин, аполизумаб, арцитумаб, фселиумаб, атлизумаб (тоцилизумаб), атролимумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумаб, белиумаб, бернализумаб, бертилиумаб, бесилесомаб, бавацизумаб, бициромаб, биватузумаб мертансин, блинатумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, капромаб пентетид, катумаксаб, седелизумаб, сетролизумаб пегол, сетуксимаб, цитатузумаб богатокс, сиксутумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксэтан, конатумаб, дацетумаб, даклизумаб, даратумаб, деносуамаб, детумаб, дорлиумаб арбитокс, дорликсизумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгуамаб, элотузамаб, элсилиумаб, энлиумаб пегол, эпитуумаб ситуксетан, эпрутузумаб, эрлизумаб, эртумаксаб, этарасизумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралиумаб, фарлетузамаб, фельвизумаб, фезакинумаб, фигитуамаб, фонтолизумаб, форавирумаб, фресолиумаб, галиксимаб, гантнерумаб, гавилиумаб, гентузамаб озогамидин, GC1008, гирентуксимаб, глумбатумаб ведотин, голиумаб, гомиликсимаб, ибализумаб, ибритумаб тиуксетан, иговомаб, имсиромаб, инфликсимаб, интетумаб, инолиумаб, инотузамаб озогамидин, ипилиумаб, иратумаб, келиксимаб, лабетузамаб, лебрикизумаб, лемалесомаб, лерделиумаб, лексатумаб, либивирумаб, линтузумаб, лорвотузамаб мертансин, лукатуумаб, лумиликсимаб, мапатумаб, маслиумаб, матузамаб, меполизумаб, метелиумаб, милатузамаб, минретумаб, митумаб, милоримуамаб, мотавизумаб, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, наптумаб эстафенатокс, натализумаб, небакумаб, неситумаб, нерелиумаб, нимотузамаб, нофетумаб мерпентан, осрелиумаб, одулиумаб, офатумаб, оларатумаб, омализумаб, орортузамаб монатокс, ореговомаб, отелексизумаб, пагибаксимаб, павилиумаб, панитумаб, панобакумаб, пасколизуамаб, пентумаб, пертузамаб, пекселиумаб, пинтумаб, приликсимаб, притумаб, рафивирумаб,

рамусирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робату-мумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сатумомаб пендетиде, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, сиплизумаб, соланезумаб, сонепсизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, такатузумаб тетраксэтан, тадосизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсемаб, теплизумаб, тисилимумаб (атлизумаб), торализумаб, тоситумомаб, трастузумаб, тремелимумаб, тукотузумумаб целмолейкин, тувирумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вапаликсемаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, висилизумаб, волосиксимаб, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

Примерами инъеклируемых терапевтических белков или терапевтических белков, предназначенных для инфузионной терапии, являются, например, Тоцилизумаб (Roche/Actemra®), альфа-1 антитрипсин (Kamada/AAT), Хематид® (Affymax and Takeda, синтетический пептид), альбинтерферон альфа-2b (Novartis/Zalbin™), Руцин® (Pharming Group, заместительная терапия ингибитора C1), тезаморелин (Theratechnologies/Egrifta, синтетический фактор высвобождения гормона роста), окрелизумаб (Genentech, Roche и Biogen), белимумаб (GlaxoSmithKline/Benlysta®), пеглоксиказа (Savient Pharmaceuticals/Krystexxa™), талиглуцераса альфа (Protalix/Uplyso), агальсидза (Shire/Replagal®), велаглуцераса альфа (Shire).

Дополнительные терапевтические белки, полезные в соответствии с аспектами данного изобретения, будут очевидны для специалистов в данной области, и изобретение не ограничено в этом отношении.

В некоторых вариантах осуществления компонент, такой как антиген или иммунодепрессант, может быть изолирован. Изолированный относится к элементу, отделенному от своей естественной среды и присутствующему в эффективном количестве для его идентификации или применения. Это означает, например, что элемент может быть (i) селективно продуцирован при экспрессии клонирования или (ii) очищен при помощи хроматографии или электрофореза. Изолированные элементы могут быть практически чистыми, но не обязательно. Поскольку изолированный элемент может быть примешан к фармацевтически приемлемому наполнителю в фармацевтическом препарате, элемент может составлять только небольшую долю препарата. Несмотря на это, элемент изолирован в том, что было отделено от веществ, с которыми он может быть ассоциирован в живых системах, например изолирован от других липидов или белков. Любые предоставленные в настоящем документе элементы могут быть изолированы и включены в композиции, из которых были изолированы.

D. Способы получения и применения композиций по настоящему изобретению и родственные способы.

Синтетические наноносители могут быть изготовлены при помощи разнообразных способов, известных в этой области. Например, синтетические наноносители могут быть изготовлены при помощи методов нанопреципитации, медленной фокусировки с использованием жидкостных каналов, распылительной сушки, испарения растворителя одинарной и двойной эмульсии, экстракции растворителями, фазовой сепарации, дробления, микроэмульсионных технологий, микрообработки, нанообработки, временных слоев, простой и комплексной коацервации и других методов, известных в данной области техники. Альтернативно или дополнительно описаны способы синтеза монодисперсного полупроводника с водным или органическим растворителем, проводники, магнетики, органические и другие наноматериалы (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 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; and Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; US Patents 5578325 and 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)).

Различные вещества могут быть инкапсулированы в синтетические наноносители, желательно при использовании методов, описанных в C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010). Другие методы, пригодные для инкапсулирования материалов в синтетические наноносители, могут применяться без ограничения методами, раскрытыми в патенте США 6632671, Unger October 14, 2003.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители получают в процессе нанопреципитации или распылительной сушки. Условия получения синтетических наноносителей могут изменяться в целях получения частиц желаемого размера или свойств (например, гидрофобность, гидрофильность, внешняя морфология, "липкость", форма и т. д.). Способ получения синтетических наноносителей

и условия получения (например, растворитель, температура, концентрация, скорость потока воздуха и т. д.) могут зависеть от материалов, связываемых с синтетическими наноносителями, и/или состава полимерной матрицы.

Если размер частиц, полученных любым из перечисленных способов, превышает желаемый размер, частицы могут быть калиброваны, например, при помощи фильтра.

Элементы (т. е. компоненты) изобретательских синтетических наноносителей (такие как группы, из которых состоит поверхность иммунореакции, группы-мишени, полимерные матрицы, антигены, иммунодепрессанты и т. п.) могут быть связаны со всем синтетическим наноносителем, например, одной или несколькими ковалентными связями или могут быть связаны одним или несколькими линкерами. Дополнительные методы функционализации синтетических наноносителей могут быть адаптированы из опубликованной заявки на патент США 20060002852, Saltzman et al., опубликованной заявки на патент США 20090028910, DeSimone et al., или опубликованной международной заявки WO 2008127532 Al, Murthy et al.

Альтернативно или дополнительно синтетические наноносители могут быть связаны с компонентами непосредственно или опосредованно через нековалентные взаимодействия. При нековалентном присоединении нековалентное связывание осуществляется посредством нековалентных взаимодействий, которые включают взаимодействия зарядов, взаимодействие между антигеном и антителом, координацию металла, физическую абсорбцию, взаимодействия по типу хозяин-гость, гидрофобные взаимодействия, стэкинг-взаимодействие ТТ, водородные связи, взаимодействия ванн дер Ваальса, магнитные взаимодействия, электростатические взаимодействия, взаимодействия между диполями и/или их комбинации. Такие пары могут располагаться в определенном порядке на внешней поверхности или на внутренней поверхности синтетического наноносителя по настоящему изобретению. В вариантах осуществления инкапсуляция и/или абсорбция является формой связывания. В вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители могут комбинироваться с антигеном при смешивании в одной основе или системе доставки.

Популяции синтетических наноносителей могут комбинироваться в целях получения фармацевтических лекарственных форм в соответствии с настоящим изобретением путем использования традиционных фармацевтических методов. Они включают смешивание жидкостей, при котором одна или несколько суспензий, каждая из которых содержит одно или несколько подмножеств наноносителей, непосредственно смешивают или объединяют в одной или нескольких емкостях, содержащих растворитель. Поскольку синтетические наноносители также могут производиться или храниться в порошкообразной форме, может применяться способ смешивания сухих порошков, как и ресуспензия двух или нескольких порошкообразных веществ в общей среде. В зависимости от свойств наноносителей и их потенциалов взаимодействия, преимущество может отдаваться одному или другому пути смешивания.

Типичные изобретательские композиции, содержащие синтетические наноносители, могут содержать неорганические или органические буферы (например, натриевые или калиевые соли фосфата, ацетата, карбоната или цитрата) и агенты, регулирующие pH (например, гидрохлоридная кислота, натрий или калий гидроксид, соли цитрата или ацетата, аминокислоты и их соли), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, альфа-токоферол), сурфактанты (например, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксэтилен9-10 нонилфенол, натрий дезоксихолат), стабилизаторы раствора и/или крио/лио стабилизаторы, (например, сахароза, лактоза, маннитол, трегалоза), агенты регуляции осмотичности (например, соли или сахара), антибактериальные агенты (например, бензойная кислота, фенол, гентамицин), противовспенивающие агенты (например, полидиметилсилозон), консерванты (например, тимерозал, 2-феноксэтанол, EDTA), стабилизаторы полимера и агенты регуляции вязкости (например, поливинилпирролидон, полоксамер 488, карбоксиметилцеллюлоза) и соразтворители (например, глицерол, полиэтиленгликоль, этанол).

Композиции в соответствии с изобретением включают изобретательские синтетические наноносители в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями. Композиции можно получать, используя конвенционные фармацевтические составляющие и технологии для получения полезных лекарственных форм. Технологии, приемлемые в практике настоящего изобретения, можно найти в Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc. и Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. В варианте осуществления изобретательские синтетические наноносители суспендируют в стерильном растворе соли для инъекций вместе с консервантом.

Следует понимать, что композиции изобретения можно получать любым удобным способом, и изобретение никоим образом не ограничено композициями, которые получают описанными способами. Выбор соответствующего способа может потребовать внимания к свойствам конкретных связываемых групп.

В некоторых вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители производят в стерильных условиях и заключительно стерилизуют. Это дает уверенность в том, что конечные композиции стерильны и неинфекционны и, таким образом, являются более безопасными по сравнению с нестерильными композициями. Это создает меру безопасности, поддающуюся измерению, особенно когда субъекты, получающие синтетические наноносители, имеют дефекты иммунитета, страдают от инфек-

ции и/или являются чувствительными к инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители могут быть лиофилизированы и хранятся в виде суспензии или лиофилизованного порошка в зависимости от стратегии формулировки по отношению к длительному хранению без потери активности.

Композиции изобретения можно вводить разнообразными способами, в том числе подкожно, интраназально, орально, внутривенно, интраперитонеально, внутримышечно, трансмукозально, сублингвально, ректально, через глаз, пульмонарно, внутрикожно, трансдермально, транскожно или используя комбинацию этих путей. Пути введения также включают введение путем ингаляции или пульмонарного аэрозоля. Способы приготовления аэрозоля широко известны специалистам в данной области (см., например, Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712; включенную посредством ссылки).

Терапевтические белки, предоставленные в качестве клеточной терапии изобретения, можно вводить парентерально, внутриартериально, интраназально или внутривенно, или путем инъекций в лимфатические узлы или переднюю камеру глаза, или путем местного введения в интересующий орган или ткань. Введение может осуществляться путем инъекции подкожно, интрастекально, интравентрикулярно, внутримышечно, интраперитонеально, интракоронально, интрапанкреально, внутривенно или бронхально.

Композиции изобретения можно вводить в эффективных количествах, как, например, в эффективных количествах, описанных в тексте настоящего документа. Дозировки лекарственных форм содержат различные количества популяций синтетических наноносителей и/или различные количества иммунодепрессантов и/или антигенов в соответствии с изобретением. Количество синтетических наноносителей и/или иммунодепрессантов и/или антигенов, присутствующих в изобретательских лекарственных формах, может варьировать в зависимости от природы антигенов и/или иммунодепрессантов, ожидаемой терапевтической пользы и других подобных параметров. В вариантах осуществления можно проводить определение оптимальной дозы, чтобы установить оптимальное терапевтическое количество популяции синтетических наноносителей и количество иммунодепрессантов и/или антигенов, присутствующих в лекарственной форме. В вариантах осуществления синтетические наноносители, и/или иммунодепрессанты, и/или антигены присутствуют в лекарственной форме в эффективном количестве для вызова толерогенного иммунного ответа на антигены при введении субъекту. Определить количества иммунодепрессантов и/или антигенов, эффективные для вызова толерогенного иммунного ответа можно, применяя для субъектов конвенционные методы исследования оптимального терапевтического количества. Изобретательские лекарственные формы можно вводить с различной частотой. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одного введения лекарственной формы достаточно для выработки фармакологически значимого ответа. В более предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере двух введений, по меньшей мере трех введений или по меньшей мере четырех введений лекарственной формы достаточно для выработки фармацевтически значимого ответа.

Профилактическое введение изобретательской композиции может быть назначено до начала болезни, расстройства или состояния, а терапевтическое введение может быть назначено после установления болезни, расстройства или состояния.

В некоторых вариантах осуществления введение синтетических наноносителей предпринимают, например, до введения терапевтического белка. В некоторых примерах осуществления изобретения синтетические наноносители вводят один или несколько раз, включая 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 дней до введения терапевтического белка без ограничения. Дополнительно или альтернативно синтетические наноносители можно вводить субъекту одновременно с введением терапевтического белка. В некоторых примерах осуществления изобретения синтетические наноносители вводят один или несколько раз, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 и т.д. дни, следующие за введением терапевтического белка без ограничения.

В некоторых вариантах осуществления поддерживающую дозу (например, композиции синтетического наноносителя, как предоставлено в настоящем документе) вводят пациенту после того, как первоначальное введение привело к толерогенному ответу у субъекта, например, чтобы поддерживать толерогенный эффект, полученный после начальной дозы, чтобы предотвратить нежелательную иммунную реакцию у субъекта, или чтобы предотвратить возникновение у субъекта риска нежелательного иммунного ответа или нежелательного уровня иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления поддерживающая доза является начальной дозой, полученной субъектом. В некоторых вариантах осуществления поддерживающая доза меньше начальной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления поддерживающая доза составляет приблизительно 3/4, приблизительно 2/3, приблизительно 1/2, приблизительно 1/3, приблизительно 1/4, приблизительно 1/8, приблизительно 1/10, приблизительно 1/20, приблизительно 1/25, приблизительно 1/50, приблизительно 1/100, приблизительно 1/1000, приблизительно 1/10,000, приблизительно 1/100,000 или приблизительно 1/1,000,000 (вес./вес.) начальной дозы.

Композиции и способы, предоставленные в настоящем документе, могут применяться для вызова или увеличения толерогенного иммунного ответа и/или для депрессии, модулирования, направления или перенаправления нежелательного иммунного ответа в целях достижения иммунодепрессии. Композиции

и способы, предоставленные в настоящем документе, могут применяться для вызова толерогенного иммунного ответа у субъекта, который получал, получает или будет получать терапевтический белок.

Примеры

Пример 1. Иммунный ответ на синтетические наноносители со связанным рапамицином с пептидом овальбумина или без него (323-339).

Материалы.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). Рапамицин был куплен у TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г был куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (номер продукта 1.41350.1001).

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл, растворенный в водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептида овальбумина в 0,13 М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. Рапамицин при 50 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения рапамицина в чистом метилен хлориде.

Раствор 3. PLGA при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA в чистом метилен хлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл 100 мМ рН 8 фосфатном буфере.

Способ получения синтетического наноносителя, содержащего рапамицин и овальбумин (323-339).

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,2 мл) и раствора 3 (1,0 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с при использовании Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с первичной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с при использовании Branson Digital Sonifier 250.

Эмульсию W1/O1/W2 добавляли в мерный стакан, содержащий 70 мМ рН8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метилен хлорид испарился, и сформировались синтетические наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 21000×g и 4°C в течение одного часа, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатном буферном растворе солей. Процедуру отмывки повторяли, а осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе солей, чтобы получить окончательную дисперсию синтетического наноносителя приблизительно 10 мг/мл.

Количества пептида и рапамицина в синтетических наноносителях определяли методом HPLC-анализа. Общую массу сухого синтетического наноносителя на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

Способ получения синтетического наноносителя, содержащего рапамицин.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания 0,13М раствора гидрохлоридной кислоты (0,2 мл), раствора 2 (0,2 мл) и раствора 3 (1,0 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с при использовании Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с первичной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с при использовании Branson Digital Sonifier 250.

Эмульсию W1/O1/W2 добавляли в мерный стакан, содержащий 70 мМ рН 8 раствор фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метилен хлорид испарился, и сформировались синтетические наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 21000×g и 4°C в течение одного часа, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатном буферном растворе солей. Процедуру отмывки повторяли, а осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе солей, чтобы получить окончательную дисперсию синтетического наноносителя приблизительно 10 мг/мл.

Количество рапамицина в синтетическом наноносителе было определено при помощи HPLC-анализа. Общую массу сухого синтетического наноносителя на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

Способ измерения нагрузки рапамицина.

Отбрали приблизительно 3 мг синтетических наноносителей и центрифугировали их, чтобы отделить надосадочную жидкость от осадка синтетических наноносителей. В осадок добавили ацетонитрил и обработали образец ультразвуком, чтобы удалить все нерастворимое вещество. Надосадочную жидкость

и осадок инжестировали в RP-HPLC, и уровень абсорбции составил 278 нм. $\mu\text{г}$ осадка использовали для подсчета % захвата (нагрузки), $\mu\text{г}$ надосадочной жидкости использовали для подсчета общего количества мкг.

Способ измерения нагрузки овальбумина (323-339).

Отбрали приблизительно 3 мг синтетических наночастиц и центрифугировали их, чтобы отделить надосадочную жидкость от осадка синтетических наночастиц. В осадок добавляли трифторэтанол и обрабатывали образец ультразвуком, чтобы растворить полимер, добавляли 0,2% трифторацетатную кислоту и центрифугировали образец, чтобы удалить все нерастворимое вещество. Надосадочную жидкость и осадок инжестировали в RP-HPLC, и уровень абсорбции составил 215 нм. $\mu\text{г}$ осадка использовали для подсчета % захвата (нагрузки), мкг надосадочной жидкости использовали для подсчета общего количества мкг.

Толерогенное влияние антиген-специфических дендритных клеток (Tdc) на развитие T-регуляторных клеток.

Исследование включало использование мышей линии OPII, у которых есть рецептор тангенных T-клеток, специфичный к иммунодоминантному овальбумину (323-339). В целях получения антиген-специфических tDC изолировали CD11c+ спленциты и вносили пептид овальбумина (323-339) *in vitro* в количестве 1 $\mu\text{г}/\text{мл}$ или не вносили антиген. Затем растворимый или инкапсулированный в наночастицы рапамицин добавляли к DCs на 2 ч, а затем интенсивно отмывали их, чтобы удалить из культуры свободный рапамицин. Очищенный респондер - CD4+CD25-клетки изолировали от мышей OPII и вводили в tDC в соотношении T к DC 10:1. Смесь tDC и OTII T-клеток затем культивировали в течение 4-5 дней, а затем анализировали встречаемость T-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxP3+) методом проточной цитометрии, как показано на фиг. 1. Области были выбраны на основе изотопического контроля.

Пример 2. Наночастицы мезопористого диоксида кремния со связанным ибупрофеном (пример возможного использования).

Сердцевины наночастиц мезопористого SiO_2 получают при помощи золь-гель процесса. Гексадецилтриметил-аммоний бромид (СТАВ) (0,5 г) растворяют в деионизированной воде (500 мл), а затем добавляют 2М водный раствор NaOH (3,5 мл) к раствору СТАВ. Раствор перемешивают в течение 30 мин, а затем в раствор добавляют тетраэтоксилан (TEOS) (2,5 мл). Полученный гель перемешивают в течение 3 ч при температуре 80°C. Образованный белый преципитат отделяют фильтрованием, а затем отмывают деионизированной водой и высушивают при комнатной температуре. Оставшийся сурфактант затем экстрагируют из частиц, суспендируя их в этаноловом растворе HCl в течение ночи. Частицы отмывают этанолом, центрифугируют и редисперсируют под действием ультразвука. Такую процедуру отмывки повторяют еще два раза.

Наночастицы SiO_2 затем подвергают функционализации аминогруппами с применением (3-аминопропил)-триэтоксилана (APTMS). Для этого частицы суспендируют в этаноле (30 мл) и добавляют в суспензию APTMS (50 мкл). Суспензию оставляют при комнатной температуре на два часа, а затем кипятят в течение 4 ч, поддерживая постоянный объем, периодически добавляя этанол. Оставшиеся реагенты удаляют, проводя пять циклов отмывки центрифугированием и редисперсией в чистом этаноле.

В отдельной реакции образуются зерна золота диаметром 1-4 нм. Воду, используемую в реакциях, сначала деионизируют, а затем дистиллируют из стекла. Воду (45,5 мл) наливают в 100 мл круглодонную колбу. Перемешивая, добавляют 0,2М водный NaOH (1,5 мл), затем 1%-ный водный раствор татракис (гидроксиметил)фосфонит хлорида (THPC) (1,0 мл). Через две минуты после введения раствора THPC добавляют 10 мг/мл водного раствора золотохлористо-водородной кислоты (2 мл), выдержанного по меньшей мере 15 мин. Зерна золота очищают водным диализом.

Для получения сердцевинно-оболочных наночастиц аминифункционализированные наночастицы SiO_2 , полученные ранее, смешивают с зернами золота в течение 2 ч при комнатной температуре. Частицы SiO_2 , связанные с золотом, отбирают центрифугированием и смешивают с водным раствором золотохлористо-водородной кислоты и бикарбонатом калия для получения оболочки из золота. Затем частицы отмывают центрифугированием и редисперсией в воде. Ибупрофен присоединяют, суспендируя частицы в растворе ибупрофена натрия (1 мг/л) в течение 72 ч. Затем свободный ибупрофен отмывают от частиц центрифугированием и редисперсией в воде.

Пример 3. Липосомы, содержащие циклоспорин А (пример возможного использования).

Липосомы получают путем гидратации тонкой пленки. 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) (32 мкмоль), холестерин (32 мкмоль) и циклоспорин А (6,4 мкмоль) растворяют в чистом хлороформе (3 мл). Полученный липидный раствор наливают в 50 мл круглодонную колбу и испаряют растворитель на вращающемся испарителе при температуре 60°C. Затем обрабатывают газообразным азотом, чтобы удалить остатки растворителя. Солевой раствор фосфатного буфера (2 мл) и пять полосок стекла добавляют в колбу и гидратируют липидную пленку, встряхивая колбу при 60°C в течение 1 ч до образования суспензии. Суспензию переносят в маленькую напорную трубку и обрабатывают ультразвуком при 60°C в течение четырех циклов из 30 с импульсов с 30 с паузой между импульсами. Затем суспензию оставляют, не тревожа, при комнатной температуре на 2 ч для полной гидратации. Липосомы отмывают

центрифугированием с последующим повторным суспендированием в свежем фосфатно-солевом буферном растворе.

Пример 4. Полимерный наноноситель, содержащий конъюгат полимера и рапамицина (пример возможного использования).

Получение PLGA-рапамицин конъюгата:

PLGA полимер с кислой концевой группой (7525 DLG1A, кислотное число 0,46 ммоль/г, Lakeshore Biomaterials; 5 г, 2,3 ммоль, 1,0 экв.) растворяют в 30 мл дихлорметана (DCM). N,N-Дициклогексилкарбонимид (1,2 экв., 2,8 ммоль, 0,57 г) добавляют к рапамицину (1,0 экв., 2,3 ммоль, 2,1 г) и 4-диметиламинопиридину (DMAP) (2,0 экв., 4,6 ммоль, 0,56 г). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 дней. Затем смесь фильтруют, чтобы отделить нерастворимую дициклогексилмочевину. Фильтрат концентрируют до объема приблизительно 10 мл и добавляют к 100 мл изопропилового спирта (IPA), чтобы преципитировать PLGA-рапамицин конъюгат. Слой IPA удаляют, а полимер затем отмывают 50 мл IPA и 50 мл метил-Т-бутилового эфира (MTBE). Полимер затем высушивают в вакууме при 35°C в течение 2 дней, чтобы получить белый твердый PLGA-рапамицин (приблизительно 6,5 г).

Получение наноносителя, содержащего PLGA-рапамицин конъюгат и пептид овальбумина (323-339).

Наноноситель, содержащий PLGA-рапамицин, получают способом, описанном в примере 1.

Растворы для получения наноносителей готовят следующим образом.

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор получают, растворяя пептид овальбумина в 0,13М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. PLGA-рапамицин при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор получают, растворяя PLGA-рапамицин в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор получают, растворяя PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,75 мл) и раствора 3 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с при использовании Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с первичной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с при использовании Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию W1/O1/W2 добавляли в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метилен хлорид испарился, и сформировались синтетические наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буферном растворе. Процедуру отмывки повторяли, а осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе, чтобы получить окончательную дисперсию синтетического наноносителя приблизительно 10 мг/мл.

Пример 5. Получение наноносителей с золотом (AuNC), содержащих рапамицин (пример возможного использования).

Получение HS-PEG-рапамицина:

Раствор PEG кислого дисульфида (1,0 экв.), рапамицин (2,0-2,5 экв.), DCC (2,5 экв.) и DMAP (3,0 экв.) в сухом DMF перемешивают при комнатной температуре на протяжении ночи. Нерастворимую дициклогексилмочевину удаляют фильтрованием, а фильтрат добавляют к изопропиловому спирту (IPA), чтобы преципитировать PEG-дисульфид-ди-рапамицин эстер, отмывают IPA и высушивают. Полимер затем обрабатывают трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлоридом в DMF, чтобы восстановить PEG дисульфид до тиол PEG рапамицин эстера (HS-PEG-рапамицин). Полученный полимер отделяют путем преципитации из IPA и высушивают, как описано выше, а затем анализируют Н NMR и GPC.

Получение золотых NC (AuNC).

Водный раствор 500 мл 1мМ H₂AuCl₄ нагревают до возврата флегмы в течение 10 мин с энергичным перемешиванием в круглодонной колбе объемом 1 л, оборудованной конденсатором. Раствор из 50 мл 40 мМ тринатрий цитрата затем быстро добавляют в перемешиваемый раствор. Полученный густовинный раствор выдерживают до возврата флегмы в течение 25-30 мин, отключают подогрев и охлаждают раствор до комнатной температуры. Затем раствор фильтруют через 0,8 мкм мембранный фильтр и получают раствор AuNC. AuNC характеризуют при помощи спектроскопии в видимой области и трансмиссионной электронной микроскопии. Эти AuNC имеют диаметр, приблизительно равный 20 нм, и окружены цитратом с пиком поглощения 520 нм.

Конъюгация AuNC с HS-PEG-рапамицином.

Раствор из 150 мкл HS-PEG-рапамицина (10 мкМ в 10 мМ, pH 9,0, карбонатном буфере) добавляют к 1 мл окруженных цитратом золотым наноносителям (1,16 нм) диаметром 20 нм, чтобы получить мо-

лярное отношение тиола к золоту 2500:1. Смесь перемешивают при комнатной температуре в присутствии аргона в течение 1 ч для полного замещения цитрата тиолом на наноносителях, содержащих золото. AuNC с PEG-рапамицином на поверхности затем очищают центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость декантируют, а осадок, содержащий AuNC-S-PEG-рапамицин, затем отмывают 1×PBS буфером. Очищенные наноносители, содержащие золото и PEG-рапамицин, затем ресуспендируют в подходящем буфере для анализа и биопроб.

Пример 6. Сердцевинно-оболочные наноносители с золотистым мезопористым диоксидом кремния, содержащие овальбумин (пример возможного использования).

Сердцевины наночастиц мезопористого SiO₂ получают при помощи золь-гельного процесса. Гексадецилтриметил-аммоний бромид (СТАВ) (0,5 г) растворяют в деионизированной воде (500 мл), а затем 2М водный раствор NaOH (3,5 мл) добавляют к раствору СТАВ. Раствор перемешивают в течение 30 мин, а затем к раствору добавляют тетраэтоксисилан (ТЕОС) (2,5 мл). Полученный гель перемешивают в течение 3 ч при температуре 80°C. Образующийся белый преципитат отделяют фильтрованием, затем отмывают деионизированной водой и высушивают при комнатной температуре. Оставшийся сурфактант затем отделяют от частиц суспендированием в этаноловом растворе HCl в течение ночи. Частицы отмывают этанолом, центрифугируют и редисперсируют под действием ультразвука. Такую процедуру отмывки повторяют еще два раза.

Наночастицы SiO₂ затем подвергают функционализации аминогруппами, применяя (3-аминопропил)-триэтоксисилан (АРТМС). Чтобы достичь этого, частицы суспендируют в этаноле (30 мл) и добавляют к суспензии АРТМС (50 мкл). Суспензию оставляют при комнатной температуре на 2 ч, а затем кипятят в течение 4 ч, поддерживая постоянный объем, периодически добавляя этанол. Оставшиеся реагенты удаляют с помощью пяти циклов отмывки центрифугированием и редисперсии в чистом этаноле.

В отдельной реакции образуются зерна золота диаметром 1-4 нм. Всю воду, используемую в реакциях, сначала деионизируют, а затем дистиллируют. Воду (45,5 мл) наливают в 100 мл круглодонную колбу. Перемешивая, добавляют 0,2М водный NaOH (1,5 мл), затем 1%-ный водный раствор татракис (гидроксиметил)фосфонит хлорида (ТНРС) (1,0 мл). Через две минуты после введения раствора ТНРС добавляют 10 мг/мл водного раствора золотохлористо-водородной кислоты (2 мл), выдержанного по меньшей мере 15 мин. Зерна золота очищают водным диализом.

Для получения сердцевинно-оболочных наноносителей аминифункционализированные наночастицы SiO₂, полученные ранее, смешивают с зернами золота в течение 2 ч при комнатной температуре. Частицы SiO₂, связанные с золотом, отбирают центрифугированием и смешивают с водным раствором золотохлористо-водородной кислоты и бикарбонатом калия для получения оболочки из золота. Затем частицы отмывают центрифугированием и редисперсией в воде. Тиолированный овальбумин (полученный при обработке овальбумина 2-иминотиолан гидрохлоридом) отделяют, суспендируя частицы в растворе тиолированного овальбумина (1 мг/л) в течение 72 ч. Частицы затем отмывают из осадка 1×PBS (pH 7,4), чтобы удалить чистый белок. Полученные кремний-золотые сердцевинно-оболочные наноносители, содержащие овальбумин, затем ресуспендируют в 1×PBS для анализа и биопроб.

Пример 7. Липосомы, содержащие рапамицин и овальбумин (пример возможного использования).

Липосомы получают путем гидратации тонкой пленки. 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) (32 мкмоль), холестерин (32 мкмоль) и рапамицин (6,4 мкмоль) растворяют в чистом хлороформе (3 мл). Этот липидный раствор добавляли в 10-мл стеклянную пробирку и растворитель удаляли в потоке газообразного азота и обезвоживали в течение 6 ч в вакууме. Многослойные везикулы получают путем гидратации пленки 2,0 мл 25 мМ MOPS буфера pH 8,5, содержащего избыток овальбумина. Пробирку вращают на вортексе, пока липидная пленка не отслоится с поверхности пробирки. Чтобы превратить многослойные везикулы в однослойные, проделывают десять циклов замораживания (жидким азотом) и размораживания (30°C водная баня). Затем образец растворяют в 1 мл 25 мМ MOPS буфера pH 8,5. Размер полученной липосомы гомогенизируют, применяя десятикратное экструдирование образца через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 200 нм. Полученные липосомы затем используют для анализа и биопроб.

Пример 8. Полимерные наноносители, состоящие из модифицированной полиаминокислоты с поверхностно конъюгированным овальбумином (пример возможного использования).

Этап 1. Получение поли(γ-глутаминовой кислоты) (γ-PGA), модифицированной этиловым сложным эфиром L-фенилаланина (L-PAE).

4,7 единицы ммоль γ-PGA (Mn=300 кДа) растворяют в 0,3н водном растворе NaHCO₃ (50 мл). L-PAE (4,7 ммоль) и EDC-HCl (4,7 ммоль) добавляют в раствор и перемешивают в течение 30 мин при 4°C. Затем раствор выдерживают при комнатной температуре, перемешивая, в течение 24 ч. Низкомолекулярные вещества удаляют диализной мембраной с MWCO 50 кДа. Полученный γ-PGA-графт-L-PAE получают замораживанием-высушиванием.

Этап 2. Получение наночастиц из γ-PGA-графт-L-PAE полимера.

Наночастицы, состоящие из γ-PGA-графт-L-PAE, получают методами преципитации и диализа. γ-

PGA-графт-L-PAE (20 мг) растворили в 2 мл DMSO, а затем добавили 2 мл воды для получения полупрозрачного раствора. Раствор затем диализировали с дистиллированной водой через трубку с целлюлозной мембраной (50000 MWCO) для получения наночастиц и удаления органических растворителей в течение 72 ч при комнатной температуре. Дистиллированную воду меняли каждые 12 ч. Полученный раствор наночастиц (10 мг/мл в воде) затем используют для конъюгации антигена.

Этап 3. Конъюгация овальбумина с γ -PGA наночастицами.

Поверхностные группы карбоксильной кислоты γ -PGA наночастиц (10 мг/мл) сначала активируются EDC и NHS (10 мг/мл каждого в фосфатном буфере, pH 5,8) в течение 2 ч при температуре окружающего воздуха. После отмывки осадка для удаления лишних EDC/NHS активированные наночастицы смешивают с 1 мл овальбумина (10 мг/мл) в солевом растворе фосфатного буфера (PBS, pH 7,4), и смесь выдерживают при 4-8°C в течение 24 ч. Полученный γ -PGA наночастицы, конъюгированные с овальбумином, дважды отмывают PBS и ресуспендируют в 5 мг/мл PBS для анализа и биопроб.

Пример 9. Эритропоэтин (ЕРО)-инкапсулирующие γ -PGA наночастицы (пример возможного использования).

Чтобы получить ЕРО-инкапсулирующие γ -PGA наночастицы, 0,25-4 мг ЕРО растворяют в 1 мл PBS (pH 7,4) и 1 мл γ -PGA-графт-L-PAE (10 мг/мл в DMSO) добавляют к раствору ЕРО. Полученный раствор центрифугируют при 14000×g в течение 15 мин и повторно промывают PBS. Полученные ЕРО-инкапсулирующие γ -PGA наночастицы затем ресуспендируют в PBS (5 мг/мл) для анализа и биопроб.

Пример 10. Получение золотых наноносителей (AuNC), содержащих овальбумин (пример возможного использования).

Этап 1. Получение золотых CN (AuNC).

Водный раствор 500 мл 1мМ HAuCl_4 нагревают до возврата флегмы в течение 10 мин с энергичным перемешиванием в круглодонной колбе объемом 1 л, оборудованной конденсатором. Раствор 50 мл 40 мМ тринатрий цитрата затем быстро добавляют в перемешиваемый раствор. Полученный густовинный раствор выдерживают до возврата флегмы в течение 25-30 мин, отключают подогрев и охлаждают раствор до комнатной температуры. Затем раствор фильтруют через 0,8 мкм мембранный фильтр и получают раствор AuNC. AuNC характеризуют при помощи спектроскопии в видимой области и трансмиссионной электронной микроскопии. Эти AuNC имеют диаметр, приблизительно равный 20 нм, и окружены цитратом с пиком поглощения 520 нм.

Этап 2. Конъюгация овальбумина с AuNC.

Раствор 150 мкл тиолированного овальбумина (10 мкМ в 10 мМ pH 9,0 карбонатном буфере) добавляют к 1 мл золотых наноносителей диаметром 20 нм, окруженных цитратом (1,16 нм) для получения молярного соотношения тиола к золоту 2500:1. Смесь перемешивают при комнатной температуре в присутствии аргона в течение 1 ч для полного замещения цитрата тиолом на наноносителях, содержащих золото. AuNC с овальбумином на поверхности затем очищают центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость декантируют, а осадок, содержащий AuNC-овальбумин, затем отмывают 1×PBS буфером. Очищенные золотые наноносители, содержащие овальбумин, затем ресуспендируют в подходящем буфере для анализа и биопроб.

Пример 11. Измерение толерогенного иммунного ответа на эритропоэтин альфа *in vivo* (пример возможного использования).

Мыши линии Balb/c иммунизированы эритропоэтином альфа в неполном адъюванте Фрейнда для вызова пролиферации CD4+Т-клеток, уровень которых изучали. Композицию изобретения, содержащую МНС класса II-рестриктивированные эпитопы эритропоэтина альфа и иммунодепрессант, последовательно и дозозависимо вводили подкожно. Эти же мыши затем снова получали эритропоэтин альфа, и у них снова измеряли уровень пролиферации CD4+Т-клеток. Затем отслеживались изменения популяции CD4+Т-клеток, при этом обнаружили, что уменьшение пролиферации CD4+Т-клеток при последовательном введении эритропоэтина альфа является толерогенным иммунным ответом.

Пример 12. Измерение толерогенных иммунных ответов на синтетические наноносители, содержащие иммунодепрессант и презентующий антиген APC *in vivo*.

Материалы и способы получения синтетического наноносителя.

Наноноситель 1.

Рапамицин был куплен у TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г был куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). Был синтезирован PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001).

Растворы готовили следующим образом.

Раствор 1. Рапамицин при 50 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения рапамицина в чистом метилен хлориде.

Раствор 2. PLGA при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA

в чистом метилен хлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения PLA-PEG в чистом метилен хлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ рН 8 фосфатного буфера.

Для получения наночастиц использовали эмульсию масло-в-воде. Эмульсия масло-в-воде была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,75 мл), раствора 3 (0,25 мл) и раствора 4 (3 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию масло-в-воде добавили в мерный стакан, содержащий 70 мМ рН 8 фосфатного буферного раствора (30 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метилен хлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 21000×g и 4°C в течение 45 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество рапамицина в синтетическом наночастице было определено при помощи HPLC-анализа. Общую массу сухого синтетического наночастицы на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

ID наночастицы	Эффективный диаметр (нм)	Содержание рапамицина (% вес/вес)
Наночастица 1	215	9,5

Наночастица 2.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дЛ/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок-сополимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) куплен у EMD Chemicals (Product Number 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом.

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептид овальбумина в 0,13М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения PLA-PEG в чистом метилен хлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ рН 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,75 мл) и раствора 3 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработке ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с начальной W1/O1 эмульсией, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250.

Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ рН 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество пептида в наночастице было определено при помощи HPLC-анализа. Общую массу сухого синтетического наночастицы на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

ID наночастицы	Эффективный диаметр (нм)	Содержание пептида (% вес/вес)
Наночастица 2	234	2,1

Наноноситель 3.

Симвастатин был куплен у LKT Laboratories, Inc. (2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114; Product Catalogue # S3449). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г был куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок сополимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизированный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом.

Раствор 1. Симвастатин при 50 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения симвастатина в чистом метиленхлориде.

Раствор 2. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метилен хлориде. Раствор был получен путем растворения PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Для получения наноносителей использовали эмульсию масло-в-воде. Эмульсия масло-в-воде была получена путем смешивания раствора 1 (0,15 мл), раствора 2 (0,75 мл), раствора 3 (0,25 мл) и раствора 4 (3 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком амплитуде 30% на 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию масло-в-воде налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наноносителей около 10 мг/мл.

Размер наноносителя определяли методом динамического рассеяния света. Количество симвастатина в наноносителе было определено при помощи HPLC-анализа. Общую массу сухого синтетического наноносителя на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

ID наноносителя	Эффективный диаметр (нм)	Количество симвастатина (% вес/вес)
Наноноситель 3	196	8,0

Наноноситель 4.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т- и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). Рапамицин был куплен у TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (номер продукта 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом:

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептида овальбумина в 0,13М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. Рапамицин при 50 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения рапамицина в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 5. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,2 мл), раствора 3 (0,75 мл) и раствора 4 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 5 (3,0 мл) с основной W1/O1 эмульсией, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250.

Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился,

и образовались наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 21000×g и 4°C в течение 45 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наноносителей около 10 мг/мл.

Размер наноносителя определяли методом динамического рассеяния света. Количество пептида и рапамицина в наноносителе определяли HPLC-анализом. Общую массу сухого синтетического наноносителя на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

ID наноносителя	Эффективный диаметр (нм)	Содержание рапамицина (% вес/вес)	Содержание пептида (% вес/вес)
4	227	9,0	2,5

Наноноситель 5.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т- и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). Симвастин был куплен у LKT Laboratories, Inc. (2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114; Product Catalogue # S3449). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом.

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептид овальбумина в 0,13М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. Симвастин при 50 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения симвастина в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор был получен путем растворения PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 5. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствор 1 (0,2 мл), раствор 2 (0,15 мл), раствор 3 (0,75 мл), и раствор 4 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 5 (3,0 мл) с основной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250.

Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наноносители. Часть синтетических наноносителей отмывали, поместив суспензию синтетического наноносителя в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наноносителей около 10 мг/мл.

Размер наноносителя определяли методом динамического рассеяния света. Количество пептида и симвастина в наноносителе определяли HPLC-анализом. Общую массу сухого синтетического наноносителя на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

ID наноносителя	Эффективный диаметр (нм)	Количество симвастина (% вес/вес)	Содержание пептида (% вес/вес)
Наноноситель 5	226	2,7	1,9

In vivo введение 1.

Селезенки, полученные от мышей линий B6.Cg-Tg(TcrαTcrβ)425Cbn/J (OTII) и C57BL/6 (B6), механически измельчали и отдельно пропускали через 70 мкм сито, чтобы получить суспензию из одиночных клеток. Затем путем двухэтапного процесса получали очищенные CD4⁺CD25⁻клетки. При помощи магнитного сортировщика клеток Miltenyi Biotec AutoMACS клетки селезенки сначала поместили набором для изоляции CD4⁺Т-клеток II, а непомеченную фракцию отделили от CD25⁺ клеток при помощи набора для элиминации CD25. Очищенные B6 клетки окрашивали внутриклеточным красителем, эфиром

карбоксифлуоресцин сукцинимидила (CFSE), а после смешивали в равных концентрациях с очищенными ОПИ клетками. Затем их вводили внутривенно (i.v.) реципиентным мышам B6.SJL-Ptprc^a/BoyAi (CD45.1).

На следующий день реципиентные мыши CD45.1 получили таргетные толерогенные синтетические частицы вакцины (²SVP). Они имели нагрузку пептида овальбумина (323-339) (OVA³²³⁻³³⁹), рапамицина (Rapa) и/или симвастина (Simva) и вводились подкожно (s.c.).

Толерогенное лечение заключалось в инъекции и сопровождалось еще 4 инъекциями с промежуток 2 недели между ними. После того как курс лечения был окончен, реципиентных животных CD45.1 умертвляли, брали их селезенки и подколенные лимфатические узлы, механически измельчали и отдельно пропускали через 70 мкм сито, чтобы получить суспензию из одиночных клеток. Клетки селезенки отделяли от красных кровяных клеток (RBC) путем выдерживания в RBC-лизирующем буфере (Stem Cell Technologies) и проводили подсчет как клеток селезенки, так и клеток лимфатических узлов.

Клетки селезенки или лимфатических узлов культивировали в СМ (полная среда), дополненной 10Е/мл IL-2, повторно стимулировали ОПИ при $0,3 \times 10^6$ клеток/лунка в 96-луночных круглодонных (RB) планшетах и инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Клетки распределили на день 2 и собрали на день 5. Надосадочные жидкости собирали и замораживали, при этом клетки были окрашены для проведения фенотипического анализа проточной цитометрией. Клетки анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACSanto.

In vivo введение 2.

Селезенки, полученные от мышей линий B6.Cg-Tg(TcrαTcrβ)425Cbn/J (ОПИ) и C57BL/6 (B6), механически измельчали и отдельно пропускали через 70 мкм сито, чтобы получить суспензию из одиночных клеток. Purified CD4+CD25- клетки затем очищали путем двухэтапного процесса, используя магнитный сортировщик клеток Miltenyi Biotec AutoMACS. Клетки селезенки метили набором для изоляции CD4+Т-клеток II Miltenyi's. Непомеченную фракцию CD4+Т-клеток отделили от CD25⁺ клеток при помощи набора для элиминации CD25. Очищенные CD4 клетки от мышей B6 затем окрашивали внутриклеточным красителем, сложным карбоксифлуоресцеиновым эфиром сукцинимидила (CFSE), а после смешивали при равных концентрациях с очищенными клетками ОПИ. Затем их вводили внутривенно (i.v.) реципиентным мышам B6.SJL-Ptprc^a/BoyAi (CD45.1).

На следующий день реципиентные мыши CD45.1 получили таргетные толерогенные синтетические частицы вакцины. Они имели нагрузку пептида овальбумина (323-339) (OVA³²³⁻³³⁹), рапамицина (Rapa) и/или симвастина (Simva) и вводились подкожно (s.c.) или внутривенно (i.v.).

После того как курс лечения был окончен, реципиентных животных CD45.1 умертвляли, брали их селезенки и подколенные лимфатические узлы, механически измельчали и отдельно пропускали через 70 мкм сито, чтобы получить суспензию из одиночных клеток. Клетки селезенки отделяли от красных кровяных клеток (RBCs) путем смешивания с RBC-лизирующим буфером (Stem Cell Technologies) и проводили подсчет как клеток селезенки, так и клеток лимфатических узлов.

Клетки селезенки или лимфатических узлов культивировали в СМ, дополненной 10Е/мл IL-2, повторно стимулировали 1 мкМ ОПИ при $0,3 \times 10^6$ клеток/лунка в 96-луночных круглодонных (RB) планшетах и инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Клетки распределили на день 2 и собрали на день 5. Надосадочные жидкости собирали и замораживали, при этом клетки были окрашены для проведения фенотипического анализа проточной цитометрией. Клетки анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACSanto.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 2 и 3 (иммуномодулятор 1: рапамицин; иммуномодулятор 2: симвастин). Фигура показывает эффекты in vivo и демонстрирует, что антиген-специфическая экспансия эффекторных иммунных клеток уменьшается синтетическими наноносителями, содержащими антиген и иммунодепрессанты, по сравнению только с антигеном или с синтетическими наноносителями, содержащими только антиген без иммуностимулирующей молекулы.

Пример 13. Толерогенные иммунные ответы с синтетическими наноносителями.

Материалы и способы.

Наноноситель 1.

Белок овальбумин куплен у Worthington Biochemical Corporation (730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701; Product Code 3048). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дЛ/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001). Был синтезирован PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да. Натрия холат гидрат был куплен у Sigma-Aldrich Corp. (3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103; Product Code C6445).

Растворы были приготовлены следующим образом:

Раствор 1. Овальбумин при 50 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе. Раствор готовили, растворяя овальбумин в фосфатно-солевом буферном растворе при комнатной температуре.

Раствор 2. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл и натрия холат гидрат при 10 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,75 мл) и раствора 3 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с основной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги, и центрифугуя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество пептида и симвастатина в наночастице определяли HPLC-анализом. Общую массу сухого синтетического наночастицы на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

Наночастица ID	Эффективный диаметр (нм)	Содержание белка (% вес/вес)
1	191	10,1

Наночастица 2.

Белок овальбумина куплен у Worthington Biochemical Corporation (730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701; Product Code 3048). Рапамицин был куплен у TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дЛ/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001). Натрия холат гидрат был куплен у Sigma-Aldrich Corp. (3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103; Product Code C6445).

Растворы были приготовлены следующим образом:

Раствор 1. Овальбумин при 50 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе. Раствор готовили, растворяя овальбумин в фосфатно-солевом буферном растворе при комнатной температуре.

Раствор 2. Рапамицин при 50 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя рапамицин в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 5. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл и натрия холат гидрат при 10 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,2 мл) и раствора 3 (0,75 мл) и раствора 4 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 5 (3,0 мл) с основной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги и центрифугуя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество рапамицина на наночастице определяли HPLC-анализом. Количество белка на наночастице определяли о-фталальдегидным флуориметрическим анализом. Общую массу сухого синтетического наночастицы на мл суспензии определяли гравиметрическим методом.

Наноноситель ID	Эффективный диаметр (нм)	Содержание рапамицина (% вес/вес)	Содержание белка (% вес/вес)
2	172	7,4	7,6

Иммунизация.

Целью эксперимента было измерение эффектов инкапсулированного (t^2 SVP) иммунодепрессанта на происходящие ответы антител путем измерения количества антиген-специфических иммуноглобулинов. Одну группу животных оставили неиммунизированными для контроля. Две группы животных иммунизировали, применяя "пассивное введение" овальбумина или активную иммунизацию OVA и CpG 3 инъекциями (d0, d14 и d28) с последующим измерением титров антител с промежутком в одну или две недели. Другие две группы получали такую же иммунизацию, но одновременно с лечением каждые 2 недели получали бустер-дозу. Каждую из этих групп разделили на три подгруппы, чтобы проверить способность каждого вида лечения модифицировать титры образуемых антител. Контрольная подгруппа не получала толерогенного лечения. Два других вида лечения применяли в других подгруппах, включая применение NP, несущих только белок OVA или в комбинации с иммунодепрессантом.

В целях иммунизации животные получали 20 мкл/конечность OVA+CpG (12,5 мкг OVA+10 мкг CpG) в обе задние конечности подкожно или 25 мкг OVA внутривенно 100 мкл. Толерогенное лечение включало введение 200 мкл t^2 SVP внутривенно с применением 10 мкг OVA. Наночастицы представлялись в содержимом 500 мкг/мл OVA. t^2 SVP растворяли таким образом, что всем группам инъецировали одинаковые количества OVA.

Измерение количества IgG.

Измеряли уровни антител IgG. Blocker Casein в PBS (Thermo Fisher, Catalog #37528) использовали в качестве растворителя. 0,05% Tween-20 в PBS использовали в качестве промывочного буфера, приготовив его путем смешивания 10 мл Tween-20 ((Sigma, Catalog #P9416-100мл) с 2 л 10× PBS реакционной смеси (PBS: OmniPur® 10× PBS Liquid Concentrate, 4L, EMD Chemicals, Catalog #6505) и 18 л деионизированной воды.

Белок OVA в реакционной концентрации 5 мг/мл использовали в качестве материала покрытия. Раствор 1:1000 до 5 мкг/мл использовали в качестве рабочей концентрации. Каждую лунку планшетов покрывали 100 мкл растворенным OVA на лунку, планшеты укупоривали пленкой (VWR catalog #60941-120) и выдерживали в течение ночи при 4°C. В качестве планшетов для исследования использовали Costar901796-луночные плоскодонные планшеты, Costar9017.

96-луночные планшеты или тубы из слабосвязанного пропилена использовали в качестве установочных пластин, в которых образцы готовили к помещению на аналитический планшет. Аналитические планшеты не содержали никаких антигенов, и, следовательно, сывороточные антитела не связывались с планшетом во время постановки образцов. Установочные планшеты использовали для подготовки образцов, чтобы минимизировать связывание, возможное при приготовлении или дозировании образцов, если для приготовления образцов использовать планшет с антигенами на поверхности. Перед подготовкой образцов на установочном планшете лунки покрывали растворителем, чтобы предотвратить любое неспецифическое связывание, планшет запечатывали и инкубировали при 4°C на протяжении ночи.

Аналитические планшеты затем трижды промывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней промывки. После отмывки добавляли 300 мкг растворителя в каждую лунку аналитического планшета (планшетов), чтобы предотвратить неспецифическое связывание, и планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки готовили на установочном планшете, используя соответствующие стартовые растворы. Стартовые растворы также иногда получали в пробирках объемом 1,5 мл, используя растворитель. Соответствующие стартовые растворы определяли, где это было возможно, на основании предшествующих данных. Когда предшествующие данные были неизвестны, самый слабый стартовый раствор был 1:40. После разбавления 200 мкл стартового раствора образца сыворотки переносили в соответствующую лунку установочного планшета.

Образец расположения на установочном планшете следующим образом: колонки 2 и 11 содержали стандарт изотипа антиовальбуминового моноклонального IgG2b (AbCam, ab17291), растворенный в 1 мкг/мл (1:4000 растворение). Колонки 3-10 содержали образцы сыворотки (в соответствующих растворах). Колонки 1 и 12 не использовали для образцов или стандартов, чтобы избежать субъективных ошибок измерения, вызванных граничным эффектом. Вместо этого колонки 1 и 12 содержали 200 мкл растворителя. Нормальную мышиную сыворотку, растворенную 1:40, использовали в качестве негативного контроля. Антимышиный IgG2a растворяли 1:500 из 0,5 мг/мл реакционной смеси (BD Bioscience) использовали в качестве изотопического контроля.

Когда все образцы были приготовлены на установочном планшете, планшет закупоривали и выдерживали при 4°C до полного связывания на аналитическом планшете. Аналитические планшеты трижды отмывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней

промывки. После отмывки 100 мкл растворителя добавляли во все лунки В-Н аналитических планшетов. Для переноса образцов с установочного планшета на аналитический планшет использовали 12-канальную пипетку. Перед переносом образцы смешивали, переливая пипеткой 150 мкл разбавленной сыворотки туда и назад 3 раза. После смешивания 150 мкл каждого образца переносили с установочного планшета и добавляли в ряд А соответствующего аналитического планшета.

После того как стартовые растворы каждого образца перенесли с установочного планшета в ряд А аналитического планшета, растворы сыворотки добавляли пипеткой на аналитический планшет следующим образом: 50 мкл каждого образца сыворотки удаляли из ряда А 12-канальной пипеткой и смешивали со 100 мкл растворителя, предварительно добавленного в каждую лунку ряда В. Эту процедуру повторяли до заполнения всего планшета. После раскапывания раствора из последнего ряда 50 мкл жидкости удаляли из лунок последнего ряда и отбрасывали, получая конечный объем 100 мкл в каждой лунке аналитического планшета. После приготовления образцов растворов на аналитических планшетах планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 2 ч.

После инкубации планшеты трижды отмывали промывочным буфером. Идентифицирующее анти-тело (козье анти-тело против IgG мыши, конъюгированное с HRP, AbCam ab98717) развели 1:1500 (0,33 мкг/мл) в растворителе и 100 мкл разведенного антитела добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем трижды промывали отмывочным буфером, включая в каждую промывку время выдержки 30 с.

После отмывки идентифицирующий субстрат добавляли в лунки. Равные части субстрата А и субстрата В (BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214) смешивали непосредственно перед помещением на аналитические планшеты, 100 мкл раствора смешанного субстрата добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл стоп-раствора (2 н H_2SO_4) в каждую лунку по прошествии 10 мин. Оптическую плотность (OD) лунок измеряли непосредственно после добавления стоп-раствора на спектрофотометр для прочтения планшетов при 450 нм с субтракцией 570 нм. Данные анализировали при помощи программного обеспечения SoftMax Molecular Device Pro v5.4. В некоторых случаях строили график логистической кривой с четырьмя параметрами, на оси х (логарифмическая шкала) отложен раствор, на оси у (линейная шкала) отложено значение OD, и для каждого образца определяли половину максимального значения (EC_{50}). Шаблон планшета в верхней части макета был скорректирован с учетом разведения каждого образца (по 1 на колонку).

Результаты.

Фиг. 4 показывает увеличение выработки антиген-специфического антитела с наноносителями, содержащими пептид антиген и иммунодепрессант, по сравнению с наноносителями, содержащими только пептид. График 3 показывает, что применение мощного иммуностимулятора, CpG, в некоторых случаях противодействовало толерогенным эффектам синтетических наноносителей, содержащих рапамицин.

Пример 14. Толерогенные иммунные ответы с синтетическими наноносителями Материалы и способы.

Наноносители получали так, как описано в предыдущем примере (пример 13).

Иммунизация.

Целью эксперимента было определить эффекты инкапсулированного (t^2SVP) иммунодепрессанта на появление ответов антител, измеряя количество антиген-специфических иммуноглобулинов у животных, получающих иммуногенное и NP-лечение одновременно. Одна группа животных осталась неиммунизированной для контроля (но получала лечение). Две группы животных иммунизировали, применяя "пассивное введение" овалбумина или активную иммунизацию OVA и CpG 3 инъекциями под лопатку. Каждая из этих групп получала инъекции наночастиц (NP) с периодичностью в две недели, и в день, предшествующий бустер-инъекции, измерялись уровни Ig против OVA. В целях иммунизации животные получали 100 мкл OVA+CpG подкожно (под лопатку) или 25 мкг OVA внутривенно в 100 мкл. Толерогенное лечение представляло собой введение 100 мкл t^2SVP внутривенно. Наноносители предоставлялись в 5 мг/мл. t^2SVP растворяли таким образом, что все группы получали одинаковое количество OVA. Инъекции произвоили в d0, d14, d28, d42, d56.

Измерение количества IgG.

Измеряли уровни антитела IgG. Blocker Casein в PBS (Thermo Fisher, Catalog #37528) использовали в качестве растворителя. 0,05% Tween-20 в PBS использовали в качестве отмывочного буфера, приготовив его путем смешивания 10 мл of Tween-20 ((Sigma, Catalog #P9416-100мл) с 2 л 10×PBS реакционной смеси (PBS: OmniPur® 10×PBS, жидкий концентрат, 4 л, EMD Chemicals, Catalog #6505) с 18 л деионизированной воды.

Белок OVA при концентрации реакционной смеси 5 мг/мл использовали в качестве материала покрытия. Использовали разведение 1:1000 до 5 мкг/мл в качестве рабочей концентрации. Каждую лунку планшетов покрывали 100 мкл растворенным OVA на лунку, планшеты укупоривали пленкой (VWR catalog #60941-120) и выдерживали в течение ночи при 4°C. В качестве планшетов для исследования ис-

пользовали Costar9017 96-луночные плоскодонные планшеты, Costar9017.

96-луночные планшеты или тубы из слабосвязанного пропилена использовали в качестве установочных планшетов, в которых образцы готовили к помещению на аналитический планшет. Аналитические планшеты не содержали никаких антигенов, и, следовательно, сывороточные антитела не связывались с планшетом во время постановки образцов. Установочные планшеты использовали для подготовки образцов, чтобы минимизировать связывание, возможное при приготовлении или дозировании образцов, если для приготовления образцов использовать планшет с антигенами на поверхности. Перед подготовкой образцов на установочном планшете лунки покрывали растворителем, чтобы предотвратить любое неспецифическое связывание, планшет запечатывали и инкубировали при 4°C на протяжении ночи.

Аналитические планшеты затем трижды промывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней отмывки. После отмывки добавляли 300 мкл растворителя в каждую лунку аналитического планшета (планшетов), чтобы предотвратить неспецифическое связывание, и планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки готовили на установочном планшете, используя соответствующие стартовые растворы. Стартовые растворы также иногда получали в пробирках объемом 1.5 мл, используя растворитель. Соответствующие стартовые растворы определяли, где это было возможно, на основании предшествующих данных. Когда предшествующие данные были неизвестны, самый слабый стартовый раствор был 1:40. После разбавления 200 мкл стартового раствора образца сыворотки переносили в соответствующую лунку установочного планшета.

Типичное расположение на установочном планшете следующее: колонки 2 и 11 содержали стандарт изотипа антиовальбуминового моноклонального IgG2b (AbCam, ab17291), растворенный в 1 мкг/мл (1:4000 растворение). Колонки 3-10 содержали образцы сыворотки (в соответствующих растворах). Колонки 1 и 12 не использовали для образцов или стандартов, чтобы избежать субъективных ошибок измерения, вызванных граничным эффектом. Вместо этого колонки 1 и 12 содержали 200 мкл растворителя. Нормальную мышиную сыворотку, растворенную 1:40, использовали в качестве негативного контроля. Антитло против мышинного IgG2a растворяли 1:500 из 0,5 мг/мл реакционной смеси (BD Bioscience) использовали в качестве изотипного контроля.

Когда все образцы были приготовлены на установочном планшете, планшет закупоривали и выдерживали при 4°C до полного связывания на аналитическом планшете. Аналитические планшеты трижды отмывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней отмывки. После отмывки 100 мкл растворителя добавляли во все лунки в рядах В-Н аналитических планшетов. Для переноса образцов с установочного планшета на аналитический планшет использовали 12-канальную пипетку. Перед переносом образцы смешивали, переливая пипеткой 150 мкл разбавленной сыворотки туда и назад 3 раза. После смешивания 150 мкл каждого образца переносили с установочного планшета и добавляли в ряд А соответствующего аналитического планшета.

После того как стартовые растворы каждого образца перенесли с установочного планшета в ряд А аналитического планшета, растворы сыворотки добавляли пипеткой на аналитический планшет следующим образом: 50 мкл каждого образца сыворотки удаляли из ряда А 12-канальной пипеткой и смешивали с 100 мкл растворителя, предварительно добавленного в каждую лунку ряда В. Эту процедуру повторяли до заполнения всего планшета. После раскатывания раствора из последнего ряда 50 мкл жидкости удаляли из лунок последнего ряда и отбрасывали, получая конечный объем 100 мкл в каждой лунке аналитического планшета. После приготовления образцов растворов на аналитических планшетах планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 2 ч.

После инкубации планшеты трижды отмывали промывочным буфером. Идентифицирующее антитело (козье антитело против IgG мыши, конъюгированное с HRP, AbCam ab98717) развели 1:1500 (0,33 мкг/мл) в растворителе и 100 мкл разведенного антитела добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем трижды промывали отмывочным буфером, включая в каждую отмывку время выдержки по меньшей мере 30 с.

После отмывки идентифицирующий субстрат добавляли в лунки. Равные части субстрата А и субстрата В (BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214) соединяли непосредственно перед помещением в аналитические планшеты, добавляли в каждую лунку 100 мкл раствора смешанного субстрата и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл стоп-раствора (2 н H₂SO₄) в каждую лунку по прошествии 10 мин. Оптическую плотность (OD) лунок измеряли непосредственно после добавления стоп-раствора на спектрофотометр для прочтения планшетов при 450 нм с субтракцией 570 нм. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Molecular Device SoftMax Pro v5.4. В некоторых случаях строили график логистической кривой с четырьмя параметрами, на оси х (логарифмическая шкала) отложен раствор, на оси у (линейная шкала) отложено значение OD, и для каждого образца определяли половину максимального значения (EC50). Шаблон планшета в верхней части макета был скорректирован с учетом разведения каждого образца (по 1 на колонку).

Результаты.

Фиг. 5 показывает уменьшение образования антиген-специфического антитела при введении нано-

носителей, содержащих антиген и иммунодепрессант, по сравнению с наночастицами, содержащими только антиген. Данные снова показывают, что применение мощного иммуностимулятора, CpG, в некоторых случаях противодействовало толерогенным эффектам синтетических наночастиц, содержащих рапамицин.

Пример 15. Определение эффектов наночастиц с антигенами и иммунодепрессантами.

Материалы и способы.

Наночастица 1.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом.

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор готовили, растворяя пептид овальбумина в 0,13М растворе гидрохлоридной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ pH 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,75 мл) и раствора 3 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 4 (3,0 мл) с основной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию W1/O1/W2 наливали в мерный стакан, содержащий 70 мМ pH 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метиленхлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги и центрифугуя ее при 75600×g и 4°C в течение 35 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество рапамицина на наночастице определяли HPLC-анализом. Количество белка на наночастице определяли орфталальдегидным флуорометрическим анализом.

Наночастица ID	Эффективный диаметр (нм)	Содержание пептида (% вес/вес)
1	234	2,1

Наночастица 2.

Пептид овальбумина 323-339, пептид, состоящий из 17 аминокислот, известный как эпитоп белка овальбумина Т и В-клеток, куплен у Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609). Рапамицин был куплен у TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017). PLGA с соотношением лактид:гликолид 3:1 и удельной вязкостью 0,75 дл/г куплен у SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A). PLA-PEG блок со-полимер с PEG-блоком приблизительно 5000 Да и PLA-блоком приблизительно 20000 Да был синтезирован. Поливиниловый спирт (85-89% гидролизный) был куплен у EMD Chemicals (продукт номер 1.41350.1001).

Растворы были приготовлены следующим образом.

Раствор 1. Пептид овальбумина 323-339 при 20 мг/мл в растворителе водном растворе гидрохлоридной кислоты. Раствор готовили, растворяя пептид овальбумина в 0,13М растворе хлористо-водородной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2. Рапамицин при 50 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя рапамицин в чистом метиленхлориде.

Раствор 3. PLGA при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLGA в чистом метиленхлориде.

Раствор 4. PLA-PEG при 100 мг/мл в метиленхлориде. Раствор готовили, растворяя PLA-PEG в чистом метиленхлориде.

Раствор 5. Поливиниловый спирт при 50 мг/мл в 100 мМ рН 8 фосфатном буфере.

Сначала приготовили основную водно-масляную эмульсию. W1/O1 была получена путем смешивания раствора 1 (0,2 мл), раствора 2 (0,2 мл) и раствора 3 (0,75 мл) и раствора 4 (0,25 мл) в маленькой напорной трубке и обработки ультразвуком с амплитудой 50% на 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Затем приготовили вторичную эмульсию (W1/O1/W2), смешивая раствор 5 (3,0 мл) с основной эмульсией W1/O1, перемешивая на вортексе в течение 10 с и обрабатывая ультразвуком с амплитудой 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Эмульсию W1/O1/W2 налили в мерный стакан, содержащий 70 мМ рН 8 раствора фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы метилхлорид испарился, и образовались наночастицы. Часть синтетических наночастиц отмывали, поместив суспензию синтетического наночастицы в пробирку для центрифуги и центрифугируя ее при 21000×g и 4°C в течение 45 мин, удаляя надосадочную жидкость и ресуспендируя осадок в фосфатно-солевом буфере. Процедуру отмывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере для окончательной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Размер наночастицы определяли методом динамического рассеяния света. Количество рапамицина на наночастице определяли HPLC-анализом. Количество белка на наночастице определяли орфталальдегидным флуорометрическим анализом.

Наночастица ID	Эффективный диаметр (нм)	Содержание рапамицина (% вес/вес)	Содержание пептида (% вес/вес)
2	227	9,0	2,5

Иммунизация.

Животные получали иммунизацию каждые 2 недели одновременно с лечением. Каждую из этих групп разделили на две подгруппы, чтобы проверить способность каждого вида лечения модифицировать титры образуемых Ig. Контрольная подгруппа не получала толерогенное лечение. Две подгруппы получали наночастицу, несущую только пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉ или его комбинацию с рапамицином.

Иммунизацию осуществляли следующими путями (значения на одно животное): 20 мкл/конечность OVA+CrG (12,5 мкг OVA+10 мкг CrG) в обе задние конечности подкожно. Различные виды толерогенного лечения осуществлялись следующими путями (значения на одно животное): 200 мкл наночастиц предоставлялось в 100 мкг/мл OVA₃₂₃₋₃₃₉ содержимого.

Измерение количества IgG.

Измеряли уровни антитела IgG. Blocker Casein в PBS (Thermo Fisher, Catalog #37528) использовали в качестве растворителя. 0,05% Tween-20 в PBS использовали в качестве отмывочного буфера, приготовив его путем смешивания 10 мл Tween-20 ((Sigma, Catalog #P9416-100mL) с 2 л 10×PBS реакционной смеси (PBS: OmniPur® 10×PBS, жидкий концентрат, 4 л, EMD Chemicals, Catalog #6505) с 18 л деионизированной воды.

Белок OVA при концентрации реакционной смеси 5 мг/мл использовали в качестве материала покрытия. Использовали 1:1000 до 5 мкг/мл в качестве рабочей концентрации. Каждую лунку аналитических планшетов покрывали 100 мкл разведенного OVA на лунку, планшеты герметизировали при помощи герметизирующей пленки (VWR каталог # 60941-120) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Costar9017 96-луночные плоскодонные планшеты были использованы в качестве аналитических планшетов, Costar9017.

96-луночные планшеты или тубы из слабосвязанного пропилена использовали в качестве установочных планшетов, в которых образцы готовили к помещению на аналитический планшет. Аналитические планшеты не содержали никаких антигенов, и следовательно, сывороточные антитела не связывались с планшетом во время постановки образцов. Установочные планшеты использовали для подготовки образцов, чтобы минимизировать связывание, возможное при приготовлении или дозировании образцов, если для приготовления образцов использовать планшет с антигенами на поверхности. Перед подготовкой образцов на установочные планшеты лунки покрывали растворителем, чтобы предотвратить любое неспецифическое связывание, планшет запечатывали и инкубировали при 4°C на протяжении ночи.

Аналитические планшеты затем трижды промывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней промывки. После отмывки добавляли 300 мкл растворителя в каждую лунку аналитического планшета (планшетов), чтобы предотвратить неспецифическое связывание, и планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки готовили на установочном планшете, используя соответствующие стартовые растворы. Стартовые растворы также иногда получали в пробирках объемом 1,5 мл, используя растворитель. Соответствующие стартовые растворы определяли, где это было возможно, на основании предшествующих данных. Когда предшествующие данные были неизвестны, самый слабый стартовый раствор был 1:40. После разбавления 200 мкл стартового раствора образца сыворотки переносили в соответствующую лунку установочного планшета.

Образец расположения на установочном планшете следующий: Колонки 2 и 11 содержали стандарт

изотипа оноклонального IgG2b против овальбумина (AbCam, ab17291), растворенный в 1 мкг/мл (1:4000 растворение). Колонки 3-10 содержали образцы сыворотки (в соответствующих растворах). Колонки 1 и 12 не использовали для образцов или стандартов, чтобы избежать субъективных ошибок измерения, вызванных граничным эффектом. Вместо этого колонки 1 и 12 содержали 200 мкл растворителя. Сыворотку нормальной мыши, растворенную 1:40, использовали в качестве негативного контроля. Антитело против мышинового IgG2a растворяли 1:500 из 0,5 мг/мл реакционной смеси (BD Bioscience) использовали в качестве изотопического контроля.

Когда все образцы были приготовлены на установочном планшете, планшет закупоривали и выдерживали при 4°C до полного связывания на аналитическом планшете. Аналитические планшеты трижды отмывали промывочным буфером, полностью испаряя промывочный буфер из лунок после последней промывки. После отмывки 100 мкл растворителя добавляли во все лунки В-Н аналитических планшетов. Для переноса образцов с установочного планшета на аналитический планшет использовали 12-канальную пипетку. Перед переносом образцы смешивали, переливая пипеткой 150 мкл разбавленной сыворотки туда и обратно 3 раза. После смешивания 150 мкл каждого образца переносили с установочного планшета и добавляли в ряд А соответствующего аналитического планшета.

После того как стартовые растворы каждого образца перенесли с установочного планшета в ряд А аналитического планшета, растворы сыворотки добавляли пипеткой на аналитический планшет следующим образом: 50 мкл каждого образца сыворотки удаляли из ряда А 12-канальной пипеткой и смешивали со 100 мкл растворителя, предварительно добавленного в каждую лунку ряда В. Эту процедуру повторяли до заполнения всего планшета. После раскатывания раствора из последнего ряда 50 мкл жидкости удаляли из лунок последнего ряда и отбрасывали, получая конечный объем 100 мкл в каждой лунке аналитического планшета. После приготовления образцов растворов на аналитических планшетах разовые планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 2 ч.

После инкубации планшеты трижды отмывали промывочным буфером. Идентифицирующее антитело (козье антитело против IgG мыши, конъюгированное с HRP, AbCam ab98717) развели 1:1500 (0,33 мкг/мл) в растворителе и 100 мкл разведенного антитела добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем трижды промывали отмывочным буфером, включая в каждую отмывку время выдержки по меньшей мере 30 с.

После отмывки идентифицирующий субстрат добавляли в лунки. Равные части субстрата А и субстрата В (BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214) соединяли непосредственно перед помещением в аналитические планшеты, и добавляли 100 мкл смешанного раствора субстрата в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл стоп-раствора (2 н H₂SO₄) в каждую лунку после промежутка времени в 10 мин. Оптическую плотность (OD) лунок измеряли непосредственно после добавления стоп-раствора на спектрофотометр для прочтения планшетов при 450 нм с субтракцией 570 нм. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Molecular Device SoftMax Pro v5.4. В некоторых случаях строили график логистической кривой с четырьмя параметрами, на оси х (логарифмическая шкала) отложен раствор, на оси у (линейная шкала) отложено значение OD, и для каждого образца определяли половину максимального значения (EC₅₀). Шаблон планшета в верхней части макета был скорректирован с учетом разведения каждого образца (по 1 на колонку).

Определение % OVA+ делящихся В-клеток.

Овальбумин+деление В-клеток определяли методом проточной цитометрии. Спленоциты, полученные от экспериментальных животных, окрашивали Cell Tracker Orange (CTO), тиол-реактивным флуоресцентным датчиком, пригодным для долгосрочного мечения клеток, и культивировали в полной среде при 37°C, 5% CO₂ с белком или пептидом овальбумина в течение 3 дней. На 3 день клетки отмывали, блокировали антителом анти-CD16/32 и затем окрасили с конъюгированными антителами, специфическими к B220 и CD19. Alexa 647 конъюгированный белок овальбумина также инкубировали с клетками, чтобы пометить альбумин-специфические BCR. Для спленоцитов CD19+B220+OVA-Alexa647+ определили пролиферацию, сравнивая дифференциальное окрашивание CTO. Слабоокрашенные CTO отметили как пролиферирующие овальбумин+В-клетки и сравнили их с сильноокрашенными CTO овальбумин+В-клетками, чтобы сравнить их соотношения.

Результаты.

Фиг. 6 показывает уменьшение уровней антиген-специфических IgG при введении синтетических наноносителей, содержащих пептид овальбумин и иммунодепрессант рапамицин. Фиг. 7 также показывает уменьшение на этот раз количества антиген-специфических В-клеток при введении синтетических наноносителей. Эти результаты показывают уменьшение нежелательных иммунных ответов при введении синтетических наноносителей, связанных с пептидом овальбумина (содержащий МНС класса II-рестриктивный эпитоп) и иммунодепрессантом. Эти результаты релевантны в любом контексте, где уменьшение количества антиген-специфических В-клеток может являться преимуществом.

Пример 16. Определение эффектов наноносителей с антигенами и иммунодепрессантами.

Наноносители.

Наноносители получали способами, описанными выше (пример 15).

Иммунизация.

Наночастицы размораживали и выдерживали на воздухе. Начальные растворы представляли собой 10× раствор реакционной смеси и затем были разбавлены до концентрации 100 мкг/мл в OVA323-339 или 1× раствор. Этот 1× раствор использовали для инъекций 200 мкл на одно внутривенное введение. Животных иммунизировали белком OVA (OVA) и лечили пептидом OVA323-339, чтобы определить способность наночастиц контролировать иммунные ответы в отсутствие антигенов В-клеток. Иммунизацию производили следующим образом: 10 мкг OVA+4 мг Alum интраперитонеально в 400 мкл каждой иммунологически интактной самке мыши Balb/C. Экспериментальные группы состояли из 5 животных каждая. Клетки селезенки рестимулировали антигеном, используя CFSE или CTO, чтобы определить количество Ag-специфической пролиферации.

Уровни специфических типов иммунных клеток.

FCS файлы анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. 7AAD положительные клетки (ядерный краситель, окрашивающий мертвые клетки) положительные клетки исключали и подсчитывали морфологические типы клеток, зависящие от экспрессии CD4, CD8, Gr-1, F4/80, B220, TCRb и CD11b.

Стратегия гейтирования для подкласса Т-клеток→7AAD-F4/80- GR-1-TCRb+CD4+/-CD8+/-.

Стратегия гейтирования для подкласса В-клеток→7AAD-B220+TCRb.

Стратегия гейтирования для эозинофилов→7AAD-F4/80-Gr-1+TCRb-CD11b+Gr-1+.

Определение % делящихся CD4+Т-клеток.

Встречаемость овальбумин-реактивных CD4+Т-клеток определяли проточной цитометрией. Спленциты, полученные от экспериментальных животных, окрашивали CFSE, тиол-реактивным флуоресцентным красителем, пригодным для долгосрочного окрашивания клеток, и культивировали в полной среде при 37°C, 5% CO₂ с белком овальбумина в течение 3 дней. На 3 день клетки отмыли, блокировали анти-CD16/32 антителом и затем окрашивали вместе с конъюгированными антителами, специфическими к TCR CD4 и CD8a. Пролиферацию спленцитов TCR+CD4 или TCR+CD8a+ определяли, сравнивая дифференциальное окрашивание CFSE.

Результаты.

Фиг. 8 и 9 показывают эффективность наночастиц на животных моделях. В частности, фиг. 8 показывает уменьшение количества CD4+Т-клеток в лаважных пробах, взятых у животных объектов, которых лечили синтетическими наночастицами, содержащими OVA323-339 (МНС класса II-рестриктивный эпитоп) и иммунодепрессант. Фиг. 9 показывает уменьшение доли делящихся CD4+Т-клеток вследствие аналогичного лечения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

(i) первое множество синтетических наночастиц, связанных с иммунодепрессантами, и

(ii) второе множество синтетических наночастиц, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами, необязательно при этом первое множество и второе множество являются одинаковыми,

причем нагрузка иммуносупрессора в среднем во всей первой совокупности синтетических наночастиц составляет по меньшей мере 2%, но не более 25% (вес./вес.),

причем нагрузка терапевтических белков-презентируемых APC антигенов в среднем во всей второй совокупности синтетических наночастиц составляет от 1 до 10% (вес./вес.),

и/или композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что иммунодепрессанты включают статин, ингибитор mTOR, например ингибитор mTOR является рапамицином, TGF-β сигнальный агент, кортикостероид, ингибитор митохондриальной функции, ингибитор P38, NF-κβ ингибитор, агонист аденозинового рецептора, агонист простагландина E2, ингибитор фосфодиэстеразы 4, ингибитор HDAC или ингибитор протеасомы.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что терапевтические белки-презентируемые APC антигены (а) охватывают МНС класса I-рестриктивные и/или МНС класса II-рестриктивные эпитопы терапевтического белка и/или (b) охватывают МНС класса II-рестриктивные эпитопы терапевтического белка; (с) охватывают В-клеточные эпитопы терапевтического белка; (d) практически не содержат В-клеточные эпитопы терапевтического белка; (е) охватывают терапевтический белок для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии или его фрагмент; (f) охватывают вводимый инфузией или инъекцией терапевтический белок (например, тоцилизумаб, альфа-1 антитрипсин, гематид, альбинтерферон альфа-2b, руцин, тезаморелин, окрелизумаб, белимумаб, пеглотиказу, талиглуцеразу альфа, агалсидазу альфа или велаглуцеразу альфа), фермент (например, оксидоредуктазу, трансферазу, гидролазу, лиазу, изомеразу или лигазу, фермент для ферментной заместительной терапии (например, лизосомной болезни накопления, необязательно при этом фермент охватывает имидазу, α-галактозидазу А (α-gal A), агалсидазу бета, кислую α-глюкозидазу (GAA), α-глюкозидазу альфа, луми-

зим, миозим, арилсульфатазу В, ларонидазу, алдуразим, идурсульфазу, элапазу, арилсульфатазу В или наглазим)), кофактор фермента, гормон, кровь или фактор свертываемости крови (например, фактор I, фактор II, тканевой фактор, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Ха, фактор XII, фактор XIII, фактор фон Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок С, белок S, белок Z, белок Z-зависимый протеазный ингибитор (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI1), ингибитор-2 активатора плазминогена (PAI2), раковый прокоагулянт или эпоэтин альфа), цитокин, интерферон, фактор роста, моноклональное антитело, поликлональное антитело или белок, связанный с болезнью Помпе, или его фрагмент.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что композиция находится в количестве, эффективном для (а) вызова толерогенного иммунного ответа на терапевтический белок-презентируемый APC антиген и/или (б) для уменьшения выработки специфических к терапевтическому белку антител, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток при введении пациенту.

5. Композиция по любому из пп.1-4, где содержание иммунодепрессанта и/или терапевтического белка-презентируемого APC антигена в среднем в первом и/или втором множестве синтетических наночастиц составляет (а) от 0,0001 до 50% или (б) от 0,1 до 10%.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что синтетические наночастицы первого множества и/или второго множества (а) охватывают липидные наночастицы, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболлы, нанонити, вирусоподобные частицы или пептидные или белковые частицы; (б) охватывают липидные наночастицы; (с) охватывают липосомы; (д) охватывают металлические наночастицы, например наночастицы золота; или (е) охватывают полимерные наночастицы.

7. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что полимерные наночастицы охватывают (а) полимер, который представляет собой не содержащий концевую метоксигруппу блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена; и/или (б) сложный полиэфир (например, включающий поли (молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер молочной и гликолевой кислот), сложный полиэфир, связанный с простым полиэфиром, полиаминокислоту, поликарбонат, полиацеталь, поликеталь, полисахарид, полиэтилоксазолин или полиэтиленимин; и/или (с) полимерные наночастицы содержат сложный полиэфир и сложный полиэфир, связанный с простым полиэфиром, необязательно при этом простой полиэфир охватывает полиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

8. Композиция по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что у синтетических наночастиц первого и/или второго множества среднее значение из распределения размеров частиц, полученного с помощью динамического рассеяния света, представляет собой диаметр, составляющий (а) более 100 нм; (б) более 150 нм; (с) более 200 нм; (д) более 250 нм или (е) более 300 нм.

9. Композиция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что соотношение синтетических наночастиц первого множества и/или второго множества составляет более 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или 1:10.

10. Лекарственная форма, содержащая композицию по любому из пп.1-9.

11. Применение композиции по любому из пп.1-9 в терапии или профилактике, например, в способе, включающем введение композиции или лекарственной формы пациенту, которому вводят или будут вводить терапевтический белок, необязательно при этом (а) способ дополнительно включает введение терапевтического белка пациенту; и/или (б) терапевтический белок вводят до, одновременно или после введения композиции или лекарственной формы; и/или (с) пациенту вводят одну или несколько поддерживающих доз композиции или лекарственной формы; и/или (д) способ дополнительно включает оценку вызова нежелательного иммунного ответа у пациента до и/или после введения композиции, или лекарственной формы, и/или терапевтического белка, например, нежелательный иммунный ответ заключается в выработке антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (е) терапевтический белок включает терапевтический белок, предназначенный для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии; и/или (ф) терапевтический белок охватывает вводимый инфузией или инъекцией терапевтический белок, как определено в п.3; и/или (г) ведение первого и/или второго множества синтетических наночастиц и/или терапевтического белка осуществляют путем внутривенного, интраперитонеального, трансмукозального, перорального, подкожного, пульмонального, интраназального, внутрикожного или внутримышечного введения, например, где введение первого и/или второго множества синтетических наночастиц и/или терапевтического белка осуществляют путем ингаляции или внутривенного, подкожного или трансмукозального введения.

12. Применение лекарственной формы по п.10 в терапии или профилактике, например, в способе, включающем введение композиции или лекарственной формы пациенту, которому вводят или будут вводить терапевтический белок, необязательно при этом (а) способ дополнительно включает введение терапевтического белка пациенту; и/или (б) терапевтический белок вводят до, одновременно или после введения композиции или лекарственной формы; и/или (с) пациенту вводят одну или несколько поддер-

живающих доз композиции или лекарственной формы; и/или (d) способ дополнительно включает оценку вызова нежелательного иммунного ответа у пациента до и/или после введения композиции, или лекарственной формы, и/или терапевтического белка, например, нежелательный иммунный ответ заключается в выработке антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (e) терапевтический белок включает терапевтический белок, предназначенный для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии; и/или (f) терапевтический белок охватывает вводимый инфузией или инъекцией терапевтический белок, как определено в п.3; и/или (g) ведение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляют путем внутривенного, интраперитонеального, трансмукозального, перорального, подкожного, пульмонального, интраназального, внутривенного или внутримышечного введения, например, где введение первого и/или второго множества синтетических наноносителей и/или терапевтического белка осуществляют путем ингаляции или внутривенного, подкожного или трансмукозального введения.

13. Применение композиции, содержащей:

(i) первое множество синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и
(ii) второе множество синтетических наноносителей, связанных с терапевтическим белком-презентируемым APC антигеном,

в способе, включающем:

(a) введение пациенту указанной композиции в эффективном количестве для уменьшения вызова нежелательного иммунного ответа на терапевтические белки-презентируемые APC антигены; или

(b) уменьшение вызова нежелательного иммунного ответа у пациента путем введения композиции; или

(c) введение пациенту композиции по ранее разработанному протоколу, применение которого способствует снижению нежелательного иммунного ответа на терапевтические белки-презентируемые APC антигены у одного или нескольких пациентов;

необязательно при этом (i) первое множество и второе множество являются одинаковыми; и/или (ii) способ дополнительно включает предоставление или выявление пациента; и/или (iii) способ дополнительно включает оценку вызова нежелательного иммунного ответа у пациента до и/или после введения композиции, например, где нежелательный иммунный ответ заключается в выработке антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (iv) иммунодепрессанты охватывают статин, ингибитор mTOR, например ингибитор mTOR является рапамицином, TGF- β сигнальный агент, кортикостероид, ингибитор митохондриальной функции, ингибитор P38, NF- κ B ингибитор, агонист аденозинового рецептора, агонист простагландина E2, ингибитор фосфодиэстеразы 4, ингибитор HDAC или ингибитор протеасомы; и/или (v) терапевтические белки-презентируемые APC антигены охватывают MHC класса I-рестриктурированные и/или MHC класса II-рестриктурированные эпитопы терапевтического белка, например, где терапевтические белки-презентируемые APC антигены охватывают MHC класса II-рестриктурированные эпитопы терапевтического белка; и/или (vi) терапевтические белки-презентируемые APC антигены охватывают В-клеточные эпитопы терапевтического белка; и/или (vii) терапевтический белок охватывает терапевтический белок для белковой заместительной или белковой дополняющей терапии; и/или (viii) терапевтический белок охватывает вводимый инфузией или инъекцией терапевтический белок, фермент, кофактор фермента, гормон, кровь или фактор свертываемости крови, цитокин, интерферон, фактор роста, моноклональное антитело, поликлональное антитело или белок, связанный с болезнью Помпе, например, вводимый инфузией или инъекцией терапевтический белок по п.3; и/или (ix) композиция представлена в эффективном количестве для уменьшения выработки антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (x) содержание иммунодепрессанта и/или терапевтического белка-презентирующего APC антигена в среднем в первом множестве и/или втором множестве синтетических наноносителей составляет от 0,0001 до 50% или от 0,1 до 10%; и/или (xi) синтетические наноносители первого множества и/или второго множества охватывают липидные наночастицы, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболлы, нанонити, вирусоподобные частицы или пептидные или белковые частицы, например, определенные в п.6 или 7; и/или (xii) у синтетических наноносителей первого и/или второго множества среднее значение из распределения размеров частиц, полученного с помощью динамического рассеяния света, является таким, как определено в п.8; и/или (xiii) соотношение синтетических наноносителей первого множества и/или второго множества составляет более 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или 1:10; и/или (xiv) композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель; и/или (xv) способ дополнительно включает введение терапевтического белка пациенту, необязательно при этом терапевтический белок вводят до, одновременно или после введения композиции; и/или (xvi) пациенту вводят одну или несколько поддерживающих доз композиции; и/или (xvii) способ дополнительно включает оценку вызова нежелательного иммунного ответа у пациента до и/или после введения композиции,

или лекарственной формы, и/или терапевтического белка, например, где нежелательный иммунный ответ заключается в выработке антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (xviii) введение осуществляют путем внутривенного, интраперитонеального, трансмукозального, перорального, подкожного, пульмонального, интраназального, внутрикожного или внутримышечного введения, например путем ингаляции или внутривенного, подкожного или трансмукозального введения.

14. Способ, включающий:

(i) получение первого множества синтетических наноносителей, связанных с иммунодепрессантами, и

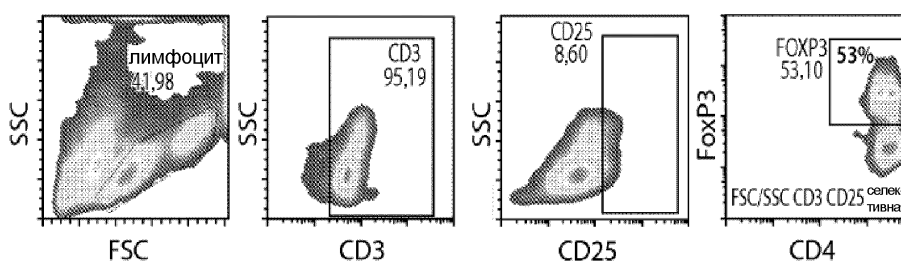
(ii) получение второго множества синтетических наноносителей, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами, необязательно при этом (a) первое множество и второе множество являются одинаковыми; и/или (b) получаемые первое множество и второе множество синтетических наноносителей определены в любом из пп.1-9; и/или (c) способ дополнительно включает получение лекарственной формы композиции, содержащей первое множество и второе множество синтетических наноносителей; и/или (d) способ дополнительно включает получение композиции, содержащей первое множество и второе множество синтетических наноносителей, или лекарственной формы, доступной пациенту для введения; и/или (e) способ дополнительно включает оценку уменьшения нежелательного иммунного ответа при применении композиции, содержащей первое множество и второе множество синтетических наноносителей, например нежелательный иммунный ответ заключается в выработке антител, специфических к терапевтическому белку, и/или пролиферации и/или активности CD4+ Т-клеток, и/или пролиферации и/или активности В-клеток; и/или (f) способ предназначен для получения композиции или лекарственной формы, содержащей первое множество синтетических наноносителей, которые связаны с иммунодепрессантами, и второе множество синтетических наноносителей, связанных с терапевтическими белками-презентируемыми APC антигенами.

15. Композиция, которая может быть получена посредством способа по п.14.

16. Лекарственная форма, которая может быть получена посредством способа по п.14, например, представляющая собой лекарственную форму, содержащую композицию, которая может быть получена способом по п.14.

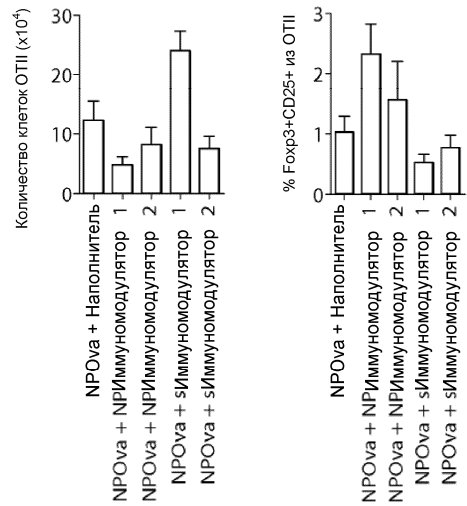
17. Применение композиции по любому из пп.1-9 или 15 в терапии или профилактике, необязательно в способе индукции толерогенного иммунного ответа на антигены-терапевтические белки, в клеточной терапии, в белковой заместительной терапии, белковой дополняющей терапии или в способе по п.14.

18. Применение лекарственной формы по п.10 или 16 в терапии или профилактике, необязательно в способе индукции толерогенного иммунного ответа на антигены-терапевтические белки, в клеточной терапии, в белковой заместительной терапии, белковой дополняющей терапии или в способе по п.14.

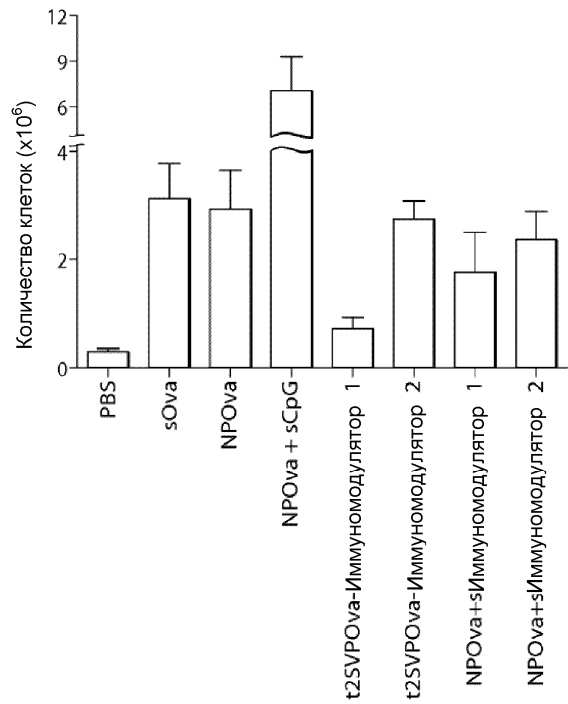


Фиг. 1

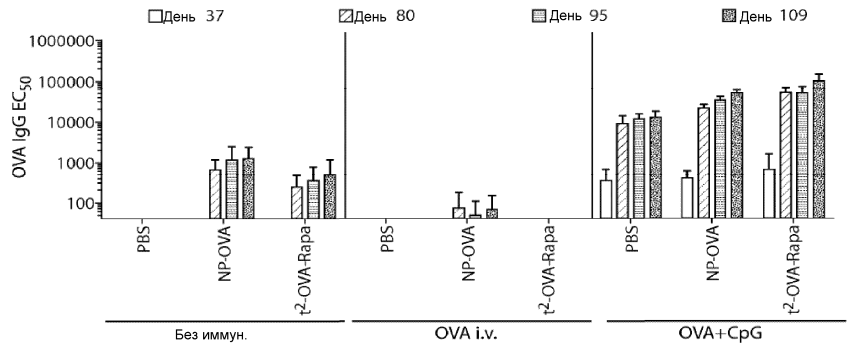
In vivo эффекты t2SVP после однократной инъекции



Фиг. 2

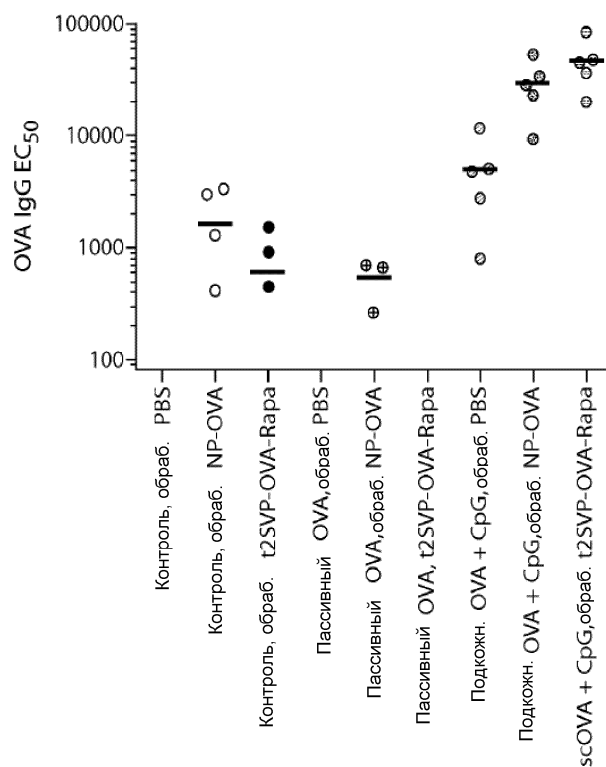


Фиг. 3

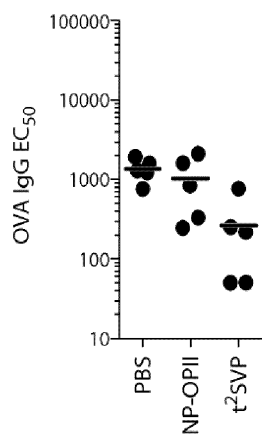


Фиг. 4

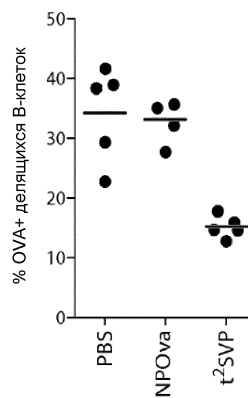
Вакцинация ОВА
Титры антител на День 77
Примирование + 5 инъекций (день 14, день 28,
день 42, день 56, день 70)



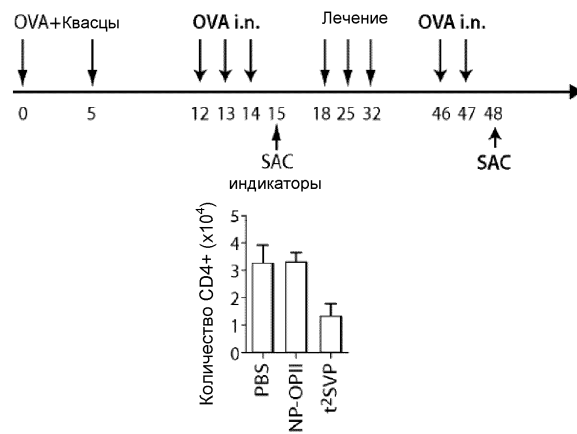
Фиг. 5



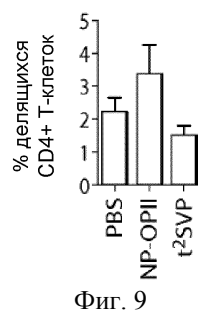
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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