

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 030813

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.10.31

(21) Номер заявки
201291154

(22) Дата подачи заявки
2011.05.26

(51) Int. Cl. A61K 47/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ГЕНЕРАЦИИ АНТИТЕЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И УВЕЛИЧЕНИЯ МЕСТНОЙ ИНДУКЦИИ ИММУННЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОНОСИТЕЛЕЙ, СОЕДИНЕННЫХ С АДЪЮВАНТАМИ

(31) 61/348,728; 61/348,717; 61/348,713;
61/358,635

(32) 2010.05.26; 2010.05.26; 2010.05.26;
2010.06.25

(33) US

(43) 2013.04.30

(86) PCT/US2011/038210

(87) WO 2011/150258 2011.12.01

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

(72) Изобретатель:
Ильинский Петр, Линфорд Грэйсон
Б., Зепп Чарльз (US)

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

(56) WO-A1-2010042870
US-A9-20070292386

(57) Раскрываются композиции с синтетическим наноносителем с композициями соединенного адъюванта, а также связанные с ними способы.

B1

030813

030813

B1

Родственные заявки

Эта заявка заявляет приоритет согласно 35 U.S.C. § 119 предварительных заявок США 61/348713, поданной 26 мая 2010 г., 61/348717, поданной 26 мая 2010 г., 61/348728, поданной 26 мая 2010 г., и 61/358635, поданной 25 июня 2010 г., содержание каждой из которых целиком включается в настоящий документ посредством ссылки.

Предпосылки изобретения

Адьюванты являются важными компонентами большинства применяемых в настоящее время режимов вакцинации. Точно также они вполне могут быть включены в перспективные вакцинные продукты. Многочисленные новые адьюванты теперь находятся в разработке, и многие из них продемонстрировали способность усиливать иммунные ответы к вакцинам в исследованиях и клинических условиях. Однако дозы адьюванта, которые являются благоприятными для усиления иммунного ответа, могут быть способны индуцировать побочные эффекты у значительной группы пациентов. В действительности, эти две способности адьювантов являются, по существу, связанными, поскольку это представляет собой широкую стимуляцию иммунного ответа *per se*, которая обеспечивает стимулы как для усиления вакцинации, так и для ее побочных эффектов (токсичности). Известно, что оба этих процесса обусловлены высвобождением воспалительных цитокинов. Следовательно, подходы, которые уменьшают побочные эффекты введения адьюванта, и/или специфично усиливают определенные иммунные ответы, будут иметь большую клиническую ценность.

Следовательно, необходимы композиции и способы, которые эффективно обеспечивают желательный (е) иммунный(е) ответ(ы), которые могут снижать частоту неблагоприятных явлений, связанных с применением адьювантов в вакцинах.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте обеспечивается способ, включающий обеспечение дозы адьюванта и дозы антигена, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, и выработку титра антител против антигена посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена, где доза адьюванта меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выбор дозы адьюванта, равной меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена. Предпочтительно один и тот же субъект осуществляет каждый из этапов данных способов (т.е. один и тот же субъект осуществляет этапы обеспечения, выработки и/или выбора). В другом аспекте обеспечивается композиция, включающая дозу адьюванта, которая меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена.

В другом аспекте обеспечивается способ, включающий обеспечение дозы адьюванта, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, и выработку системного высвобождения цитокинов посредством введения субъекту дозы адьюванта, где доза адьюванта больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к системному высвобождению цитокинов, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выбор дозы адьюванта, которая больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к системному высвобождению цитокинов, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта. Предпочтительно один и тот же субъект осуществляет каждый из этапов данных способов (т.е. один и тот же субъект осуществляет этапы обеспечения, выработки и/или выбора). В другом аспекте обеспечивается композиция, включающая дозу адьюванта, которая является больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к системному высвобождению цитокинов, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта.

В одном варианте осуществления адьювант(ы) по любому из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, включают агонист для Toll-подобных рецепторов 3, 4, 5, 7, 8 или 9 или их комбинацию. В другом варианте осуществления адьювант включает агонист для Toll-подобных рецепторов 3, агонист для Toll-подобных рецепторов 7 и 8 или агонист для Toll-подобного рецептора 9. В еще одном варианте осуществления адьювант включает R848, иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК. В дополнительном варианте осуществления доза адьюванта по любому из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, включает два или более типов адьювантов. В одном варианте осуществления часть дозы адьюванта не соединена с синтетическими наноносителями.

В другом варианте осуществления любого из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, субъекту вводят более одного типа антигена. В одном варианте осуществления по меньшей мере часть дозы антигена(ов) соединена с синтетическими наноносителями. В другом варианте осуществления по меньшей мере часть дозы антигена(ов) не соединена с синтетическими наноносителями. В еще одном варианте осуществления по меньшей мере часть дозы антигена(ов) вводят совместно с синтетическими наноносителями. В очередном варианте осуществления по меньшей мере часть дозы антигена(ов)

не вводят совместно с синтетическими наноносителями. В одном варианте осуществления антиген(ы) включают антиген для В-клеток и/или антиген для Т-клеток. В другом варианте осуществления антиген для Т-клеток включает универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток. В очередном варианте осуществления антиген(ы) включают антиген для В-клеток или антиген для Т-клеток и универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток. В одном варианте осуществления антиген для Т-хелперных клеток включает пептид, полученный или произошедший от овальбумина. В другом варианте осуществления пептид, полученный или произошедший от овальбумина, включает последовательность, установленную в SEQ ID NO: 1. В очередном варианте осуществления любого из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток соединен с синтетическими наноносителями путем инкапсулирования. В еще одном варианте осуществления любого из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, антиген для В-клеток включает никотин. В дополнительном варианте осуществления синтетические наноносители содержат никотин и универсальные антигены для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток. В очередном дополнительном варианте осуществления никотин и/или универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток соединены с синтетическими наноносителями. В одном варианте осуществления универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток соединен путем инкапсулирования.

В другом варианте осуществления любого из обеспеченных способов и композиций доза адъюванта включает R848, и доза антигена включает никотин и универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток, где никотин и универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток также соединены с синтетическими наноносителями, и где синтетические наноносители включают один или несколько полимеров.

В другом варианте осуществления любого из способов и композиций, обеспеченных в данном документе, синтетические наноносители включают липидные наночастицы, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, пептидные или белковые частицы, наночастицы, которые включают комбинацию наноматериалов, сферические наночастицы, кубические наночастицы, пирамидальные наночастицы, продолговатые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы. В одном варианте осуществления синтетические наноносители включают один или несколько полимеров. В другом варианте осуществления один или несколько полимеров включают сложный полиэфир. В еще одном варианте осуществления один или несколько полимеров включают или дополнительно включают сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером. В очередном варианте осуществления сложный полиэфир включает полимолочную кислоту, полиглицоловую кислоту, сополимер(молочной и глицоловой кислоты) или поликапролактон. В одном варианте осуществления гидрофильный полимер включает полиэфир. В другом варианте осуществления полиэфир включает полиэтиленгликоль.

В одном варианте осуществления любого из обеспеченных способов и композиций по меньшей мере одна лекарственная форма включает дозу адъюванта. В другом варианте осуществления вакцина включает лекарственную(ые) форму(ы). В очередном варианте осуществления более одной лекарственной формы включают дозу адъюванта, и более одной лекарственной формы вводят совместно.

В одном варианте осуществления любого из обеспеченных способов введение осуществляют путем, который включает подкожное, внутримышечное, внутрикожное, пероральное, интраназальное, трансмукозальное, ректальное, глазное, трансдермальное или черескожное введение или их комбинацию.

В другом варианте осуществления любого из обеспеченных способов у субъекта рак, инфекционное заболевание, неаутоиммунное заболевание обмена веществ, дегенеративное заболевание, зависимость, а также атопическое состояние, астма; хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) или хроническая инфекция.

В другом аспекте обеспечивается доза адъюванта и доза антигена или доза адъюванта как определено по отношению к любому из обеспеченных способов или композиций для применения в терапии или профилактике.

В еще одном аспекте обеспечивается доза адъюванта и доза антигена или доза адъюванта как определено по отношению к любому из обеспеченных способов или композиций для применения в любом из обеспеченных способов.

В еще одном аспекте обеспечивается доза адъюванта и доза антигена или доза адъюванта как определено по отношению к любому из обеспеченных способов или композиций для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания, неаутоиммунного заболевания обмена веществ, дегенеративного заболевания, зависимости, а также атопического состояния, астмы; хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или хронической инфекции. В одном варианте осуществления способ включает введение дозы(доз) путем, который включает подкожное, внутримышечное, внутрикожное, пероральное, интраназальное, трансмукозальное, ректальное; глазное, трансдермальное или черескожное введение или их комбинацию.

В дополнительном аспекте обеспечивается применение дозы адъюванта и дозы антигена или дозы

адьюванта как определено по отношению к любому из обеспеченных способов или композиций для производства лекарственного препарата для применения в любом из обеспеченных способов.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана системная продукция цитокинов у мышей после инокуляции наноносителя (NC). На фиг. 1A, 1B и 1C показаны продукция TNF- α , IL-6 и IL-12 в экспериментальных группах соответственно. Сыворотки от групп из трех мышей объединяли и анализировали с помощью ELISA.

На фиг. 2 показана системная продукция IFN- γ у мышей после инокуляции NC. Сыворотки от групп из трех мышей объединяли и анализировали с помощью ELISA.

На фиг. 3 показана системная продукция IL-12 у мышей после инокуляции свободных или соединенных с NC агонистов TLR. Сыворотки от групп из двух мышей объединяли и анализировали с помощью ELISA.

На фиг. 4 показана местная индукция иммунных цитокинов свободными или связанными с NC агонистами TLR. Каждая точка представляет среднее значение от двух лимфатических узлов (LN) от отдельной мыши.

На фиг. 5 показана динамика клеточной популяции в подколенных лимфатических узлах после инокуляции свободных и соединенных с NC агонистов TLR7/8 R848. Умертвили трех интактных мышей в различные дни и среднему количеству клеток из их подколенного LN назначили для "дня 0" значение "1", с которым сравнивали все другие количества. Каждая полоска от группы, инокулированной R848 или NC, представляет среднее от двух лимфатических узлов, взятых от обособленных животных.

На фиг. 6 показан титр антител к никотину у мышей, иммунизированных NC, содержащими поверхностный никотин и Т-хелперный пептид OP-II с или без R848.

На фиг. 7 показано, что TNF- α и IL-6 были индуцированы в сыворотке животных, инокулированных NC-CpG и свободным CpG.

На фиг. 8 показана индукция IFN- γ и IL-12 в сыворотке животных, инокулированных NC-CpG и свободным CpG.

Подробное описание изобретения

Перед тем, как описывать настоящее изобретение в деталях, подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивается в частности иллюстрируемыми материалами или параметрами процесса, так как таковые могут, конечно, варьировать. Также подразумевается, что терминология, применяемая в данном документе, служит только для цели описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначена для ограничения применения альтернативной терминологии для описания настоящего изобретения.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе, как выше, так и ниже, настоящим включаются посредством ссылки в своем полном объеме для всех целей.

Используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, кроме тех случаев, когда содержание явно предписывает иное. Например, ссылка на "полимер" включает смесь двух или более таких молекул, ссылка на "растворитель" включает смесь двух или более таких растворителей, ссылка на "адгезив" включает смеси двух или более таких материалов и т.п.

Введение

Изобретатели непредвиденно и неожиданно обнаружили, что проблемы и ограничения, приведенные выше, можно преодолеть, применяя на практике настоящее изобретение, раскрытое в данном документе. Раскрытия, описанные в данном документе, относятся к соединению адьюванта с наноносителями, и обеспечиваются основанные на этих раскрытиях способы и связанные композиции, которые направлены на выработку желательных иммунных ответов посредством выбора конкретных доз адьюванта, соединенного с наноносителями. В некоторых вариантах осуществления и в зависимости от желательного(ых) иммунного(ых) ответа(ов) эти дозы меньше доз адьюванта, не соединенного с наноносителями, в подобном контексте. В других вариантах осуществления эти дозы больше доз адьюванта, не соединенного с наноносителями.

В одном аспекте изобретатели непредвиденно обнаружили, что возможно обеспечить способы и связанные композиции, которые включают способ, включающий введение дозы адьюванта, которая, если соединен с синтетическими наноносителями, является меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит к иммунному ответу (например, титру антител) сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта. Вследствие более сильного эффекта адьюванта в результате соединения по меньшей мере части дозы адьюванта с синтетическим наноносителем можно применять меньше адьюванта. Дозы адьюванта, следовательно, могут быть субтерапевтическими или дозами со сниженной токсичностью, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями. В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей лекарственную форму, включающую субтерапевтическую или дозу адьюванта со сниженной токсичностью и фармацевтически приемлемый наполнитель, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями. В еще одном аспекте изобретение относится к способу, включающему введение

субъекту субтерапевтической или дозы адьюванта со сниженной токсичностью; где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями.

Было обнаружено, что соединение адьювантов с наноносителями обеспечивает более сильный эффект адьюванта и приводит к значительно более высокому иммунному ответу с антителами по сравнению с примешанным адьювантом. Кроме того, также было обнаружено, что соединенный адьювант приводит в результате к большему иммунному ответу с антителами даже если применяется значительно большее количество свободного адьюванта (вплоть до в 6 раз больше). См. пример 11. Этот результат противоречит прогнозируемому на основе идей, представленных в Diwan et al., *Current Drug Delivery*, 2004, 1, 405-412, где было установлено, что продукция антител, в частности, при более низких дозах адьюванта, была выше, если адьювант был предоставлен в растворе, а не при помощи доставки в форме частиц. Однако, противоположный результат описан в данном документе.

В другом аспекте, следовательно, изобретатели непредвиденно обнаружили, что возможно обеспечить способы и связанные композиции, которые включают способ, включающий обеспечение дозы адьюванта и дозы антигена, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, и выработку титра антител против антигена посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена, где доза адьюванта меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена. В вариантах осуществления способ дополнительно включает выбор дозы адьюванта, равной меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту (например, человеку) дозы адьюванта и дозы антигена. Предпочтительно этапы способов, обеспеченных в данном документе, осуществляются одним и тем же субъектом. В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей лекарственную форму, включающую дозу адьюванта и дозу антигена и фармацевтически приемлемый наполнитель, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, и где доза адьюванта меньше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к титру антител сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта и дозы антигена.

Также было показано, что соединение адьюванта с наноносителями может приводить в результате к более низкой немедленной системной индукции цитокинов, чем использование свободного адьюванта. Следовательно, соединение адьюванта с наноносителями может позволить использовать более высокую дозу адьюванта по сравнению с отдельным адьювантом. В другом аспекте, следовательно, изобретение относится к способу, включающему обеспечение дозы адьюванта, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, выработку иммунного ответа (например, системное высвобождение цитокинов) посредством введения субъекту (например, человеку) дозы адьюванта, где доза адьюванта больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит в результате к иммунному ответу, сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта. В вариантах осуществления способ дополнительно включает выбор дозы адьюванта, равной больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит к иммунному ответу (например, системное высвобождение цитокинов), сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта. Предпочтительно этапы способов, обеспеченных в данном документе, осуществляются одним и тем же субъектом. В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей лекарственную форму, включающую дозу адьюванта и фармацевтически приемлемый наполнитель, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наноносителями, и где доза адьюванта больше отдельной дозы адьюванта, которая приводит к иммунному ответу (например, системное высвобождение цитокинов), сходному с таковым, выработанным посредством введения субъекту дозы адьюванта.

В совокупности, при помощи раскрытий, обеспеченных в данном документе, теперь возможно выбрать дозу адьюванта в зависимости от желательного иммунного результата, который является определенным для применения адьюванта, соединенного с наноносителями. Доза может быть более низкой (по сравнению с отдельным адьювантом), которая вырабатывает титры антител или которая позволяет избежать нежелательной системной активности (в то же время сильно потенцирует местные иммуностимулирующие эффекты). Доза может быть большей, которая вырабатывает сходный профиль системного высвобождения цитокинов по сравнению с отдельным адьювантом.

В дополнительном аспекте введение композиции, обеспеченной в данном документе, может быть благоприятным для любого субъекта, у которого желательна модуляция иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления субъект является таким, у которого желателен воспалительный ответ. В других вариантах осуществления субъекты являются теми, у которых желателен Th1 иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления у субъектов есть или они подвергаются риску рака. В других вариантах осуществления у субъектов есть или они подвергаются риску инфекции или инфекционного заболевания. В очередных вариантах осуществления у субъектов есть или они подвергаются риску atopического состояния, астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или хронической инфекции. Также обеспечиваются способы введения композиций таким субъектам.

Примеры 1-13 иллюстрируют разные варианты осуществления настоящего изобретения, включающие различные формулировки или аспекты настоящего изобретения. Композиции и способы, описанные

в примерах, также обеспечены в данном документе.

Настоящее изобретение теперь будет более подробно описано ниже.

Определения

"Адьювант" означает средство, которое не представляет специфичный антиген, но повышает силу и продолжительность иммунного ответа к сопутствующе введенному антигену. Такие адьюванты могут включать без ограничений стимуляторы образраспознающих рецепторов, таких как Toll-подобные рецепторы, RIG-I и NOD-подобные рецепторы (NLR), минеральные соли, такие как квасцы, квасцы, комбинированные с монофосфорилипидом (MPL) А энтеробактерий, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* или *Shigella flexneri*, или, в частности, с MPL® (AS04), MPL А вышеупомянутых бактерий отдельно, сапонины, такие как QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, эмульсии, такие как MF59™, Montanide® ISA 51 и ISA 720, AS02 (QS21 + сквален+ MPL®), AS15, липосомы и липосомальные составы, такие как AS01, синтезированные или специфически полученные микрочастицы и микроносители, такие как пузырьки наружной мембраны бактериального происхождения (OMV) от *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и других, или частицы хитозана, депообразующие средства, такие как блок-сополимеры Pluronic®, специфически модифицированные или полученные пептиды, такие как мурамилдипептид, аминокислотилглюкозаминид-4-фосфаты, такие как RC529, или белки, такие как бактериальные анатоксины или фрагменты токсинов.

В вариантах осуществления адьюванты включают агонисты для образраспознающих рецепторов (PRR), в том числе без ограничения Toll-подобных рецепторов (TLR), а именно, TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 и/или их комбинаций. В других вариантах осуществления адьюванты включают агонисты для Toll-подобных рецепторов 3, агонисты для Toll-подобных рецепторов 7 и 8 или агонисты для Toll-подобного рецептора 9; предпочтительно перечисленные адьюванты включают имидазохинолины; такие как R848; производные аденина, такие как раскрытые в патенте США № 6329381 (Sumitomo Pharmaceutical Company), опубликованной патентной заявке США 2010/0075995, Biggadike et al., или WO 2010/018132, Campos et al.; иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК. В особых вариантах осуществления синтетические наноносители включают в качестве адьювантов соединения, которые являются агонистами для toll-подобных рецепторов (TLR) 7 и 8 ("агонисты TLR 7/8"). Среди общепринятых, соединения-агонисты TLR 7/8, раскрытые в патенте США № 6696076, Tomai et al., в том числе без ограничений имидазохинолин амины, имидазопиридин амины, 6, 7-конденсированные циклоалкилимидазопиридин амины и имидазохинолин амины с мостиковыми связями в положении 1 и 2. Предпочтительные адьюванты включают имиквимод и резиквимод (также известный как R848). В особых вариантах осуществления адьювант может являться агонистом для поверхностной молекулы DC CD40. В определенных вариантах осуществления для стимулирования иммунитета, а не устойчивости, синтетический наноноситель включает адьювант, который содействует созреванию DC (необходимо для примирования наивных Т-клеток) и продукции цитокинов, таких как интерфероны I типа, которые содействуют иммунным ответам с антителами. В вариантах осуществления адьюванты также могут включать иммуностимулирующие молекулы РНК, такие как без ограничения дцРНК, поли I:C или поли I:поли C12U (доступная как Ampligen®, либо поли I:C, либо поли I:поли C12U, известные как стимуляторы TLR3) и/или раскрытые в F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" Science 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Иммунная модуляция с помощью химически модифицированных рибонуклеозидов и олигорибонуклеотидов (Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides)" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Иммуностимулирующие олигорибонуклеотиды, содержащие специфическ(ий)не мотив(ы) последовательности и нацеливающиеся на путь Toll-подобного рецептора 8 (Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway)" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Модифицированные олигорибонуклеотидные аналоги с усиленной иммуностимулирующей активностью (Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity)" публикация патентной заявки США № 2006241076; G. Lipford et al., "Иммуностимулирующие вирусные РНК-олигонуклеотиды и их применение для лечения рака и инфекций (Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections)" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Иммуностимулирующие G,U-содержащие олигорибонуклеотиды, композиции и способы скрининга (Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods)" WO 2003086280 A2. В некоторых вариантах осуществления адьювант может представлять собой агонист TLR-4, такой как бактериальный липополисахарид (LPS), VSV-G и/или HMGB-1. В некоторых вариантах осуществления адьюванты могут включать агонисты TLR-5, такие как флагеллин, или его части или производные, в том числе без ограничения раскрытые в патентах США № 6130082, 6585980 и 7192725. В особых вариантах осуществления синтетические наноносители включают лиганд для Toll-подобного рецептора (TLR)-9, такой как иммуностимулирующие молекулы ДНК, содержащие CpG, которые индуцируют секрецию интерферона I типа и стимулируют активацию Т- и В-клеток, приводящую к повышенной продукции антител и ответам с цитотоксическими Т-клетками (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J. Exp. Med. 1997.

186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 1998. 6:496-500; патент США № 6207646, Krieg et al.; патент США № 7223398, Tuck et al.; патент США № 7250403, Van Nest et al., или патент США № 7566703, Krieg et al.).

В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут представлять собой провоспалительные стимулы, высвобожденные из некротических клеток (например, кристаллы уратов). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами каскада реакций комплемента (например, CD21, CD35 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами иммунных комплексов. Адъюванты также включают агонисты рецепторов комплемента, такие как молекулы, которые связываются с CD21 или CD35. В некоторых вариантах осуществления агонист рецепторов комплемента индуцирует эндогенную опсонизацию синтетического наноносителя при помощи комплемента. В некоторых вариантах осуществления адъюванты представляют собой цитокины, которые являются небольшими белками или биологическими факторами (в диапазоне 5 кДа-20 кДа), которые высвобождаются клетками и специфично воздействуют на клеточно-клеточное взаимодействие, связь и поведение других клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист цитокинического рецептора является малой молекулой, антителом, слитым белком или аптамером.

В вариантах осуществления по меньшей мере часть дозы адъюванта соединена с синтетическими наноносителями, предпочтительно вся доза адъюванта соединена с синтетическими наноносителями. В вариантах осуществления доза адъюванта включает два или более типов адъювантов. Например, и без ограничения, можно комбинировать адъюванты, которые действуют на различные рецепторы, такие как различные рецепторы TLR. В качестве примера, в варианте осуществления агонист TLR 7/8 можно комбинировать с агонистом TLR 9. В другом варианте осуществления агонист TLR 7/8 можно комбинировать с агонистом TLR 4. В еще одном варианте осуществления агонист TLR 9 можно комбинировать с агонистом TLR 3.

"Вводить" или "введение" означает предоставление вещества субъекту способом, который является фармакологически применимым.

"Эффективное количество" представляет собой любое количество композиции, которое приводит к одному или нескольким желательным иммунным ответам. Это количество может быть для *in vitro* или *in vivo* назначений. Для *in vivo* назначений количество может быть таковым, что, как будет полагать клиницист, может иметь клинический эффект для субъекта, нуждающегося в иммунном ответе. Такие субъекты включают тех, у которых есть или которые подвергаются риску рака, инфекции или инфекционного заболевания, атипического состояния, астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или хронической инфекции.

Эффективное количество подразумевает такое количество, которое вызывает выработку титра антител и/или системное высвобождение одного или нескольких цитокинов. В вариантах осуществления эффективное количество подразумевает такое, которое вызывает продукцию профиля системного высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов или профиль высвобождения цитокинов включают системное высвобождение TNF- α , IL-6 и/или IL-12. В других вариантах осуществления один или несколько цитокинов или профиль высвобождения цитокинов включают системное высвобождение IFN- γ , IL-12 и/или IL-18. Это можно контролировать общепринятыми способами. Количество, которое является эффективным для выработки одного или нескольких требуемых иммунных ответов может также представлять собой количество композиции, представленной в данном документе, которое производит желательный терапевтический эффект или желательный терапевтический результат.

Эффективные количества будут зависеть, конечно, от конкретного субъекта, подлежащего лечению; тяжести состояния, заболевания или расстройства; индивидуальных параметров пациента, включающих возраст, физическое состояние, размер тела и вес; продолжительность лечения; природы сопутствующей терапии (если присутствует); определенного пути введения и подобных факторов в пределах знания и практического опыта врача-терапевта. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области техники и могут предусматривать не более чем общепринятое проведение исследования. В целом предпочтительно, чтобы применялась "максимальная доза", т.е. наивысшая безопасная доза, в соответствии с результатами тщательной медицинской оценки. Специалистам в данной области будет понятно, однако, что пациент может настаивать на более низкой дозе или переносимой дозе по медицинским причинам, психологическим причинам или по сути по любым другим причинам.

В вариантах осуществления выбор дозы адъюванта(ов), соединенного с наноносителями, зависит от сравнения с дозами отдельного адъюванта(ов) (т.е. не соединенного с наноносителями), которые вырабатывают сходный иммунный ответ (с или без антигена). Как используется в данном документе, "сходный иммунный ответ" включает иммунные ответы, которые согласно прогнозу врача-терапевта приводят в

результате к сравнимому терапевтическому результату у субъекта. Сходные иммунные ответы также включают иммунные ответы, которые представляют собой один и тот же тип ответа (например, индукция одного и того же конкретного цитокина или набора цитокинов, выработка одного и того же титра антител и т.д.), уровень которых не рассматривается статистически различным.

Можно определить, вырабатывается или нет сходный иммунный ответ, при помощи *in vitro* или *in vivo* методик. Например, выработался или нет сходный иммунный ответ посредством введения субъекту дозы отделенного адъюванта (с антигеном или без антигена) можно определить путем измерения у субъекта иммунного ответа (например, титра антител или высвобождения цитокина(ов)). Субъект не обязательно является одним и тем же субъектом, которому вводят композицию согласно изобретению, включающую адъювант, соединенный с наноносителем, в способах согласно изобретению. Субъект, например, может быть субъектом клинического исследования или субъектами, которым ранее была введена доза отделенного адъюванта. Субъект также может быть субъектом, являющимся животной моделью, или субъектами, которым ранее была введена доза отделенного адъюванта. Определение иммунного ответа у субъекта также может быть определено путем измерения ответа клеток, выделенных от субъекта, или клеток от другого субъекта или субъектов, которые контактируют с дозой отделенного адъюванта (с антигеном или без антигена). Другой субъект или субъекты могут быть снова субъектами предыдущего клинического исследования или субъектами, являющимися животной моделью.

В вариантах осуществления сравнение, основанное на измерении иммунного ответа (например, конкретного типа титра антител, уровня конкретного цитокина, уровней набора цитокинов), можно осуществить в пределах первых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40 или более часов после иммунизации дозой отделенного адъюванта. В других вариантах осуществления иммунный ответ измеряют в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более дней после иммунизации. Анализы для определения, является ли иммунный ответ сходным или нет, известны специалистам в данной области техники. Дополнительно, примеры таких анализов более подробно описаны в примерах.

Также можно определить, вырабатывает ли доза отделенного адъюванта (с антигеном или без антигена) сходный иммунный ответ согласно прогнозу врачом-терапевтом иммунного ответа (или уровня иммунного ответа) на основе результатов предшествующих *in vitro* и/или *in vivo* анализов (на других субъектах). Такие результаты могут включать результаты из клинических исследований, в которых определили эффективные дозы. Соответственно, доза отделенного адъюванта, которая используется в сравнении, представляет собой количество, эффективное согласно прогнозу врача-терапевта для продукции иммунного ответа или терапевтического эффекта. В другом варианте осуществления доза отделенного адъюванта, которая используется в сравнении, представляет собой дозу отделенного адъюванта, являющуюся максимальной переносимой дозой согласно прогнозу врача-терапевта. В вариантах осуществления доза соединенного адъюванта является в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз меньше дозы отделенного адъюванта, которое представляет собой количество, эффективное для выработки иммунного ответа или терапевтического результата, представленного в данном документе. В других вариантах осуществления доза соединенного адъюванта является по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз меньше дозы отделенного адъюванта, которая является максимальной переносимой дозой. В других вариантах осуществления доза соединенных адъювантов больше дозы отделенного адъюванта, которая представляет собой количество, эффективное для выработки иммунного ответа или терапевтического результата, представленного в данном документе. В других вариантах осуществления доза соединенного адъюванта больше дозы отделенного адъюванта, которая является максимальной переносимой дозой.

В большинстве случаев дозы адъюванта(ов) или антигена(ов) композиций настоящего изобретения могут находиться в диапазоне от около 0,001 мкг/кг до около 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 0,01 мкг/кг до около 10 мг/кг. В очередных вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 0,1 мкг/кг до около 5 мг/кг, от около 1 мкг/кг до около 1 мг/кг, от около 10 мкг/кг до около 0,5 мг/кг или от около 100 мкг/кг до около 0,5 мг/кг. В дополнительных вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 0,1 мкг/кг до около 100 мкг/кг. В очередных дополнительных вариантах осуществления дозы могут находиться в диапазоне от около 30 мкг/кг до около 300 мкг/кг. Альтернативно, дозу можно вводить на основе количества синтетических наноносителей. Например, применимые дозы включают больше 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} синтетических наноносителей на дозу. Другие примеры применимых доз включают 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 дозу.

В вариантах осуществления доза является "субтерапевтической дозой", что означает количество (например, указанное количество единиц массы) адъюванта (или адъювантов), которое обеспечивает желательный терапевтический исход, где субтерапевтическая доза представляет собой количество, которое численно меньше необходимого количества для обеспечения практически такого же терапевтического исхода, если вводится отдельно. В этом контексте "отделенный" или "отдельно" означает, что адъювант (или адъюванты) не соединен с синтетическим наноносителем. В варианте осуществления субтерапевти-

ческая доза R848 включает от 0,01 микрограмм/кг до 100 микрограмм/кг, предпочтительно от 0,1 микрограмм/кг до 10 микрограмм/кг R848. В варианте осуществления субтерапевтическая доза CpG, содержащего олигонуклеотид, включает от 0,001 мкг/кг до 2 мг/кг, предпочтительно от около 0,01 мкг/кг до 0,1 мг/кг CpG, содержащего олигонуклеотид. В еще одном варианте осуществления субтерапевтическая доза иммунологически активной нуклеиновой кислоты или ее производного включает от 0,001 мкг/кг до 2 мг/кг, предпочтительно от 0,01 мкг/кг до 0,1 мг/кг. В другом варианте осуществления субтерапевтическая доза MPL® включает от 0,001 мкг/кг до 0,5 мг/кг.

В других вариантах осуществления доза является "дозой со сниженной токсичностью", что означает дозу адъюванта, которая обеспечивает конкретное системное высвобождение цитокинов, предпочтительно конкретный профиль системного высвобождения цитокинов, где доза со сниженной токсичностью больше дозы адъюванта, необходимой для обеспечения практически такого же конкретного системного высвобождения цитокинов, предпочтительно конкретного профиля системного высвобождения цитокинов, если адъювант вводится отдельно. В этом контексте "отдельно" означает адъювант, который не соединен с синтетическим наноносителем. Дополнительно, "профиль системного высвобождения цитокинов" означает характер системного высвобождения цитокинов, где характер включает уровни цитокинов, измеренные для нескольких различных системных цитокинов. В варианте осуществления доза со сниженной токсичностью R848 включает от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг R848. В варианте осуществления доза со сниженной токсичностью CpG, содержащего олигонуклеотид, включает от 0,001 мг/кг до 2 мг/кг, предпочтительно от 0,01 мкг/кг микрограмм до 0,1 мг/кг CpG, содержащего олигонуклеотид. В другом варианте осуществления субтерапевтическая доза MPL® включает от 0,001 мкг/кг до 0,5 мг/кг.

"Иммунный ответ с антителами" означает любой иммунный ответ, который приводит в результате к продукции или стимуляции В-клеток и/или продукции антител. "Титр антител" означает продукцию измеримого уровня антител. Предпочтительно иммунный ответ с антителами или выработка титра антител происходит у человека. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой антитела определенного изотипа, такого как IgG или его подкласс. Способы измерения титра антител известны в данной области техники и включают фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA). Способы измерения титра антител также довольно подробно описаны в примерах. Предпочтительно иммунный ответ с антителами или титр антител является специфичным к антигену. Такой антиген можно вводить совместно с адъювантом, соединенным с наноносителем, но также можно не вводить совместно.

"Антиген" означает антиген для В-клеток или антиген для Т-клеток. В вариантах осуществления антигены соединены с синтетическими наноносителями. В других вариантах осуществления антигены не соединены с синтетическими наноносителями. В вариантах осуществления антигены вводят совместно с синтетическими наноносителями. В других вариантах осуществления антигены не вводят совместно с синтетическими наноносителями. "Тип(ы) антигенов" означает молекулы, которые имеют одинаковые или практически одинаковые антигенные характеристики. В вариантах осуществления антигены обеспеченных композиций ассоциированы с заболеванием или состоянием, которое подлежит лечению. Например, антиген может представлять собой аллерген (для лечения аллергии или аллергического состояния), ассоциированный с раком антиген (для лечения рака или опухоли), антиген инфекционного агента (для лечения инфекции, инфекционного заболевания или хронического инфекционного заболевания) и т.д.

"По меньшей мере часть дозы" означает по меньшей мере какую-либо часть дозы, находящуюся в диапазоне до включающей всю дозу.

Субъект, "который подвергается риску" является таковым, который, как полагает врач-терапевт, имеет шанс подвергнуться заболеванию или состоянию, указанному в данном документе.

"Антиген для В-клеток" означает любой антиген, который распознается В-клеткой и запускает иммунный ответ в В-клетке (например, антиген, который, в частности, распознается В-клеточным рецептором на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления антиген, который является антигеном для Т-клеток, также является антигеном для В-клеток. В других вариантах осуществления антиген для Т-клеток не является также антигеном для В-клеток. Антигены для В-клеток включают без ограничений белки, пептиды, малые молекулы и углеводы. В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клеток включает небелковый антиген (т.е. антиген, не являющийся белком или пептидом). В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клеток включает углевод, ассоциированный с инфекционным агентом. В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клеток включает гликопротеин или гликопептид, ассоциированный с инфекционным агентом.

Инфекционным агентом может являться бактерия, вирус, грибок, простейшее, паразит или прион. В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клеток включает слабо иммуногенный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клетки включает вещество, которым злоупотребляют, или его часть. В некоторых вариантах осуществления, антиген для В-клетки включает вещество, вызывающее зависимость, или его часть. Вещества, вызывающие зависимость, включают без ограничений никотин, наркотическое средство, средство от кашля, транквилизатор и седативное средство. В некоторых вариантах осуществления антиген для В-клеток включает токсин, такой как токсин из химического

оружия или естественного источника, или загрязнитель. Антиген для В-клеток может также включать вредное экзогенное средство. В других вариантах осуществления антиген для В-клеток включает аллоантиген, аллерген, контактный аллерген, антиген дегенеративного заболевания, гаптен, антиген инфекционного заболевания, антиген злокачественной опухоли, антиген атопического заболевания, антиген аутоиммунного заболевания, вещество, вызывающее зависимость, ксеноантиген или фермент метаболического заболевания или его ферментативный продукт.

"Выбор" означает осуществление отбора либо непосредственно самостоятельно, либо опосредованно, например, но не ограничиваясь этим, несвязанной третьей стороной, которая предпринимает действия, опираясь на свои слова или поступки. Как правило, один и тот же субъект (например, лицо, группа лиц, действующих совместно, или организация) обеспечивает композицию, представленную в данном документе, и выработку желательного иммунного ответа посредством введения композиции также после отбора соответствующей дозы композиции.

"Вводят совместно" означает введение двух или более веществ субъекту способом, который согласовывают по времени, предпочтительно согласовывают по времени таким образом, чтобы обеспечить модуляцию в иммунном ответе. В вариантах осуществления совместное введение может иметь место вследствие введения двух или более веществ в одной и той же лекарственной форме. В других вариантах осуществления совместное введение может охватывать введение двух или более веществ в различных лекарственных формах, но в пределах обозначенного периода времени, предпочтительно в пределах 1 месяца, более предпочтительно в пределах 1 недели, еще более предпочтительно в пределах 1 дня и даже еще более предпочтительно в пределах 1 ч.

"Соединять" или "Соединенный" или "Соединяет" (и т.п.) относится к химическому ассоциированию одного вещества (например, фрагмента) с другим. В некоторых вариантах осуществления соединение является ковалентным, означающим, что соединение происходит в контексте присутствия ковалентной связи между двумя структурными единицами. В нековалентных вариантах осуществления нековалентное соединение опосредуется нековалентными взаимодействиями, включающими без ограничения взаимодействия зарядов, аффинные взаимодействия, металлокоординацию, физическую адсорбцию, взаимодействия гость-хозяин, гидрофобные взаимодействия, ТТ-стэкинг взаимодействия, взаимодействия с водородными связями, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, магнитные взаимодействия, электростатические взаимодействия, диполь-дипольные взаимодействия и/или их комбинации. В вариантах осуществления инкапсулирование представляет собой форму соединения. В вариантах осуществления по меньшей мере часть дозы адъюванта(ов) соединена с синтетическими наноносителями, предпочтительно вся доза адъюванта(ов) соединена с синтетическими наноносителями. В вариантах осуществления по меньшей мере часть дозы адъюванта(ов) не соединена с синтетическими наноносителями.

"Лекарственная форма" означает фармакологически и/или иммунологически активный материал в среде, носителе, разбавителе или устройстве, пригодном для введения субъекту. В вариантах осуществления по меньшей мере одна лекарственная форма согласно изобретению может включать дозу адъюванта или многих адъювантов. В вариантах осуществления более чем одна лекарственная форма включает дозу адъюванта, предпочтительно в таких вариантах осуществления более чем одну лекарственную форму вводят совместно.

"Инкапсулировать" означает заключать внутрь синтетического наноносителя, предпочтительно полностью заключать внутрь синтетического наноносителя. Большая часть или все вещество, которое инкапсулируют, не доступно для местного окружения, внешнего по отношению к синтетическому наноносителю. Инкапсулирование отличается от абсорбции, при которой большая часть или все вещество помещается на поверхность синтетического наноносителя, и вещество остается доступным для местного окружения, внешнего по отношению к синтетическому наноносителю.

"Выработка" означает вызывание действия, такого как титр антител против антигена или системное высвобождение цитокинов, либо непосредственно самостоятельно, либо опосредованно, например, но не ограничиваясь этим, несвязанной третьей стороной, которая предпринимает действие, опираясь на свои слова или поступки.

"Инфекция" или "инфекционное заболевание" представляет собой любое состояние или заболевание, вызванное микроорганизмом, патогеном или другим агентом, таким как бактерия, грибок, прion или вирус.

"Выделенная нуклеиновая кислота" означает нуклеиновую кислоту, которая отделена от своего нативного окружения и присутствует в достаточном количестве, позволяющем осуществить ее идентификацию или применение. Выделенная нуклеиновая кислота представляет собой таковую, которая (i) амплифицирована *in vitro* посредством, например, полимеразной цепной реакции (PCR); (ii) продуцирована рекомбинантно посредством клонирования; (iii) очищена, как например расщеплением и гелевым разделением; или (iv) синтезирована посредством, например, химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота представляет собой таковую, с которой легко манипулировать посредством методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных в настоящем уровне техники. Таким образом, нуклеотидная последовательность, содержащаяся в векторе, в котором известны 5' и 3' сайты рестрикции, или для которого были раскрыты последовательности праймеров полимеразной цепной реакции (PCR), считается выде-

ленной, с другой стороны последовательность нуклеиновой кислоты, существующей в своем нативном состоянии в своем естественном хозяине, не считается таковой. Выделенная нуклеиновая кислота может быть в основном очищенной, но это не обязательно. Например, нуклеиновая кислота, которая является выделенной в составе клонирующего вектора или вектора экспрессии, не является чистой, в том смысле, что она может составлять только ничтожную долю материала в клетке, в которой она находится. Такая нуклеиновая кислота является выделенной, однако, в смысле используемого в данном документе выражения, поскольку оно явно используется для стандартных методик, известных специалистам в данной области техники. Любая из представленных в данном документе нуклеиновых кислот может быть выделенной. В некоторых вариантах осуществления антигены в композициях, обеспеченных в данном документе, присутствуют в форме выделенной нуклеиновой кислоты, такой как выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенный пептид, полипептид или белок.

"Выделенный пептид, полипептид или белок" означает полипептид (или пептид, или белок), отделенный от своего нативного окружения и присутствующий в достаточном количестве, позволяющем осуществить его идентификацию или применение. Это означает, например, что полипептид (или пептид, или белок) может быть (i) селективно продуцирован посредством экспрессионного клонирования или (ii) очищен, как например, посредством хроматографии или электрофореза. Выделенные пептиды, белки или полипептиды могут быть, но не обязательно, в основном чистыми. Поскольку выделенный пептид, полипептид или белок можно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтическом препарате, полипептид (или пептид, или белок) может составлять лишь небольшую долю от веса препарата. Полипептид (или пептид, или белок) является все же выделенным, в том смысле, что его отделили от веществ, с которыми он мог быть ассоциирован в живых системах, т.е. выделен из других белков (или пептидов, или полипептидов). Любой из пептидов, полипептидов или белков, представленных в данном документе, может быть выделенным. В некоторых вариантах осуществления антигены в композициях, представленных в данном документе, находятся в форме пептидов, полипептидов или белков.

"Максимальное измерение синтетического наноносителя" означает наибольшее измерение наноносителя, измеренное вдоль любой оси синтетического наноносителя. "Минимальное измерение синтетического наноносителя" означает наименьшее измерение синтетического наноносителя, измеренное вдоль любой оси синтетического наноносителя. Например, для сфероидального синтетического наноносителя максимальное и минимальное измерение синтетического наноносителя будут практически идентичны, и будут представлять собой размер его диаметра. Подобным образом, для кубоидального синтетического наноносителя минимальное измерение синтетического наноносителя будет представлять собой наименьшее из его высоты, ширины или длины, тогда как максимальное измерение синтетического наноносителя будет представлять собой наибольшее из его высоты, ширины или длины. В варианте осуществления минимальное измерение по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, исходя из общего числа синтетических наноносителей в образце, больше 100 нм. В варианте осуществления максимальное измерение по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, исходя из общего числа синтетических наноносителей в образце, равно или меньше 5 мкм. Предпочтительно минимальное измерение по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, синтетических наноносителей в образце, исходя из общего числа синтетических наноносителей в образце больше 110 нм, более предпочтительно больше 120 нм, более предпочтительно больше 130 нм и еще более предпочтительно больше 150 нм. Соотношения максимального и минимального измерений синтетических наноносителей согласно изобретению могут варьировать в зависимости от варианта осуществления. Например, отношения максимального к минимальному измерениям синтетических наноносителей могут варьировать от 1:1 до 1000000:1, предпочтительно от 1:1 до 100000:1, более предпочтительно от 1:1 до 1000:1, еще предпочтительнее от 1:1 до 100:1 и даже более предпочтительно от 1:1 до 10:1. Предпочтительно максимальное измерение по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, исходя из общего числа синтетических наноносителей в образце, равно или меньше 3 мкм, более предпочтительно равно или меньше 2 мкм, более предпочтительно равно или меньше 1 мкм, более предпочтительно равно или меньше 800 нм, более предпочтительно равно или меньше 600 нм и еще более предпочтительно равно или меньше 500 нм. В предпочтительных вариантах осуществления максимальное измерение по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% синтетических наноносителей в образце, исходя из общего числа синтетических наноносителей в образце, равно или больше 100 нм, более предпочтительно равно или больше 120 нм, более предпочтительно равно или больше 130 нм, более предпочтительно равно или больше 140 нм и еще более предпочтительно равно или больше 150 нм. Измерение размеров синтетического наноносителя получают, суспендируя синтетические наноносители в жидкой (как правило, водной) среде и с использованием динамического рассеяния света (например, с использованием аппарата Brookhaven ZetaPALS).

"Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель" означает фармакологически неактивный материал, применяемый вместе с перечисленными синтетическими наноносителями для составления

композиций согласно изобретению. Фармацевтически приемлемые носители или наполнители включают ряд материалов, известных в настоящем уровне техники, в том числе без ограничения сахариды (такие как глюкоза, лактоза и т.п.), консерванты, такие как противомикробные средства, восстанавливающие средства, окрашивающие средства, солевой раствор (такой как фосфатный буферный раствор) и буферы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые носители или наполнители включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные разбавители, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

"Субъект" означает животных, в том числе теплокровных млекопитающих, таких как люди и приматы; птиц; домашних комнатных или сельскохозяйственных животных, таких как кошки, собаки, овцы, козы, крупный рогатый скот, лошади и свиньи; лабораторных животных, таких как мыши, крысы и морские свинки; рыб; рептилий; зоопарковых и диких животных и т.п.

"Синтетический(е) наноноситель(и)" означает дискретный объект, который не обнаруживается в природе, и который обладает по меньшей мере одним измерением, которое меньше или равно размеру 5 микронов. Альбуминовые наночастицы обычно входят в состав синтетических наноносителей, однако в определенных вариантах осуществления синтетические наноносители не включают альбуминовые наночастицы. В вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители не включают хитозан. Синтетический наноноситель может представлять собой без ограничений одну или множество наночастиц на основе липидов (например, липосомы) (также именуемые в данном документе липидными наночастицами, т.е. наночастицами, где большая часть материала, составляющая их структуру, представляет собой липиды), полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активного вещества, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы (т.е. частицы, которые, в основном, составлены из вирусных структурных белков, но не являются инфекционными или имеют низкую инфекционность), пептидные частицы или частицы на основе белков (также именуемые здесь белковыми частицами, т.е. частицами, где большая часть материала, составляющая их структуру, представляет собой пептиды или белки) (такие как альбуминовые наночастицы) и/или наночастицы, которые разрабатывают с использованием комбинации наноматериалов, таких как липидно-полимерные наночастицы. Синтетические наноносители могут иметь множество разнообразных форм, включающих без ограничения сфероидальные, кубоидальные, пирамидальные, продолговатые, цилиндрические, тороидальные и т.п. Синтетические наноносители по настоящему изобретению включают одну или несколько поверхностей, в том числе без ограничений внутренние поверхности (поверхности, главным образом обращенные к внутренней части синтетического наноносителя) и внешние поверхности (поверхности, главным образом обращенные к внешнему окружению синтетического наноносителя). Иллюстративные синтетические наноносители, которые можно адаптировать для применения на практике настоящего изобретения включают: (1) биоразлагаемые наночастицы, раскрытые в патенте США № 5543158, Gref et al., (2) полимерные наночастицы из опубликованной патентной заявки США № 20060002852, Saltzman et al., (4) наночастицы, конструируемые литографическим способом, из опубликованной патентной заявки США № 20090028910, DeSimone et al., (5) раскрытие WO 2009/051837, von Andrian et al., (6) наночастицы, раскрытые в опубликованной патентной заявке США № 2008/0145441, Penades et al.

Синтетические наноносители по настоящему изобретению, которые обладают минимальным измерением равным или меньше около 100 нм, предпочтительно равным или меньше 100 нм, не содержат поверхность с гидроксильными группами, которые активируют комплемент, или альтернативно содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, которые не являются гидроксильными группами, активирующими комплемент. В предпочтительном варианте осуществления синтетические наноносители по настоящему изобретению, обладающие минимальным измерением, равным или меньше около 100 нм, предпочтительно равным или меньше 100 нм, не содержат поверхность, существенно активирующую комплемент или альтернативно содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, существенно не активирующих комплемент. В более предпочтительном варианте осуществления синтетические наноносители по настоящему изобретению, которые обладают минимальным измерением равным или меньше около 100 нм, предпочтительно равным или меньше 100 нм, не содержат поверхность, активирующую комплемент или альтернативно содержат поверхность, которая состоит в основном из фрагментов, не активирующих комплемент. В вариантах осуществления синтетические наноносители могут иметь аспектное отношение больше 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 или больше 1:10.

"Системное высвобождение цитокинов" означает системное высвобождение одного или нескольких конкретных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления системное высвобождение цитокинов представляет собой конкретный профиль системного высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления конкретное системное высвобождение цитокинов, предпочтительно конкретный профиль системного высвобождения цитокинов, происходит у человека. В вариантах осуществления композиции и способы, представленные в данном документе, (когда по меньшей мере часть дозы адъюванта соединена с наноносителями, приводят в результате к конкретному профилю системного высвобождения цитокинов у субъекта). Выражение "отделенный" или "отдельно" также используют для обозначения адъюванта, который не соединен с какими-либо синтетическими наноносителями. Кроме того, "профиль сис-

темного высвобождения цитокинов" означает характер системного высвобождения цитокинов, где характер включает уровни цитокинов измеренные для нескольких различных системных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления конкретный профиль системного высвобождения цитокинов включает системное высвобождение TNF- α , IL-6 и/или IL-12. В других вариантах осуществления конкретный профиль системного высвобождения цитокинов включает системное высвобождение IFN- γ , IL12 и/или IL-18.

"Антиген для Т-клеток" означает любой антиген, который распознается и запускает иммунный ответ в Т-клетке (например, антиген, который, в частности, распознается Т-клеточным рецептором на Т-клетке или NKT-клетке путем презентации антигена или его части, связанной с молекулой комплекса гистосовместимости (МНС) I класса или II класса, или связанной с CD1-комплексом). В некоторых вариантах осуществления антиген, который является антигеном для Т-клеток, также является антигеном для В-клеток. В других вариантах осуществления антиген для Т-клеток не является также антигеном для В-клеток. Антигены для Т-клеток, как правило, представляют собой белки, полипептиды или пептиды. Антигены для Т-клеток могут представлять собой антиген, стимулирующий CD8⁺ Т-клеточный ответ, CD4⁺ Т-клеточный ответ или оба. Наночносители, следовательно, в некоторых вариантах осуществления могут эффективно стимулировать оба типа ответов.

В некоторых вариантах осуществления антиген для Т-клеток является "универсальным" антигеном для Т-клеток или антигеном для Т-клеток памяти, (т.е. таким, к которому субъект имеет предсуществующую память, и который может использоваться, чтобы стимулировать Т-клетку оказывать хелперный сигнал по отношению несвязанного антигена, например несвязанного антигена для В-клеток). Универсальные антигены для Т-клеток включают столбнячный анатоксин, также один или несколько пептидов, произошедших от столбнячного анатоксина, вирус Эпштейна-Барра или вирус гриппа. Универсальные антигены для Т-клеток также включают компоненты вируса гриппа, такие как гемагглютинин, нейраминидазу или ядерный белок, или один или несколько пептидов, произошедших от них. В некоторых вариантах осуществления универсальный антиген для Т-клеток не является таковым, который презентруется в комплексе с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления универсальный антиген для Т-клеток не входит в комплекс с молекулой МНС для презентации Т-хелперной клетке. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления универсальный антиген для Т-клеток не является антигеном для Т-хелперных клеток. Однако в других вариантах осуществления универсальный антиген для Т-клеток является антигеном для Т-хелперных клеток. В вариантах осуществления антиген для Т-хелперных клеток может включать один или несколько пептидов, полученных или произошедших от столбнячного анатоксина, вируса Эпштейна-Барра, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса кори, вируса свинки, вируса краснухи, цитомегаловируса, аденовируса, дифтерийного анатоксина или PADRE-пептида (известного из работы Sette et al., патент США № 7202351). В других вариантах осуществления антиген для Т-хелперных клеток может включать овальбумин или пептид, полученный или произошедший от него. Предпочтительно овальбумин включает аминокислотную последовательность, установленную в № доступа AAB59956, NP_990483.1, AAA48998 или CAA2371. В других вариантах осуществления пептид, полученный или произошедший от овальбумина, включает следующую аминокислотную последовательность: H-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления антиген для Т-хелперных клеток может включать один или несколько липидов или гликолипидов, включающих без ограничения: α -галактозилцерамид (α -GalCer), гликофинголипиды с α -связью (из *Sphingomonas* spp.), галактозилдиацилглицерины (из *Borrelia burgdorferi*), липофосфогликан (из *Leishmania donovani*) и фосфатидилинозитолтетраманнозид (PIM4) (из *Mycobacterium leprae*). Для дополнительных липидов и/или гликолипидов, применимых в качестве антигена для Т-хелперных клеток, см. V. Cerundolo et al., "Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies." *Nature Rev Immun*, 9:28-38 (2009).

В вариантах осуществления антигены для CD4⁺ Т-клеток могут производными антигенов для CD4⁺ Т-клеток, которые получены из источника, такого как естественный источник. В таких вариантах осуществления последовательности антигена для CD4⁺ Т-клетки, например как те пептиды, которые связываются с МНС II, могут обладать по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с антигеном, полученным из источника. В вариантах осуществления антиген для Т-клеток, предпочтительно универсальный антиген для Т-клеток или антиген для Т-хелперных клеток, может быть соединен с или отсоединен от синтетического наноносителя. В некоторых вариантах осуществления универсальный антиген для Т-клетки или антиген для Т-хелперных клеток инкапсулирован в синтетические наноносители изобретательских композиций.

"Вакцина" означает композицию вещества, которое улучшает иммунный ответ в отношении конкретного патогена или заболевания. Вакцина типично содержит факторы, которые стимулируют иммунную систему субъекта к распознаванию специфичного антигена в качестве чужеродного и удалению его из организма субъекта. Вакцина также создает иммунологическую "память", таким образом, антиген будет быстро распознаваться, и на него будет вырабатываться ответ, если человек подвергается повторной антигенной стимуляции. Вакцины могут быть профилактическими (например, для предотвращения бу-

дущего инфицирования каким-либо патогеном) или терапевтическими (например, вакцина против опухолеспецифичных антигенов для лечения рака или против антигена, произошедшего из инфекционного агента для лечения инфекции или инфекционного заболевания). В вариантах осуществления вакцина может включать лекарственные формы по настоящему изобретению. Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления, данные вакцины содержат адъювант (или адъюванты), соединенный(ые) с синтетическим наноносителем.

В особых вариантах осуществления композиции согласно изобретению включают адъюванты, которые включают агонисты для Toll-подобных рецепторов (TLR) 7 и 8 ("агонисты TLR 7/8"). Среди общепринятых, соединения-агонисты TLR 7/8, раскрытые в патенте США № 6696076, Tomai et al., в том числе без ограничений имидазохинолин амины, имидазопиридин амины, 6,7-конденсированные циклоалкилимидазопиридин амины и имидазохинолин амины с мостиковыми связями в положении 1 и 2. Предпочтительные адъюванты включают имиквимод и R848.

В особых вариантах осуществления композиции согласно изобретению включают адъюванты, которые включают лиганд для Toll-подобного рецептора (TLR)-9, такой как иммуностимулирующие молекулы ДНК, содержащие CpG, которые индуцируют секрецию интерферона I типа и стимулируют активацию Т- и В-клеток, приводящую к повышенной продукции антител и ответам с цитотоксическими Т-клетками (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 1998. 6:496-500. В вариантах осуществления CpG могут включать модификации, предназначенные для усиления стабильности, такие как фосфотиоатные связи, или другие модификации, такие как модифицированные основания. См., например, патенты США № 5663153, 6194388, 7262286 или 7276489. В определенных вариантах осуществления для стимулирования иммунитета, а не устойчивости, представленная в данном документе композиция включает адъювант, который содействует созреванию DC (необходимо для примирования наивных Т-клеток) и продукции цитокинов, таких как интерфероны I типа, которые содействуют иммунным ответам с антителами и антивирусному иммунитету. В некоторых вариантах осуществления адъювант включает агонист TLR-4, такой как бактериальный липополисахарид (LPS), VSV-G и/или HMGB-1. В некоторых вариантах осуществления адъюванты включают цитокины, которые являются небольшими белками или биологическими факторами (в диапазоне 5-20 кДа), которые высвобождаются клетками и специфично воздействуют на клеточно-клеточное взаимодействие, связь и поведение других клеток. В некоторых вариантах осуществления адъюванты включают провоспалительные стимулы, высвобожденные из некротических клеток (например, кристаллы уратов). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами каскада реакций комплемента (например, CD21, CD35 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления адъюванты включают активированные компоненты иммунных комплексов. Адъюванты также включают таковые, которые включают агонисты рецепторов комплемента, такие как молекулы, которые связываются с CD21 или CD35. В некоторых вариантах осуществления агонист рецепторов комплемента индуцирует эндогенную опсонизацию синтетического наноносителя при помощи комплемента. Адъюванты также включают те, что включают агонисты цитокинового рецептора, такие как цитокин.

В некоторых вариантах осуществления агонист цитокинового рецептора является малой молекулой, антителом, белком слияния или аптамером. В вариантах осуществления адъюванты также могут включать иммуностимулирующие молекулы РНК, такие как без ограничения дцРНК или поли I:C (стимулятор TLR3) и/или раскрытые в F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" *Science* 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Иммунная модуляция с помощью химически модифицированных рибонуклеозидов и олигорибонуклеотидов (Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides)" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Иммуностимулирующие олигорибонуклеотиды, содержащие специфические мотив(ы) последовательности и нацеливающиеся на путь Toll-подобного рецептора 8 (Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway)" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Модифицированные олигорибонуклеотидные аналоги с усиленной иммуностимулирующей активностью (Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity)" публикация патентной заявки США № 2006241076; G. Lipford et al., "Иммуностимулирующие вирусные РНК-олигонуклеотиды и их применение для лечения рака и инфекций (Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections)" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Иммуностимулирующие G,U-содержащие олигорибонуклеотиды, композиции и способы скрининга (Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods)" WO 2003086280 A2.

В некоторых вариантах осуществления адъюванты включают адъюванты типа гель (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция и т.д.), микробные адъюванты (например, имму-

номодулирующие последовательности ДНК, которые включают CpG-мотивы; иммуностимулирующие молекулы РНК; эндотоксины, такие как монофосфориллипид А; экзотоксины, такие как холерный токсин, термолабильный токсин *E. coli* и коклюшный токсин; мурамилдипептид и т.д.); масляно-эмульсионные адъюванты или адъюванты на основе эмульгатора (например, адъювант Фрейнда, MF59 [Novartis], SAF и т.д.); корпускулярные адъюванты (например, липосомы, биodeградируемые микросферы, сапонины и т.д.); синтетические адъюванты (например, неионные блок-сополимеры, аналоги мурамилпептидов, полифосфазен, синтетические полинуклеотиды и т.д.) и/или их комбинации.

Композиции согласно изобретению

Большое разнообразие синтетических наноносителей можно применять по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются сферами или сфероидными. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются плоскими или пластинчатой формы. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются кубами или кубоидальными. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются овалами или эллипсами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители являются цилиндрами, конусами или пирамидами.

В некоторых вариантах осуществления желательным является применение популяции синтетических наноносителей, которые относительно единообразны в отношении размера, формы и/или состава, так что каждый синтетический наноноситель обладает похожими свойствами. Например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% синтетических наноносителей, исходя из общего числа синтетических наноносителей, может иметь минимальное измерение или максимальное измерение, находящееся в пределах 5%, 10% или 20% среднего диаметра или среднего измерения синтетических наноносителей. В некоторых вариантах осуществления популяция синтетических наноносителей может быть гетерогенной в отношении размера, формы и/или состава.

Синтетические наноносители могут быть монолитными или полыми и могут включать один или несколько слоев. В некоторых вариантах осуществления каждый слой имеет уникальный состав и уникальные свойства относительно другого(их) слоя(ев). Всего лишь один пример, синтетические наноносители могут обладать структурой ядро/оболочка, где ядро представляет собой один слой (например, полимерное ядро), а оболочка представляет собой второй слой (например, липидный бислой или монослой). Синтетические наноносители могут содержать множество различных слоев.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут необязательно содержать один или несколько липидов. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липосому. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липидный бислой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать липидный монослой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может включать мицеллу. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать ядро, содержащее полимерную матрицу, окруженную липидным слоем (например, липидным бислойем, липидным монослоем и т.д.). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель может содержать неполимерное ядро (например, металлическую частицу, квантовую точку, керамическую частицу, костную частицу, вирусную частицу, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и т.д.), окруженное липидным слоем (например, липидным бислойем, липидным монослоем и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут включать один или несколько полимеров или полимерных матриц. В некоторых вариантах осуществления такой полимер или полимерная матрица могут быть окружены покрывающим слоем (например, липосомой, липидным монослоем, мицеллой и т.д.). В некоторых вариантах осуществления различные элементы синтетических наноносителей могут быть соединены с полимером или полимерной матрицей.

В некоторых вариантах осуществления элемент, такой как иммуноактивная поверхность, нацеливающий фрагмент, антиген, адъювант и/или олигонуклеотид может быть ковалентно ассоциирован с полимерной матрицей. В некоторых вариантах осуществления ковалентная ассоциация опосредуется линкером. В некоторых вариантах осуществления элемент может быть нековалентно ассоциирован с полимерной матрицей. Например, в некоторых вариантах осуществления элемент может быть инкапсулирован внутри, окружен и/или диспергирован по всей толщине полимерной матрицы. Альтернативно или дополнительно, элемент может быть ассоциирован с полимерной матрицей посредством гидрофобных взаимодействий, взаимодействия зарядов, ван-дер-ваальсовых сил и т.д.

Большое разнообразие полимеров и способов образования из них полимерных матриц традиционно известны. В основном, полимерная матрица включает один или несколько полимеров. Полимеры могут быть естественными или неестественными (синтетическими) полимерами. Полимеры могут быть гомополимерами или сополимерами, содержащими два или более мономеров. В отношении последовательности сополимеры могут быть случайными, блоковыми или могут содержать комбинацию из случайных и блоковых последовательностей. Типично, полимеры в соответствии с настоящим изобретением представляют собой органические полимеры.

Примеры полимеров, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничений полиэтилены, поликарбонаты (например, поли(1,3-диоксан-2-он)), полиангидриды (например,

поли(себаценовый ангидрид)), полипропилфумараты, полиамиды (например, поликапролактан), полиацетаты, полиэфиры, сложные полиэфиры (например, полилактид, полигликолид, сополимер лактида и гликолида, поликапролактон, полигидроксикислота (например, поли(β -гидроксиалканокнат)), поли(сложные ортоэфиры), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины, полилизин, сополимеры полилизина и PEG, а также поли(этиленмин), сополимеры поли(этиленмина) и PEG.

В некоторых вариантах осуществления полимеры в соответствии с настоящим изобретением включают полимеры, которые были одобрены для применения на людях Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) на основании 21 C.F.R. § 177.2600, в том числе без ограничения сложные полиэфиры (например, полимолочная кислота, сополимер (молочной и гликолевой кислоты), поликапролактон, поливалеролактон, поли(1,3-диоксан-2-он)); полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)); полиэфиры (например, полиэтиленгликоль); полиуретаны; полиметакрилаты; полиакрилаты и полицианоакрилаты.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть гидрофильными. Например, полимеры могут содержать анионные группы (например, фосфатная группа, сульфатная группа, карбоксилатная группа); катионные группы (например, группа четвертичного амина) или полярные группы (например, гидроксильная группа, тиоловая группа, аминная группа). В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофильную полимерную матрицу, образует гидрофильную среду в пределах синтетического наноносителя. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть гидрофобными. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель, содержащий гидрофобную полимерную матрицу, образует гидрофобную среду в пределах синтетического наноносителя. Выбор гидрофильности или гидрофобности полимера может иметь влияние на природу материалов, которые включаются (например, соединены) в синтетический наноноситель.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью одного или нескольких фрагментов и/или функциональных групп. В соответствии с настоящим изобретением можно применять ряд фрагментов или функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью полиэтиленгликоля (PEG), с помощью углевода и/или с помощью ациклических полиацеталей, произошедших от полисахаридов (Parisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Определенные варианты осуществления могут быть выполнены с использованием основных идей патента США № 5543158, Gref et al., или публикации международной заявки WO 2009/051837, Von Andrian et al.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью липидной или жирнокислотной группы. В некоторых вариантах осуществления жирнокислотная группа может представлять собой одну или несколько из масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой, бегеновой или лигноцериновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления жирнокислотная группа может представлять собой одну или несколько из пальмитолеиновой, олеиновой, вакценовой, линолевой, альфа-линолевой, гамма-линолевой, арахидоновой, гадолеиновой, арахидоновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой или эруковой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой сложные полиэфиры, в том числе сополимеры, содержащие единицы молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как сополимер(молочной и гликолевой кислоты) и сополимер лактида и гликолида, вместе указываемые в данном документе как "PLGA"; и гомополимеры, содержащие единицы гликолевой кислоты, указываемые в данном документе как "PGA," и единицы 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, вместе указываемые здесь как "PLA". В некоторых вариантах осуществления иллюстративные сложные полиэфиры включают, например, полигидроксикислоты; сополимеры PEG и сополимеры лактида и гликолида (например, сополимеры PLA и PEG, сополимеры PGA и PEG, сополимеры PLGA и PEG и их производные). В некоторых вариантах осуществления сложные полиэфиры включают, например, поли(капролактон), сополимеры поли(капролактона) и PEG, сополимеры L-лактида и L-лизина, поли(сериновый сложный эфир), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир), поли[α -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] и их производные.

В некоторых вариантах осуществления полимер может представлять собой PLGA. PLGA является биосовместимым и биоразлагаемым сополимером молочной кислоты и гликолевой кислоты, и различные формы PLGA характеризуют по соотношению молочная кислота:гликолевая кислота. Молочная кислота может представлять собой L-молочную кислоту, D-молочную кислоту или D,L-молочную кислоту. Скорость распадаемости PLGA можно регулировать путем изменения соотношения молочная кислота:гликолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления применяемый в соответствии с настоящим изобретением PLGA характеризуется соотношением молочная кислота:гликолевая кислота приблизительно 85:15, приблизительно 75:25, приблизительно 60:40, приблизительно 50:50, приблизительно 40:60, приблизительно 25:75 или приблизительно 15:85.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой один или несколько акриловых полимеров. В определенных вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксизетилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, сополимер аминоксилметакрилата, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), сополимер алкиламида метакриловой кислоты, поли(метилметакрилат), поли(метакриловой кислоты ангидрид), метилметакрилат, полиметакрилат, сополимер поли(метилметакрилата), полиакриламид, сополимер аминоксилметакрилата, сополимеры глицидилметакрилата, полицианоакрилаты, а также комбинации, содержащие один или несколько из вышеуказанных полимеров. Акриловый полимер может включать полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот с низким содержанием групп четвертичного аммония.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой катионные полимеры. В основном, катионные полимеры способны конденсировать и/или защищать отрицательно заряженные цепи нуклеиновых кислот (например, ДНК или ее производных). Аминосодержащие полимеры, такие как поли(лизин) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97 и Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), поли(этиленмин) (PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1995, 92:7297), и поли(амидоамин)-дендримеры (Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:4897; Tang et al., 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7:703; и Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4:372) положительно заряжены при физиологическом pH, образуют ионные пары с нуклеиновыми кислотами и опосредуют трансфекцию в ряде клеточных линий. В вариантах осуществления изобретательские синтетические наночастицы могут не содержать (или могут исключать) катионные полимеры.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой разлагаемые сложные полиэфиры, несущие катионные боковые цепи (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; и Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Примеры этих сложных полиэфиров включают сополимер L-лактида и L-лизина (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), поли(сериновый сложный эфир) (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; и Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633) и поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; и Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

Свойства данных и других полимеров и способы их получения хорошо известны в настоящем уровне техники (см., например, патенты США № 6123727; 5804178; 5770417; 5736372; 5716404; 6095148; 5837752; 5902599; 5696175; 5514378; 5512600; 5399665; 5019379; 5010167; 4806621; 4638045 и 4946929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; и Urich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). В целом, ряд способов для синтеза определенных подходящих полимеров описаны в *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. 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 представлять собой линейные или разветвленные полимеры. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой дендримеры. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть в существенной степени поперечно-сшиты друг с другом. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут в существенной степени не содержать поперечных сшивок. В некоторых вариантах осуществления полимеры можно применять в соответствии с настоящим изобретением без прохождения этапа образования поперечных сшивок. В дальнейшем следует понимать, что синтетические наночастицы согласно изобретению могут включать блок-сополимеры, привитые сополимеры, комбинации, смеси и/или аддукты из любых из вышеупомянутых и других полимеров. Специалисты в данной области техники будут учитывать, что полимеры, перечисленные здесь, представляют иллюстративный, не исчерпывающий, список полимеров, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы содержат один или несколько полимеров. Полимерные синтетические наночастицы, следовательно, также могут включать описываемые в публикации международной заявки WO 2009/051837, Von Andrian et al., в том числе без ограничения таковые с одним или несколькими гидрофильными компонентами. Предпочтительно один или несколько полимеров включают сложный полиэфир, такой как поли(молочная кислота), поли(гликолевая кислота), сополимер молочной и гликолевой кислоты или поликапролактон. Более предпочтительно один или несколько полимеров включают или дополнительно включают сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером, таким как полиэфир. В вариантах осуществления полиэфир включает полиэтиленгликоль. Еще более предпочтительно один или несколько полимеров включают сложный полиэфир и сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером, таким как полиэфир. В других вариантах осуществления один или несколько полимеров соединяют с одним или несколькими антигенами и/или одним или несколькими адъювантами. В вариантах осуществления по меньшей мере некото-

рые из полимеров соединяют с антигеном(ами) и/или по меньшей мере некоторые из полимеров соединяют с адьювантом(ами). Предпочтительно, если присутствует более одного типа полимера, один из типов полимера соединяют с антигеном(ами). В вариантах осуществления один из других типов полимера соединяют с адьювантом(ами). Например, в вариантах осуществления, когда наночастицы содержат сложный полиэфир и сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером, таким как полиэфир, сложный полиэфир соединяют с адьювантом, тогда как сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером, таким как полиэфир, соединяют с антигеном(ами). В вариантах осуществления, где наночастицы содержат антиген для Т-хелперных клеток, антиген для Т-хелперных клеток может быть инкапсулирован в наночастицу.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут не содержать полимерный компонент. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут содержать металлические частицы, квантовые точки, керамические частицы и т.д. В некоторых вариантах осуществления непolyмерный синтетический наночастица представляет собой совокупность из непolyмерных компонентов, такую как совокупность атомов металла (например, атомов золота).

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут необязательно содержать одну или несколько амфифильных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления амфифильная структурная единица может содействовать получению синтетических наночастиц с повышенной стабильностью, усовершенствованной однородностью или повышенной вязкостью. В некоторых вариантах осуществления амфифильные структурные единицы могут быть ассоциированы с внутренней поверхностью липидной мембраны (например, липидным бислоем, липидным монослоем и т.д.). Многие амфифильные структурные единицы, известные в настоящем уровне техники, подходят для применения в получении синтетических наночастиц в соответствии с настоящим изобретением. Такие амфифильные структурные единицы включают без ограничений фосфоглицериды; фосфатидилхолины; дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC); диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE); диолеилоксипропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеилфосфатидилхолин; холестерин; сложный эфир холестерина; диацилглицерин; диацилглицеринсукцинат; дифосфатидилглицерин (DPPG); гександеканол; жирные спирты, такие как полиэтиленгликоль (PEG); полиоксипропилен-9-лауриловый эфир; поверхностно-активную жирную кислоту, такую как пальмитиновую кислоту или олеиновую кислоту; жирные кислоты; моноглицериды жирных кислот; диглицериды жирных кислот; амиды жирных кислот; сорбитантриолеат (Span®85) гликохолат; сорбитанмонолаурат (Span®20); полисорбат 20 (Tween®20); полисорбат 60 (Tween®60); полисорбат 65 (Tween®65); полисорбат 80 (Tween®80); полисорбат 85 (Tween®85); полиоксипропиленмоностеарат; сурфактин; полуксамер; сложный эфир сорбитана и жирных кислот, такой как сорбитантриолеат; лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинозитол; сфингомиелин; фосфатидилэтанолламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидная кислота; цереброзиды; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерин; стеариламин; додециламин; гексадециламин; ацетилпальмитат; глицеринрицинолеат; гексадецилстеарат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль) 5000-фосфатидилэтанолламин; поли(этиленгликоль) 400-моностеарат; фосфолипиды; синтетические и/или естественные детергенты со свойствами высокоактивного поверхностно-активного вещества; дезоксихолаты; циклодекстрины; хаотропные соли; агенты для образования ионной пары и их комбинации. Компонент-амфифильная структурная единица может представлять собой смесь из различных амфифильных структурных единиц. Специалисты в данной области техники будут учитывать, что это иллюстративный, не исчерпывающий, список веществ с активностью поверхностно-активного вещества. Любую амфифильную структурную единицу можно применять в получении синтетических наночастиц, которые применяются в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут необязательно содержать один или несколько углеводов. Углеводы могут быть естественными или синтетическими. Углевод может представлять собой естественный углевод, образующий производные. В определенных вариантах осуществления углевод включает моносахарид или дисахарид, в том числе без ограничения глюкозу, фруктозу, галактозу, рибозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, маннуроновую кислоту, глюкозамин, галактозамин и нейраминовую кислоту. В определенных вариантах осуществления углевод представляет собой полисахарид, в том числе без ограничения пуллулан, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксицеллюлозу (HC), метилцеллюлозу (MC), декстран, циклодекстран, гликоген, крахмал, гидроксипропилакрахмал, каррагинан, гликон, амилозу, хитозан, N,O-карбоксиметилхитозан, альгин и альгиновую кислоту, крахмал, хитин, гепарин, инулин, конжак, глюкоманнан, пустилан, гепарин, гиалуроновую кислоту, курдлан и ксантан. В вариантах осуществления изобретательские синтетические наночастицы не содержат (или в частности исключают) углеводы, такие как полисахарид. В определенных вариантах осуществления углевод может включать производное углевода, такое как сахароспирт, в том числе без ограничения маннит, сорбит, ксилит, эритрит, мальтит и лактит.

Композиции по настоящему изобретению включают синтетические наночастицы согласно изобре-

тению в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как консерванты, буферы, солевой раствор или фосфатный буферный раствор. Композиции можно получать с использованием традиционных методик фармацевтического производства и соединения для достижения применимых лекарственных форм. В варианте осуществления синтетические наноносители согласно изобретению суспендируют в стерильном солевом растворе для инъекций вместе с консервантом.

В вариантах осуществления, когда получают синтетические наноносители как носители для средств (например, антигена или адъюванта) для применения в вакцинах, могут быть применимы способы соединения средств с синтетическими наноносителями. Если средство представляет собой малую молекулу, может быть преимуществом прикрепление средства к полимеру до сборки синтетических наноносителей. В вариантах осуществления также может быть преимуществом получение синтетических наноносителей с поверхностными группами, которые применяются для соединения средства с синтетическим наноносителем посредством использования этих поверхностных групп, а не прикрепление средства к полимеру, и затем использование этого полимерного конъюгата в конструировании синтетических наноносителей. Ряд реакций можно применять с целью прикрепления средств к синтетическим наноносителям.

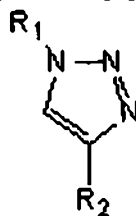
В определенных вариантах осуществления соединение может представлять собой ковалентный линкер. В вариантах осуществления пептиды по настоящему изобретению могут быть ковалентно соединены с внешней поверхностью через 1,2,3-триазольный линкер, образованный реакцией 1,3-диполярного циклоприсоединения азидогрупп на поверхности наноносителя с антигеном или адъювантом, содержащим алкиновую группу, или реакцией 1,3-диполярного циклоприсоединения алкинов на поверхности наноносителя с антигенами или адъювантами, содержащими азидогруппу. Такие реакции циклоприсоединения предпочтительно осуществляют в присутствии Cu(I)-катализатора вместе с подходящим Cu(I)-лигандом и восстанавливающим средством для восстановления Cu(II)-соединения до каталитически активного Cu(I)-соединения. Это Cu(I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC) можно также называть клик-реакцией.

Дополнительно, ковалентное соединение может включать ковалентный линкер, который включает амидный линкер, дисульфидный линкер, тиоэфирный линкер, гидразоновый линкер, гидразидный линкер, иминовый или оксимовый линкер, мочевиный или тиомочевиный линкер, амидиновый линкер, аминный линкер и сульфонамидный линкер.

Амидный линкер образуется через амидную связь между амином на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с группой карбоновой кислоты второго компонента, такого как наноноситель. Амидная связь в линкере может быть получена с использованием любой из традиционных реакций образования амидной связи с надлежаще защищенными аминокислотами или антигенами, или адъювантами и активированными карбоновыми кислотами, как например, N-гидроксисукцинимид-активированный сложный эфир.

Дисульфидный линкер образуется через образование дисульфидной (S-S) связи между двумя атомами серы в форме, например, $R_1-S-S-R_2$. Дисульфидная связь может быть образована посредством тиольного обмена антигена и/или адъюванта, содержащего тиольную/меркаптановую группу (-SH) с другой активированной тиольной группой на полимере или наноносителе, или наноносителя, содержащего тиольные/меркаптановые группы с антигеном или адъювантом, содержащим активированную тиольную группу.

Триазольный линкер, в частности 1,2,3-триазол в форме



где R_1 и R_2 могут представлять собой любые химические структурные единицы, образуется с помощью реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения азиды, прикрепленного к первому компоненту, такому как наноноситель, с концевым алкином, прикрепленным ко второму компоненту, такому как пептид. Реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения осуществляют с катализатором или без катализатора, предпочтительно с Cu(I)-катализатором, который связывает два компонента через 1,2,3-триазольную функциональную группу. Эта химическая реакция детально описывается Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002) и Meldal, et al., *Chem. Rev.*, 2008, 108(8), 2952-3015 и часто упоминается как "клик"-реакция или CuAAC.

В вариантах осуществления получают полимер, содержащий азидную или алкиновую группу, концевую относительно полимерной цепи. Этот полимер затем используют для получения синтетического наноносителя таким способом, что несколько алкиновых или азидных групп располагают на поверхности такого наноносителя. Альтернативно, синтетический наноноситель может быть получен другим путем, и

впоследствии функционализирован алкиновыми или азидными группами. Антиген или адъювант получают в присутствии алкиновой (если полимер содержит азид) или азидной (если полимер содержит алкин) группы. Антигену или адъюванту затем предоставляют возможность реагировать с наноносителем посредством реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с катализатором или без катализатора, который ковалентно соединяет антиген или адъювант с частицей через 1,4-дизамещенный 1,2,3-триазольный линкер.

Тиоэфирный линкер получают путем образования сера-углеродной (тиоэфирной) связи в форме, например, R_1-S-R_2 . Тиоэфир может быть получен или посредством алкилирования тиольной/меркаптановой (-SH) группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, при помощи алкилирующей группы, такой как галогенид или эпоксид, на втором компоненте, таком как наноноситель. Тиоэфирные линкеры также могут быть образованы посредством присоединения по Михаэлю тиольной/меркаптановой группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, к электрондефицитной алкеновой группе на втором компоненте, таком как полимер, содержащий маленимидную группу или винилсульфоновую группу в качестве акцептора Михаэля. По-другому, тиоэфирные линкеры могут быть получены посредством радикальной тиол-еновой реакции тиольной/меркаптановой группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с алкеновой группой на втором компоненте, таком как полимер или наноноситель.

Гидразоновый линкер получают путем реакции гидразидной группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с альдегидной/кетонной химической группой на втором компоненте, таком как наноноситель.

Гидразидный линкер образуется путем реакции гидразиновой группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с группой карбоновой кислоты на втором компоненте, таком как наноноситель. Такую реакцию, как правило, осуществляют с использованием химической реакции, подобной образованию амидной связи, где карбоновую кислоту активируют активирующим реагентом.

Иминовый или оксимовый линкер образуется путем реакции аминогруппы или N-алкоксиамино (или аминooksи) группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с альдегидной или кетонной группой на втором компоненте, таком как наноноситель.

Мочевинный или тиомочевинный линкер получают путем реакции аминогруппы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с изоцианатной или тиоизоцианатной группой на втором компоненте, таком как наноноситель.

Амидиновый линкер получают путем реакции аминной группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, со сложной имидоэфирной группой на втором компоненте, таком как наноноситель.

Аминный линкер получают путем реакции алкилирования аминной группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, при помощи алкилирующей группы, такой как галогенидная, эпоксидная или сульфонатсложноэфирная группа на втором компоненте, таком как наноноситель. Альтернативно, аминный линкер также может быть получен путем восстановительного аминирования аминной группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, при помощи альдегидной или кетонной группы на втором компоненте, таком как наноноситель, с подходящим восстанавливающим реагентом, таким как цианоборгидрид натрия или триацетоксиборгидрид натрия.

Сульфонамидный линкер получают путем реакции аминной группы на одном компоненте, таком как антиген или адъювант, с сульфонилгалогенидной (такой как сульфонилхлоридная) группой на втором компоненте, таком как наноноситель.

Сульфоновый линкер получают путем присоединения по Михаэлю нуклеофила к винилсульфону. Либо винилсульфон, либо нуклеофил могут быть на поверхности наночастицы или присоединены к антигену или адъюванту.

Антиген или адъювант также может быть конъюгирован с наноносителем посредством способов нековалентного конъюгирования. Например, отрицательно заряженный антиген или адъювант может быть конъюгирован с положительно заряженным наноносителем посредством электростатической адсорбции. Антиген или адъювант, содержащий лиганд к металлу, также может быть конъюгирован с наноносителем, содержащим металлокомплекс, посредством комплекса металл-лиганд.

В вариантах осуществления антиген или адъювант может быть прикреплен к полимеру, например, блок-полимеру молочной кислоты и полиэтиленгликоля, до сборки синтетического наноносителя, или синтетический наноноситель может быть образован с реакционноспособными или способными к активации группами на его поверхности. В последнем случае антиген или адъювант получают с группой, которая совместима с химическим соединением для присоединения, которое предоставляется поверхностью синтетических наноносителей. В других вариантах осуществления средство, такое как пептидный антиген, может быть прикреплено к VLP или липосомам с использованием подходящего 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 наноноситель, содержащий карбоксильную группу на поверхности, можно обрабатывать гомобифункциональным линкером, дигидразидом адипиновой кислоты (ADH) в присутствии EDC (1-этил-3-(3-

диметиламинопропил)карбодиимид) для образования соответствующего синтетического наноносителя с ADH-линкером. Получающийся в результате ADH-связанный синтетический наноноситель затем конъюгируют со средством, содержащим кислотную группу, посредством другого конца ADH-линкера на NC (наноносителе) для получения соответствующего конъюгата VLP или липосома-пептид.

Для подробных описаний доступных способов конъюгирования, см. Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition, Academic Press, Inc., 2008. В дополнение к ковалентному присоединению антиген или адъювант может быть соединен при помощи адсорбции с предварительно образованным синтетическим наноносителем или он может быть соединен при помощи инкапсулирования во время образования синтетического наноносителя.

Способы получения и применение способов согласно изобретению и связанные композиции

Синтетические наноносители могут быть получены с использованием большого разнообразия способов, известных в настоящем уровне техники. Например, синтетические наноносители могут быть образованы при помощи способов, таких как нанопреципитация, фокусирование потока с использованием жидкостных каналов, сушка распылением, выпаривание растворителя из односторонней и двусторонней эмульсии, экстракция растворителем, разделение фаз, размалывание, методики микроэмульсий, микрообработка, нанообработка, защитные слои, простая и сложная коацервация и другие способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Альтернативно или дополнительно, были описаны синтезы водных и органических растворителей для монодисперсного полупроводника, проводящие, магнитные, 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). В литературе были описаны дополнительные способы (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; и Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755, патенты США № 5578325 и 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 материалы могут быть инкапсулированы в синтетические наноносители, как желательные, с использованием ряда способов, в том числе без ограничения 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). Можно применять другие способы, подходящие для инкапсулирования материалов, таких как олигонуклеотиды, в синтетические наноносители, в том числе без ограничения способы, раскрытые в патенте Соединенных Штатов № 6632671, Unger, от 14 октября 2003 г.

В определенных вариантах осуществления синтетические наноносители получают с помощью процесса нанопреципитации или сушки распылением. Условия, применяемые при получении синтетических наноносителей можно менять для выхода частиц желаемого размера или свойства (например, гидрофобность, гидрофильность, внешняя морфология, "липкость", форма и т.д.). Способ получения синтетических наноносителей и применяемые условия (например, растворитель, температура, концентрация, скорость потока воздуха и т.д.) могут зависеть от материалов, которые необходимо соединить с синтетическими наноносителями и/или композицией из полимерной матрицы.

Если частицы, полученные с помощью любого из вышеупомянутых способов, имеют размер, варьирующий вне желаемого диапазона, частицы можно сортировать по размеру, например, с использованием сита.

Элементы синтетических наноносителей изобретения такие как нацеливающие фрагменты, полимерные матрицы, антигены, адъюванты и т.п., могут быть соединены с синтетическим наноносителем, например, посредством одной или нескольких ковалентных связей, или могут быть соединены с помощью одного или нескольких линкеров. Дополнительные способы функционализации синтетических наноносителей можно адаптировать из опубликованной патентной заявки США № 2006/0002852, Saltzman et al., опубликованной патентной заявки США № 2009/0028910, DeSimone et al. или опубликованной международной патентной заявки WO/2008/127532 A1, Murthy et al.

Альтернативно или дополнительно, синтетические наноносители могут быть соединены с элементом, таким как иммуноактивные поверхности, нацеливающие фрагменты, адъюванты, различные антигены и т.д., прямо или опосредованно путем нековалентных взаимодействий. В нековалентных вариантах осуществления нековалентное соединение опосредуется нековалентными взаимодействиями, включающими без ограничения взаимодействия зарядов, аффинные взаимодействия, металлокоординацию, физическую адсорбцию, взаимодействия гость-хозяин, гидрофобные взаимодействия, ТТ-стэкинг взаимодействия, взаимодействия с водородными связями, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, магнитные взаимодействия, электростатические взаимодействия, диполь-дипольные взаимодействия и/или их комбинации. Такие соединения могут быть расположены, чтобы они были на внешней поверхности или внутренней

поверхности изобретательского синтетического наноносителя. В вариантах осуществления инкапсулирование и/или адсорбция представляет собой форму соединения.

В вариантах осуществления синтетические наноносители согласно изобретению могут быть комбинированы с другими адъювантами путем примешивания в том же разбавителе или системе доставки. Такие адъюванты могут включать без ограничений минеральные соли, такие как квасцы, квасцы, комбинированные с монофосфорилипидом (MPL) А энтеробактерий, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* или *Shigella flexneri*, или в частности с MPL® (AS04), AS15, MPL А вышеупомянутых бактерий отдельно, сапонины, такие как QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, эмульсии, такие как MF59™, Montanide® ISA 51 и ISA 720, AS02 (QS21+сквален+ MPL®), липосомы и липосомальные составы, такие как AS01, синтезированные или специфически полученные микрочастицы и микроносители, такие как пузырьки наружной мембраны бактериального происхождения (OMV) *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и других, или частицы хитозана, депообразующие средства, такие как блок-сополимеры Pluronic®, специфически модифицированные или полученные пептиды, такие как мурамилдипептид, аминокислоты, такие как -4-фосфаты, такие как RC529, или белки, такие как бактериальные анатоксины или фрагменты токсинов. Дополнительные применимые адъюванты можно найти в WO 2002/032450; патенте США № 7357936 "Адъювантные системы и вакцины (Adjuvant Systems and Vaccines)"; патенте США № 7147862 "Вакцинная композиция, содержащая адъюванты (Vaccine composition containing adjuvants)"; патенте США № 6544518 "Вакцины (Vaccines)"; патенте США № 5750110 "Вакцинная композиция, содержащая адъюванты (Vaccine composition containing adjuvants)". Дозы таких других адъювантов можно определить с использованием традиционных исследований с целью определения оптимальной дозы. В вариантах осуществления адъювант, который не соединен с перечисленными синтетическими наноносителями, если таковой присутствует, может быть одинаковым или отличаться от адъюванта, который соединен с синтетическими наноносителями.

В вариантах осуществления любой адъювант, соединенный с синтетическими наноносителями согласно изобретению, может быть различным, подобным или идентичным таковому, не соединенному с наноносителем (с или без антигена, с использованием или без использования другого разбавителя для доставки). Адъюванты (соединенные или не соединенные) можно вводить отдельно в отличающийся момент времени и/или в отличающееся местоположение на теле, и/или при помощи отличающегося пути иммунизации, или при помощи другого синтетического наноносителя, несущего адъювант (с или без антигена), вводимого отдельно в отличающийся момент времени и/или в отличающееся местоположение на теле, и/или при помощи отличающегося пути иммунизации.

Популяции синтетических наноносителей могут быть комбинированы для образования фармацевтических лекарственных форм по настоящему изобретению с использованием традиционных фармацевтических способов смешивания. Таковые включают смешивание жидкость-жидкость, в котором две или более суспензии, причем каждая содержит один или несколько поднаборов наноносителей, непосредственно комбинируют или объединяют посредством одного или нескольких сосудов, содержащих разбавитель. Так как синтетические наноносители также можно получать или хранить в форме порошка, можно осуществлять сухое смешивание порошок-порошок, а также можно ресуспендировать два или более порошков в общей среде. В зависимости от свойств наноносителей и их потенциалов взаимодействия, преимущество может отдаваться одному или другому пути смешивания.

Типичные композиции согласно изобретению, которые могут быть использованы в способах согласно изобретению, содержащие синтетические наноносители, могут содержать неорганические или органические буферы (например, натриевые или калиевые соли -фосфат, карбонат, ацетат или цитрат) и средства регулирования pH (например, соляная кислота, гидроксид натрия или калия, соли -цитрат или ацетат, аминокислоты и их соли), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, альфа-токоферол), поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксиэтилен9-10-нонилфенол, дезоксихолат натрия), стабилизаторы раствора и/или крио/лиостабилизаторы (например, сахароза, лактоза, маннит, трегалоза), средства регулирования осмотического давления (например, соли или сахара), антибактериальные средства (например, бензойная кислота, фенол, гентамицин), противовспенивающие средства (например, полидиметилсилозон), консерванты (например, тимеросал, 2-феноксизанол, EDTA), полимерные стабилизаторы и средства, регулирующие вязкость (например, поливинилпирролидон, полоксамер 488, карбоксиметилцеллюлоза) и сорастворители (например, глицерин, полиэтиленгликоль, этанол).

Композиции, которые могут быть использованы в способах в соответствии с настоящим изобретением, содержат синтетические наноносители согласно изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями. Композиции могут быть изготовлены с использованием традиционных методик фармацевтического производства и соединения для достижения применимых лекарственных форм. Методики, подходящие для применения на практике настоящего изобретения, можно найти в Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Eds. Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; и Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed., Ed. M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. В варианте осуществления изобретательские синтетические на-

носители суспендируют в стерильном солевом растворе для инъекций вместе с консервантом.

Следует понимать, что композиции, которые могут быть использованы в способах настоящего изобретения, могут быть изготовлены любым подходящим способом, и настоящее изобретение никоим образом не ограничивается применением композиций, которые можно получить с использованием способов, описанных в данном документе. Выбор приемлемого способа может требовать внимания к свойствам конкретных фрагментов, которые ассоциируются.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители согласно изобретению производят при стерильных условиях или стерилизуют в конце. Это может гарантировать, что получающаяся в результате композиция является стерильной и неинфекционной, таким образом, повышая безопасность по сравнению с нестерильными композициями. Это обеспечивает ценную меру безопасности, в особенности, когда субъекты, получающие синтетические наноносители, имеют иммунные дефекты, являются страдающими от инфекции и/или восприимчивы к инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретательские синтетические наноносители можно лиофилизировать и хранить в суспензии или в виде лиофилизированного порошка, в зависимости от методики составления, в течение длительных периодов без потери активности.

Композиции, которые могут быть использованы в способах согласно изобретению, можно вводить посредством ряда путей введения, включающих без ограничения подкожный, внутримышечный, внутрикожный, пероральный, интраназальный, трансмукозальный, сублингвальный, ректальный, глазной, трансдермальный, черескожный или с помощью комбинации из этих путей.

Дозы лекарственных форм содержат варьирующие количества популяций синтетических наноносителей и/или варьирующие количества адъювантов, и/или антигенов в соответствии с настоящим изобретением. Количество синтетических наноносителей и/или адъювантов, и/или антигенов, присутствующих в лекарственных формах согласно изобретению, может варьировать в соответствии с природой адъювантов и/или антигенов, терапевтической полезностью, которой необходимо достигнуть, и другими такими параметрами. В некоторых вариантах осуществления дозы лекарственных форм являются субтерапевтическими или дозами со сниженной токсичностью. В других вариантах осуществления дозы представляют собой количества, эффективные для выработки одного или нескольких иммунных ответов, как обеспечено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунный(ые) ответ(ы) представляют собой иммунный ответ с антителами или выработку титра антител и/или системное высвобождение цитокинов. В вариантах осуществления можно проводить исследования с целью определения оптимальной дозы для установления оптимального терапевтического количества популяции синтетических наноносителей и/или количества адъювантов, и/или антигенов, которое должно присутствовать в лекарственной форме. В вариантах осуществления синтетические наноносители и/или адъюванты, и/или антигены присутствуют в лекарственной форме в количестве, эффективном для выработки иммунного ответа, как обеспечено в данном документе, при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. Является возможным определение количеств адъювантов и/или антигенов, эффективных для выработки иммунного ответа, как обеспечено в данном документе, с использованием традиционных исследований и методик с целью определения оптимальной дозы на субъектах. Лекарственные формы согласно изобретению могут вводиться при множестве частотностей. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одного введения лекарственной формы достаточно для выработки фармакологически значимого ответа. В более предпочтительном варианте осуществления для обеспечения фармакологически значимого ответа применяют по меньшей мере два введения, по меньшей мере три введения или по меньшей мере четыре введения лекарственной формы.

Композиции и способы, описанные здесь, можно применять для индуцирования, усиления, стимуляции, модулирования, направления или перенаправления иммунного ответа. Композиции и способы, описанные здесь, можно применять в диагностике, профилактике и/или лечении состояний, таких как злокачественные опухоли, инфекционные заболевания, метаболические заболевания, дегенеративные заболевания, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, иммунологические заболевания или другие расстройства и/или состояния. Композиции и способы, описанные здесь, также можно применять для профилактики или лечения зависимости, такой как зависимость от никотина или наркотического средства. Композиции и способы, описанные здесь, также можно применять для профилактики и/или лечения состояния, происходящего от воздействия токсина, опасного вещества, экзогенного токсина или другого вредного агента.

В вариантах осуществления обеспеченные композиции и способы можно применять для системного индуцирования цитокинов, таких как TNF- α , IL-6 и/или IL-12, или IFN- γ , IL-12 и/или IL-18. В других вариантах осуществления обеспеченные композиции и способы можно применять для индуцирования иммунного ответа с антителами или для выработки титра антител. Иммунные ответы, как представлено здесь, могут быть специфичными к антигену, например, любому из антигенов, представленных здесь, предпочтительно к одному или нескольким антигенам в изобретательской композиции, или которую вводят согласно представленному здесь способу согласно изобретению.

Композиции и способы, представленные здесь, можно применять на множестве субъектов. У субъектов, предусматриваемых в данном документе, может быть или они подвергаются риску рака. Злокаче-

ственные опухоли включают без ограничений рак молочной железы; рак желчных протоков; рак мочевого пузыря; рак головного мозга, в том числе глиобластомы и медуллобластомы; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой кишки; рак эндометрия; рак пищевода; рак желудка; гематологические новообразования, в том числе острый лимфобластный и миелоидный лейкоз, например, В-клеточный CLL; Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфому; гистиолимфоцитоз Бернарда; хронический миелоидный лейкоз, множественную миелому; СПИД-ассоциированные лейкозы и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых; внутриэпителиальные новообразования, в том числе болезнь Боуэна и болезнь Педжета; рак печени; рак легкого; лимфомы, в том числе болезнь Ходжкина и лимфобластные лимфомы; нейробластомы; рак полости рта, в том числе плоскоклеточный рак; рак яичника, в том числе возникающие из эпителиальных клеток, стромальных клеток, зародышевых клеток и мезенхимальных клеток; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; саркомы, в том числе лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, фибросаркому и остеосаркому; рак кожи, в том числе меланому, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, базалиому и плоскоклеточный рак; рак яичка, в том числе эмбрионально-клеточную опухоль, такую как семинома, несеминнома (тератомы, хориокарциномы), стромальные опухоли и герминогенные опухоли; рак щитовидной железы, в том числе аденокарциному и медулярную карциному щитовидной железы, а также рак почки, в том числе аденокарциному и опухоль Вильмса. У субъектов, представленных здесь, может быть инфекция или инфекционное заболевание, или они подвергаются риску инфекции или инфекционного заболевания. Инфекции или инфекционные заболевания включают без ограничений вирусные инфекционные заболевания, такие как СПИД, ветряная оспа (ветрянка), насморк, цитомегаловирусная инфекция, лихорадка Колорадо, лихорадка денге, геморрагическая лихорадка Эбола, везикулярный стоматит, гепатит, простой герпес, опоясывающий герпес, HPV, грипп (инфлюэнца), лихорадка Ласса, корь, церкопитековая геморрагическая марбург-вирусная лихорадка, инфекционный мононуклеоз, эпидемический паротит, норовирусная инфекция, полиомиелит, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, бешенство, краснуха, SARS, натуральная оспа (оспа животных), вирусный энцефалит, вирусный гастроэнтерит, вирусный менингит, вирусная пневмония, лихорадка Западного Нила и желтая лихорадка; бактериальные инфекционные заболевания, такие как сибирская язва, бактериальный менингит, ботулизм, бруцеллез, кампилобактериоз, болезнь кошачьих царапин, холера, дифтерия, сыпной тиф, гонорея, импетиго, легионеллез, лепра (болезнь Хансена), лептоспироз, листериоз, боррелиоз, мелиоидоз, ревматическая атака, MRSA-инфекция, нокардиоз, коклюш (судорожный кашель), чума, пневмококковая пневмония, орнитоз, Q-лихорадка, пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF), сальмонеллез, скарлатина, шигеллез, сифилис, столбняк, трахома, туберкулез, туляремия, брюшной тиф, сыпной тиф и инфекции мочевых путей; паразитарные инфекционные заболевания, такие как африканский трипаносомоз, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, криптоспоридиоз, цистицеркоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсидоз, филяриоз, инфекции, вызываемые свободноживущими амебами, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, кокцидиоз, индийский висцеральный лейшманиоз, лейшманиоз, малярия, метагонимиаз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, оксиуроз, чесотка, шистосомоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез, трихиноз, трихиуриаз, трихомоноз и трипаносомоз; грибковые инфекционные заболевания, такие как аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, кокцидиомикоз, криптококкоз, гистоплазмоз, эпидермофития стопы (дерматофитоз) и паховая эпидермофития; прионные инфекционные заболевания, такие как синдром Альперса, злокачественная наследственная инсомния, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, куру и вариант болезни Крейтцфельда-Якоба.

Субъекты, предусматриваемые в данном документе, включают таковых, у которых есть или они подвергаются риску атопического состояния, такого как без ограничения аллергия, аллергическая астма или атопический дерматит; астма; хроническое обструктивное заболевание легких (COPD, например эмфизема или хронический бронхит); и хронических инфекций вследствие хронических инфекционных агентов, таких как хронический лейшманиоз, кандидоз или шистосомоз и инфекции, вызванные плазмодиями, *Toxoplasma gondii*, микобактериями, ВИЧ, HBV, HCV EBV или CMV, или любым из вышеизложенного, или любым поднабором из вышеизложенного.

Примеры

Пример 1: синтетические наноносители с ковалентно соединенным адъювантом (гипотетический) Резиквимод (он же R848) синтезируют в соответствии с синтезом, обеспеченном в примере 99 патента США № 5389640, Gerster et al. Получают конъюгат PLA-R848. Получают конъюгат PLA-PEG-никотин. Получают PLA путем полимеризации с раскрытием кольца с использованием D,L-лактида (MB=приблизительно 15-18 кДа). Структура PLA подтверждена посредством ЯМР. Поливиниловый спирт (MB=11-31 кДа, 85% гидролизованый) приобретен от VWR scientific.

Эти ингредиенты используют для получения следующих растворов:

1. Конъюгат PLA-R848 из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
2. PLA-PEG-никотин из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
3. PLA из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
4. Поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в воде.

Раствор № 1 (от 0,25 до 0,75 мл), раствор № 2 (0,25 мл) и раствор № 3 (от 0,25 до 0,5 мл) комбини-

руют в небольшом сосуде с дистиллированной водой (0,5 мл), и смесь обрабатывают ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. К этой эмульсии добавляют раствор № 4 (2,0 мл), и обработка ультразвуком при амплитуде 35% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250 образует вторую эмульсию. Эту эмульсию добавляют в лабораторный стакан, содержащий раствор фосфатного буфера (30 мл), и эту смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч для образования наночастиц. Чтобы промыть наночастицы, часть дисперсии наночастиц (7,0 мл) переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5300g в течение одного часа, надосадочную жидкость удаляют, и осадок ресуспендируют в 7,0 мл фосфатного буферного раствора. Процедуру центрифугирования повторяют, и осадок ресуспендируют в 2,2 мл фосфатного буферного раствора для конечной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл.

Пример 2: синтетические наночастицы с нековалентно соединенным адъювантом (гипотетический)
Заряженные наночастицы получают следующим образом:

1. PLA-PEG-OMe из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
2. PLA из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
3. Цетилтриметиламмония бромид (CTAB) в воде при 5 мг/мл

Раствор № 1 (от 0,25 до 0,75 мл), раствор № 2 (0,25 мл) и дистиллированную воду (0,5 мл) комбинируют в небольшом сосуде, и смесь обрабатывают ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. К этой эмульсии добавляют раствор № 3 (2,0 мл), и обработка ультразвуком при амплитуде 35% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250 образует вторую эмульсию. Эту эмульсию добавляют в лабораторный стакан, содержащий раствор фосфатного буфера (30 мл), и эту смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч для образования наночастиц. Чтобы промыть наночастицы, часть дисперсии наночастиц (7,0 мл) переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5300g в течение одного часа, надосадочную жидкость удаляют, и осадок ресуспендируют в 7,0 мл фосфатного буферного раствора. Процедуру центрифугирования повторяют, и осадок ресуспендируют в 2,2 мл воды DI для конечной дисперсии наночастиц около 10 мг/мл. Для адсорбирования антигена, в данном случае CpG ДНК, на наночастицы, 1,0 мл заряженных наночастиц в воде DI при 10 мг/мл охлаждают на льду. К этой охлажденной суспензии добавляют 10мкг CpG ДНК ODN 1826, и эту смесь инкубируют при 4°C в течение 4 ч. Наночастицы затем выделяют и промывают как описано выше.

Пример 3: композиция с синтетическими наночастицами и несоединенным антигеном (гипотетический)

Поливиниловый спирт (MW=11-31 кДа, 87-89% частично гидролизированный) приобретен от JT Baker. Пептид овальбумина 323-339 получают от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. № продукта 4065609). Синтезируют и очищают PLGA-R848 (или PLA-R848) и PLA-PEG-антиген или PLA-PEG-линкер, или конъюгаты PLA-PEG-OMe.

Вышеприведенные материалы используют для получения следующих растворов:

1. Конъюгат PLA-R848 или PLGA-R848 из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
2. PLA-PEG-OMe из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
3. PLA или PLGA из расчета 100 мг/мл в хлористом метиле
4. Поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в 100mM фосфатном буфере, pH 8

Раствор № 1 (от 0,1 до 0,9 мл) и раствор №2 (от 0,01 до 0,50 мл) комбинируют, необязательно также включая раствор № 3 (от 0,1 до 0,89 мл), и затем дистиллированную воду (0,50 мл) добавляют в небольшую емкость, и смесь обрабатывают ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. К этой эмульсии добавляют раствор № 4 (2,0-3,0 мл), и обработка ультразвуком при амплитуде 30% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250 образует вторую эмульсию. Эту эмульсию добавляют в лабораторный стакан с мешалкой, содержащий 70 mM раствор фосфатного буфера (30 мл), pH 8, и эту смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч для образования наночастиц. Чтобы промыть наночастицы, часть дисперсии наночастиц (от 25 до 32мл) переносят в 50мл центрифужную пробирку и центрифугируют при 9500 об/мин (13800g) в течение одного часа при 4°C, надосадочную жидкость удаляют, и осадок ресуспендируют в от 25 до 32 мл фосфатного буферного раствора. Процедуру центрифугирования повторяют, и осадок ресуспендируют в фосфатном буферном растворе для достижения конечной условной концентрации наночастиц 10 мг/мл.

Наночастицы комбинируют с необходимым количеством стерильного солевого раствора для достижения конечной концентрации в стерильной среде, и затем вводят субъекту посредством подкожной или внутримышечной инъекции с использованием обычного шприца Луэра или Луер Лок.

Пример 4 : введение синтетических наночастиц и не вводимый совместно антиген (гипотетический)

Синтетические наночастицы из примера 3 составляют в стерильной солевой среде, и затем вводят субъекту посредством подкожной или внутримышечной инъекции с использованием обычного шприца Луэра или Луер Лок. Субъекта подвергают воздействию экзогенного антигена (например, пыльца, анти-

гены животных и т.д.), который не вводят совместно с синтетическими наноносителями. Отмечен любой измененный иммунный ответ к не вводимому совместно антигену, который является результатом введения синтетических наноносителей.

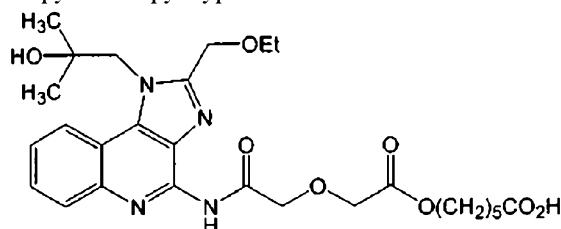
Пример 5: синтетические наноносители с ковалентно соединенным адьювантом

Вирусоподобные частицы (VLP) привлекли внимание в качестве наноносителей для применения в вакцинах и для доставки лекарственных средств. Эти вирусоподобные частицы также можно применять для доставки ковалентно присоединенных адьювантов. Вирусоподобные частицы можно получить посредством ряда способов, например, как описано в *Biotechnology and Bioengineering* 100(1), 28, (2008). Ковалентное присоединение можно осуществить следующим образом.

Суспензию вирусоподобных частиц в PBS (1,0 мл, 300 мкг/мл) охлаждают на льду. К этой суспензии добавляют конъюгат R-848 (50 мг, описанный ниже) в PBS (0,5 мл). EDC гидрохлорид (50 мг) добавляют, и смесь медленно перемешивают в течение ночи при температуре льда. Полученный в результате конъюгат VLP освобождают от избытка конъюгата R848 посредством диализа.

Конъюгат R848 получают следующим образом. R848 (5,0 мг, $1,59 \times 10^{-2}$ моль) и дигликолевый ангидрид (3,7 мг, $3,18 \times 10^{-2}$ моль) комбинируют в диметилацетамиде (10 мл). Этот раствор нагревают при 120°C в течение 2 ч. После легкого охлаждения добавляют 2-пропанол (25 мл), и полученный в результате раствор перемешивают на льду в течение 1 ч. Имид отделяется в виде белого твердого вещества, которое выделяют посредством фильтрации, промывают 2-пропанолом и сушат. Выход имида R848 равен 6,45 мг (98%).

Имид R848 (412 мг, $1,0 \times 10^{-3}$ моль) и 6-гидроксикапроновую кислоту (132 мг, $1,0 \times 10^{-3}$ моль) перемешивают в хлористом метиле (5 мл). К этой суспензии добавляют 1,5,7-триазабицикло [4,4,0] дек-5-ен (TBD, 278 мг, 2×10^{-3} моль), после чего суспензию перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Полученный в результате прозрачный раствор разбавляют хлористым метилом (25 мл), и этот раствор промывают 5% раствором лимонной кислоты (2×25 мл). После сушки над сульфатом магния раствор фильтруют и выпаривают под вакуумом для обеспечения конъюгата R848, используемого в синтезе VLP-антиген. Прогнозируемая структура конъюгата R848 является следующей:



Пример 6: соединение наноносителя с адьювантом R848 прекращает системную продукцию воспалительных цитокинов

Группы мышей были инъецированы подкожно в задние конечности 100 мкг наноносителей (NC) соединенных, несоединенных или примешанных с низкомолекулярным аналогом нуклеозида и известным агонистом TLR7/8 и адьювантом R848. Количество R848 в наноносителе составило 2-3%, приводя в результате к 2-3 мкг соединенного R848 на инъекцию; количество используемого свободного R848 составило 20 мкг на инъекцию. Сыворотку мышей отбирали посредством терминального забора крови и измеряли системную продукцию цитокинов в сыворотке в различные моменты времени посредством ELISA (BD Biosciences). Как показано на фиг. 1A-1C, сильная системная продукция главных провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-12 была обнаружена при применении примешанных R848 (NC+R848), в то время как не выявлена экспрессия TNF- α , IL-6 и IL-12 при применении двух отдельных препаратов NC, соединенных с R848 (NC-R848-1 и NC-R848-2). Различие в уровнях пиков экспрессии цитокинов составило > в 100 раз для TNF- α и IL-6, и > в 50 раз для IL-12. NC, не соединенные с R848, (обозначенные как только NC) не индуцировали какие-либо системные цитокины при применении без примешанных R848.

Пример 7: соединение наноносителя с адьювантом R848 не ингибирует системную продукцию иммунных цитокинов IFN- γ

В то время как ранние провоспалительные цитокины ассоциированы с побочными эффектами в ходе иммунизации, продукция других цитокинов, таких как иммунные IFN- γ , известна как важная для индукции эффективного иммунного ответа. Следовательно, эксперимент осуществили идентично таковому в примере 6. Системную продукцию иммунных цитокинов IFN- γ (измеренную в сыворотке мышей посредством ELISA, BD Biosciences), которая является определяющей для Th1 иммунного ответа, определили как достигающую одного и того же уровня, независимо от того, применяли NC-R848 (содержащий 2 мкг R848) или NC с примешанным R848 (20 мкг) (фиг. 2). Более того, продукция IFN- γ под влиянием NP-R848 была распределена на протяжении более широкого временного интервала.

Пример 8: продукция системных IL-12 под влиянием адьювантов R848 и CpG прекращается путем их соединения с наноносителями

Эффект соединения агониста TLR с наноносителем на системную индукцию цитокинов был показан не являющимся специфичным к определенному агонисту TLR. В этом эксперименте группы из двух мышей были инокулированы свободными агонистами TLR R848 или CpG 1826 (20 мкг каждого) и теми же самыми молекулами, соединенными с наноносителями, NC-R848 (100 мкг препарата NC, содержащего всего 3 мкг R848) или NC-CpG (100 мкг препарата NC, содержащего всего 5 мкг CpG 1826), и сывороточный IL-12 измеряли в указанные моменты времени в объединенной мышинной сыворотке (ELISA, BD Biosciences). Как показано на фиг. 3, уровни пиков системных IL-12 были в 30 раз выше под влиянием свободного R848, чем под влиянием NC-R848 и в 20 раз выше под влиянием свободного CpG 1826, чем под влиянием NC-CpG).

Пример 9: местная индукция иммунных цитокинов IFN- γ , IL-12 и IL-1 β резко усиливается посредством соединения адъюванта с наноносителями, в то время как адъювант сберегается

В то время как системная индукция провоспалительных цитокинов ассоциирована с неблагоприятными эффектами вакцинации, местная индукция иммунных цитокинов, таких как IFN- γ или IL-1 β , рассматривается как наиболее благоприятная для индукции специфичного и локализованного иммунного ответа. В эксперименте, показанном на фиг. 4, мыши были инъецированы подкожно в заднюю конечность свободным (20 мкг) или R848, соединенным с NC, и адъювантами CpG (содержание адъюванта 2,5-4 мкг), дренирующие (подколенные) лимфатические узлы (LN) удаляли в указанные моменты времени, инкубировали в течение ночи в стандартной среде для культуры клеток, и продукцию цитокинов в супернатантах клеток измеряли посредством ELISA как описано выше. Намного более сильную местную индукцию Th1 цитокинов IFN- γ (в 50-100 раз, фиг. 4A) и IL-12 (в 17 раз, фиг. 4B), и инфламмосом-зависимого цитокина IL-1 β (в 6 раз, фиг. 4C) обнаружили при применении NC-R848 по сравнению со свободным R848 (примечательно, количества R848, присутствующего в NC-R848 были в 5-10 раз меньше, чем свободного R848). Аналогично, NC-CpG был намного более сильным индуцирующим фактором локальных иммунных цитокинов, чем свободный CpG (известный как чрезвычайно активный в этом отношении). Местная продукция IFN- γ была в 7-15 раз выше при уровнях пиков (фиг. 4A), продукция IL-12 была в 4 раз выше (фиг. 4B), и продукция IL-1 β была в 2 раз выше (фиг. 4C). Количество CpG 1826, присутствующего в NC-CpG, было в 4-5 раз меньше, чем свободного CpG 1826.

Пример 10: местная стимуляция лимфатических узлов (LN) и индукция пролиферации иммунных клеток под влиянием адъюванта R848, соединенного с NC, но не под влиянием свободного R848

Опухание дренирующих лимфатических узлов (лимфаденопатия) является отличительным признаком местной иммунной активации. Оно происходит в результате инфильтрации LN инфильтрации различными клетками, определяющими для врожденного и адаптивного иммунного ответа. Мыши были подкожно инокулированы NC-R848, только NC или NC-R848 в задние конечности как описано выше. Подколенные LN удаляли в указанные моменты времени (фиг. 5), и подсчитывали количество всех клеток, а также отдельно популяцию иммунных клеток. Гемоцитометр использовали для подсчета всех клеток, и затем клеточные популяции дифференциально окрашивали по поверхностным клеточным маркерам и определяли процентную долю для каждой популяции с использованием FACS. DC: дендритные клетки, mDC: миелоидные DC, pDC: плазмацитоидные DC, Mph: макрофаги, Gr: гранулоциты, B: В-клетки, T: Т-клетки, NK: естественные клетки-киллеры. Следующие маркеры использовали для окрашивания: CD11c⁺ (DC); CD11c⁺B220⁻ (mDC); CD11c⁺B220⁺ (pDC); F4/80⁺/Gr1⁻ (Mph); F4/80⁺/Gr1⁺ (Gr); B220⁺CD11c⁻ (В-клетки); CD3⁺ (Т-клетки); CD3⁺/CD49b⁺ (NK-клетки). Значительное увеличение количества всех клеток в дренирующих LN наблюдали после инъекции NC-R848, причем наиболее выраженный эффект (фиг. 5) показан на DC, гранулоцитах, В-клетках и NK-клетках.

Пример 11: иммунный ответ с антителами выше для наноносителя с конъюгированным адъювантом по сравнению с примешанным адъювантом

Материалы для составов с наноносителями с Nic, R848, OP-II

Соль TFA амида пептида овальбумина была приобретена от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. № продукта 4064565). PLA с характеристической вязкостью 0,19 дл/г был приобретен от Boehringer Ingelheim (Ingelheim Germany. Код продукта R202H). Конъюгат PLA-R848 с молекулярным весом приблизительно 2500 Да и содержанием R848 приблизительно 13,6% по весу синтезировали способом с раскрытием кольца. Синтезировали PLA-PEG-никотин с PEG-блоком приблизительно 3500 Да с концевым никотином и DL-PLA-блоком приблизительно 15000 Да. Поливиниловый спирт (MW=11000-31000, 87-89% гидролизованный) был приобретен от J.T. Baker (номер продукта U232-08).

Способы получения наноносителей с Nic, R848, OP-II

Растворы были получены следующим образом:

Раствор 1: пептид овальбумина 323-339 из расчета 69 мг/мл был получен в дистиллированной воде при комнатной температуре.

Раствор 2: PLA-R848 из расчета 50 мг/мл, PLA из расчета 25 мг/мл, и PLA-PEG-никотин из расчета 25 мг/мл в дихлорметане был получен растворением полимеров при 100 мг/мл, комбинированием растворов PLA-R848 и PLA при соотношении 2:1 и затем добавлением 1 части раствора PLA-PEG-никотин к 3 частям раствора PLA-R848/PLA.

Раствор 3: поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в 100 мМ в деионизированной воде.

Раствор 4: 70 мМ фосфатный буфер, pH 8.

Первичная эмульсия (W1/O) вначале была образована с использованием раствора 1 и раствора 2. Раствор 1 (0,1 мл) и раствор 2 (1,0 мл) комбинировали в небольшой стеклянной пробирке под давлением и обрабатывали ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Вторичная эмульсия (W1/O/W2) затем была образована добавлением раствора 3 (2,0 мл) к первичной эмульсии и обработкой ультразвуком при амплитуде 35% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Вторичную эмульсию добавили в открытый 50 мл лабораторный стакан, содержащий 70 мМ раствор фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы обеспечить испарение дихлорметана и образование суспензии наночастиц. Часть суспендированных наночастиц промывали путем переноса суспензии наночастиц в центрифужную пробирку, центрифугирования при 5300 g в течение 60 мин, удаления надосадочной жидкости и ресуспендирования осадка в пробирке в фосфатном буферном растворе. Эту процедуру промывки повторили, и затем осадок в пробирке ресуспендировали в фосфатном буферном растворе для обеспечения суспензии наночастиц, имеющей условную концентрацию 10 мг/мл на основе полимера. Суспензию хранили замороженной при -20°C до дальнейшего применения.

Таблица 1 Характеристика наночастиц с Nic, R848, OP-II

ID наночастицы	Эффективный диаметр (нм)	Агонист TLR, % вес./вес.	Пептид для Т-хелперной клетки, % вес./вес.
Nic, R848, OP-II	234	R848, 0,7	Ova 323-339, 1,8

Материалы для составов с наночастицами с Nic, Ø, OP-II

Соль TFA амида пептида овальбумина была приобретена от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. № продукта 4064565). PLA с характеристической вязкостью 0,19 дл/г был приобретен от Boehringer Ingelheim (Ingelheim Germany. Код продукта R202H). Синтезировали PLA-PEG-Никотин с PEG-блоком приблизительно 3500 Да с концевым никотином и DL-PLA-блоком приблизительно 15000 Да. Поливиниловый спирт (MB=11000-31000, 87-89% гидролизированный) был приобретен от J.T. Baker (номер продукта U232-08).

Способы получения наночастиц с Nic, Ø, OP-II

Растворы были получены следующим образом:

Раствор 1: пептид овальбумина 323-339 из расчета 69 мг/мл был получен в 0,13н. соляной кислоте при комнатной температуре.

Раствор 2: PLA из расчета 75 мг/мл и PLA-PEG-никотин из расчета 25 мг/мл в дихлорметане был получен путем растворения PLA из расчета 100 мг/мл в дихлорметане и PLA-PEG-никотин при 100 мг/мл в дихлорметане, затем комбинированием 3 частей раствора PLA с 1 частью раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 3: поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в 100 мМ в деионизированной воде.

Раствор 4: 70 мМ фосфатный буфер, pH 8.

Первичная эмульсия (W1/O) вначале была образована с использованием раствора 1 и раствора 2. Раствор 1 (0,1 мл) и раствор 2 (1,0 мл) комбинировали в небольшой стеклянной пробирке под давлением и обрабатывали ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Вторичная эмульсия (W1/O/W2) затем была образована добавлением раствора 3 (2,0 мл) к первичной эмульсии и обработкой ультразвуком при амплитуде 35% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Вторичную эмульсию добавили в открытый 50 мл лабораторный стакан, содержащий 70 мМ раствор фосфатного буфера (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, чтобы обеспечить испарение дихлорметана и образование суспензии наночастиц. Часть суспендированных наночастиц промывали путем переноса суспензии наночастиц в центрифужную пробирку, центрифугирования при 5300 g в течение 60 минут, удаления надосадочной жидкости и ресуспендирования осадка в пробирке в фосфатном буферном растворе. Эту процедуру промывки повторили, и затем осадок в пробирке ресуспендировали в фосфатном буферном растворе для обеспечения суспензии наночастиц, имеющей условную концентрацию 10 мг/мл на основе полимера. Суспензию хранили замороженной при -20°C до дальнейшего применения.

Таблица 2. Характеристика наноносителей

ID наноносителя	Эффективный диаметр (нм)	Агонист TLR, % вес./вес.	Пептид для Т-хелперной клетки, % вес./вес.
Nic, Ø, OP-II (Ø=нет адъюванта)	248	нет	Ova, 2,2

Результаты

Титры антител к никотину у мышей, иммунизированных NC, содержащими поверхностный никотин и Т-хелперный пептид OP-II с или без R848 (5 животных/группа; подкожно, 100 мкг NC на инъекцию, 3 раза с 4-недельными интервалами). Показаны титры для дней 26 и 40 после 1-й иммунизации (ELISA против полилизин-никотин). Группа 1: иммунизированные NP[Nic, R848, OP-II] (3,1% R848, конъюгированного с NC); группа 2: иммунизированные NP[Nic, Ø, OP-II] (нет R848, связанного с NC) с примешанными 20 мкг свободного R848.

Эти результаты демонстрируют, что конъюгирование R848 с NC привело в результате к более сильному эффекту адъюванта, чем использование свободного R848, примешанного к NC, не содержащему R848. При применении для иммунизации животных одинаковых количеств двух NC, причем один содержит поверхностный никотин, Т-хелперный пептид OP-II и R848 (NC[Nic, R848, OP-II]), и другой содержит те же самые ингредиенты, но без R848 (NC[Nic, Ø, OP-II]), более сильный иммунный ответ с антителами обнаружили для R848, который был конъюгирован с NC, даже если практически большее количество свободного R848 (> в 6 раз), по сравнению с количеством R848, конъюгированного с NC, было примешано к NP[Nic, Ø, OP-II] до иммунизации (фиг. 6).

Пример 12: наноносители с захваченным адъювантом приводят в результате к более низкой системной индукции провоспалительных цитокинов

Материалы для составов с наноносителями

Уксуснокислая соль пептида овальбумина 323-339 была приобретена от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Код продукта 4065609). Олигонуклеотид ДНК PS-1826 с полностью модифицированным фосфотиоатом скелетом, имеющий последовательность нуклеотидов 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3', с противоионом натрия, был приобретен от Oligos Etc (9775 SW Commerce Circle C-6, Wilsonville, OR 97070.) PLA с характеристической вязкостью 0.19 дл/г был приобретен от Boehringer Ingelheim (Ingelheim Germany. Код продукта R202H). Синтезировали PLA-PEG-никотин с PEG-блоком приблизительно 5000 Да с концевым никотином и DL-PLA-блоком приблизительно 17000 Да. Поливиниловый спирт (MB=11000-31000, 87-89% гидролизированный) был приобретен от J.T. Baker (номер продукта U232-08).

Способы получения наноносителей

Растворы были получены следующим образом:

Раствор 1: пептид овальбумина 323-339 из расчета 70 мг/мл в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептида овальбумина в 0,13 Н. растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2: 0.19-IV PLA из расчета 75 мг/мл и PLA-PEG-никотин из расчета 25 мг/мл в дихлорметане. Раствор был получен путем отдельного растворения PLA из расчета 100 мг/мл в дихлорметане и PLA-PEG-никотин из расчета 100 мг/мл в дихлорметане, затем смешивания растворов путем добавления 3 частей раствора PLA для каждой части раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 3: олигонуклеотид (PS-1826) из расчета 200 мг/мл в очищенной воде. Раствор был получен путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 4: такой же, как раствор 2.

Раствор 5: поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в 100 mM фосфатном буфере, pH 8.

Две отдельные первичные эмульсии вода в масле были получены. W1/O2 была получена комбинированием раствора 1 (0,1 мл) и раствора 2 (1,0 мл) в небольшой пробирке под давлением и обработкой ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. W3/O4 была получена комбинированием раствора 3 (0,1 мл) и раствора 4 (1,0 мл) в небольшой пробирке под давлением и обработкой ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Третья эмульсия с двумя внутренними эмульсионными фазами, эмульсия ([W1/O2, W3/O4]/W5) была получена комбинированием 0,5 мл каждой первичной эмульсии (W1/O2 и W3/O4) и раствора 5 (3,0 мл) и обработкой ультразвуком при амплитуде 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250.

Третью эмульсию добавили в открытый 50 мл лабораторный стакан, содержащий 70 mM раствор фосфатного буфера (30 мл), pH 8, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч для испарения дихлорметана и образования водной суспензии наноносителей. Часть наноносителей промывали путем переноса суспензии в центрифужную пробирку и центрифугирования при 13800 g в течение одного

ч, удаления надосадочной жидкости и ресуспендирования осадка в пробирке в фосфатном буферном растворе. Процедуру промывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе для конечной дисперсии наноносителей около 10 мг/мл.

Количества олигонуклеотида и пептида в наноносителе были определены посредством анализа ВЭЖХ. Общая масса сухого наноносителя на мл суспензии была определена посредством гравиметрического способа и была доведена до 5 мг/мл. Частицы хранили в виде замороженных суспензий до применения.

Таблица 3. Характеристика наноносителей

Наноноситель	Эффективный диаметр (нм)	Агонист TLR, % вес./вес.	Пептид для Т-хелперной клетки, % вес./вес.
	232	PS-1826, 6,4	Ova, 2,2

Результаты

TNF- α и IL-6 были индуцированы в сыворотке животных, инокулированных NC-CpG и свободным CpG. Группы животных были инокулированы (подкожно) либо 100 мкг NC-CpG (содержащего 5% CpG-1826), либо 5 мкг свободного CpG-1826. В различные моменты времени после инокуляции собирали сыворотку от животных (3/группа) посредством терминального забора крови, объединяли и анализировали на присутствие цитокинов в ELISA (BD).

Результаты демонстрируют, что захват адьюванта в пределах NC приводит в результате к более низкой немедленной системной индукции провоспалительных цитокинов, чем использование свободного адьюванта. При применении для инокуляции одинаковых количеств адьюванта CpG, захваченного в NC или свободного, практически более сильную индукцию TNF- α и IL-6 в сыворотке животных обнаружили для свободного CpG, по сравнению с CpG, захваченным в NC (фиг. 7).

Пример 13: наноносители с захваченным адьювантом приводят в результате к сходной или более сильной долговременной системной индукции иммунных цитокинов

Материалы для составов с наноносителями

Уксуснокислая соль пептида овальбумина 323-339 была приобретена от Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Код продукта 4065609). Олигонуклеотид ДНК PS-1826 с полностью модифицированным фосфотиоатом скелетом, имеющий последовательность нуклеотидов 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3', с противоионом натрия, был приобретен от Oligos Etc (9775 SW Commerce Circle C-6, Wilsonville, OR 97070). PLA с характеристической вязкостью 0,21 дл/г был приобретен от SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211. Код продукта 100 DL 2A). Синтезировали PLA-PEG-никотин с PEG-блоком приблизительно 5000 Да с концевым никотином и DL-PLA-блоком приблизительно 17000 Да. Поливиниловый спирт (MB = 11000-31000, 87-89% гидролизированный) был приобретен от J.T. Baker (номер продукта U232-08).

Способы получения наноносителей

Растворы были получены следующим образом:

Раствор 1: пептид овальбумина 323-339 из расчета 35 мг/мл в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор был получен путем растворения пептида овальбумина в 0,13N. растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2: 0.21-IV PLA из расчета 75 мг/мл и PLA-PEG-никотин из расчета 25 мг/мл в дихлорметане. Раствор был получен путем отдельного растворения PLA из расчета 100 мг/мл в дихлорметане и PLA-PEG-никотин из расчета 100 мг/мл в дихлорметане, затем смешивания растворов путем добавления 3 частей раствора PLA для каждой части раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 3: олигонуклеотид (PS-1826) из расчета 200 мг/мл в очищенной воде. Раствор был получен путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 4: такой же, как раствор № 2.

Раствор 5: поливиниловый спирт из расчета 50 мг/мл в 100 mM фосфатном буфере, pH 8.

Две отдельные первичные эмульсии вода в масле были получены. W1/O2 была получена комбинированием раствора 1 (0,2 мл) и раствора 2 (1,0 мл) в небольшой пробирке под давлением и обработкой ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. W3/O4 была получена комбинированием раствора 3 (0,1 мл) и раствора 4 (1,0 мл) в небольшой пробирке под давлением и обработкой ультразвуком при амплитуде 50% в течение 40 с с использованием Branson Digital Sonifier 250. Третья эмульсия с двумя внутренними эмульсиями, эмульсия ([W1/O2, W3/O4]/W5) была получена комбинированием 0,55 мл каждой первичной эмульсии (W1/O2 и W3/O4) и раствора 5 (3,0 мл) и обработкой ультразвуком при амплитуде 30% в течение 60 с с использованием Branson Digital Sonifier 250.

Третью эмульсию добавили в открытый 50 мл лабораторный стакан, содержащий 70mM раствор фосфатного буфера (30 мл), pH 8, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч для испарения дихлорметана и образования водной суспензии наноносителей. Часть наноносителей промывали пу-

тем переноса суспензии в центрифужную пробирку и центрифугирования при 13800g в течение одного ч, удаления надосадочной жидкости и ресуспендирования осадка в пробирке в фосфатном буферном растворе. Процедуру промывки повторили, и осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе для конечной дисперсии наноносителей около 10 мг/мл.

Количества олигонуклеотида и пептида в наноносителе были определены посредством анализа ВЭЖХ. Общая масса сухого наноносителя на мл суспензии была определена посредством гравиметрического способа и была доведена до 5 мг/мл. Частицы хранили в виде замороженных суспензий до применения.

Таблица 4. Характеристика наноносителей

Наноноситель	Эффективный диаметр (нм)	Агонист TLR, % вес./вес.	Пептид для Т-хелперной клетки, % вес./вес.
	217	PS-1826, 6,2	Ova, не определен

Результаты

IFN- γ и IL-12 были индуцированы в сыворотке животных, инокулированных NC-CpG и свободным CpG. Группы животных были инокулированы (подкожно) 100 мкг NC-CpG (содержащего 6% CpG-1826) или 6 мкг свободного CpG-1826. Через 24 ч после инокуляции собирали сыворотку от животных (3/группа) посредством терминального забора крови, объединяли и анализировали на присутствие цитокинов в ELISA (BD).

Эти результаты демонстрируют, что захват адьюванта в пределах наноносителей приводит в результате к сходной или даже более сильной долговременной системной индукции иммунных цитокинов, по сравнению с использованием свободного адьюванта. При применении для инокуляции животных одинаковых количеств адьюванта CpG, захваченного в NC или свободного, обнаружили сходный уровень долговременной индукции системного IFN- γ и более сильную индукцию IL-12 в сыворотке животных (фиг. 8).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Селекта Биосайенс, Инк.

<120> СПОСОБЫ ГЕНЕРАЦИИ АНТИТЕЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И УВЕЛИЧЕНИЯ МЕСТНОЙ ИНДУКЦИИ ИММУННЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОНОСИТЕЛЕЙ, СОЕДИНЕННЫХ С АДЬЮВАНТАМИ

<130> S1681.70015WO00

<150> US 61/348,713

<151> 2010-05-26

<150> US 61/348,717

<151> 2010-05-26

<150> US 61/348,728

<151> 2010-05-26

<150> US 61/358,635

<151> 2010-06-25

<160> 1

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> G. gallus

<400> 1

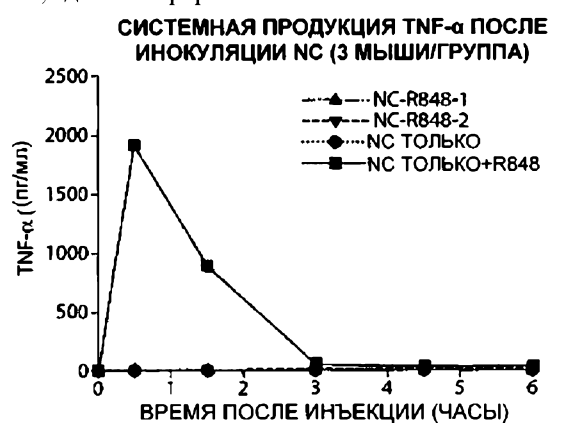
Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

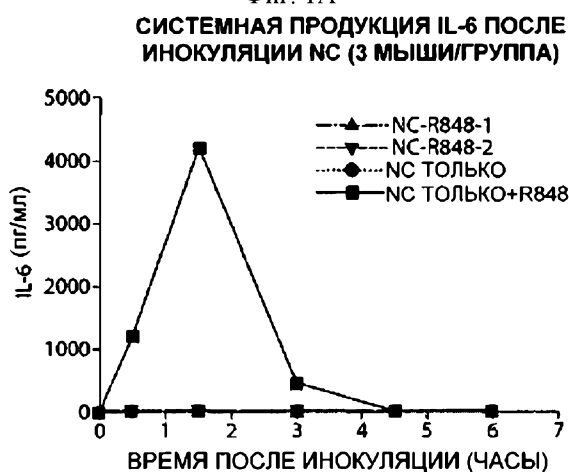
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ генерации антительного иммунного ответа, включающий
выбор дозы адьюванта, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наночастицами, где доза адьюванта меньше, чем отдельная доза указанного адьюванта, не соединенного с синтетическими наночастицами, и приводит при ее введении субъекту вместе с дозой антигена к генерации антительного иммунного ответа, сходному с таковым, который генерируется посредством введения субъекту дозы указанного адьюванта, который не соединен с синтетическими наночастицами, и дозы антигена, и
введение субъекту выбранной дозы адьюванта и дозы антигена.
2. Способ увеличения местной индукции иммунных цитокинов, включающий
выбор дозы адьюванта, где по меньшей мере часть дозы адьюванта соединена с синтетическими наночастицами, где доза адьюванта больше, чем отдельная доза указанного адьюванта, не соединенного с синтетическими наночастицами, и приводит при ее введении субъекту к системному высвобождению провоспалительных цитокинов, сходному с таковым, который генерируется посредством введения субъекту дозы указанного адьюванта, который не соединен с синтетическими наночастицами, и введение субъекту выбранной дозы адьюванта.
3. Способ по п.1, где адьювант включает агонист для Toll-подобных рецепторов 3, 4, 5, 7, 8 или 9 или их комбинацию.
4. Способ по п.2, где адьювант включает агонист для Toll-подобных рецепторов 3, агонист для Toll-подобных рецепторов 7 и 8 или агонист для Toll-подобного рецептора 9.
5. Способ по п.4, где адьювант включает R848, иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК.
6. Способ по любому из пп.1-5, где доза адьюванта включает два или более типов адьювантов.
7. Способ по любому из пп.1-6, где часть дозы адьюванта не соединена с синтетическими наночастицами.
8. Способ по любому из пп.1-7, где субъекту вводят более одного типа антигена.
9. Способ по любому из пп.1-8, где по меньшей мере часть дозы антигена соединена с синтетическими наночастицами.
10. Способ по любому из пп.1-8, где по меньшей мере часть дозы антигена не соединена с синтетическими наночастицами.
11. Способ по любому из пп.1-8, где по меньшей мере часть дозы антигена вводят совместно с синтетическими наночастицами.
12. Способ по любому из пп.1-8, где по меньшей мере часть дозы антигена не вводят совместно с синтетическими наночастицами.
13. Способ по любому из пп.1-12, где доза антигена включает антиген для В-клеток и/или антиген для Т-клеток.
14. Способ по п.13, где антиген для Т-клеток включает антиген для Т-хелперных клеток.
15. Способ по любому из пп.1-14, где доза антигена включает: (i) антиген для В-клеток и антиген для Т-хелперных клеток; (ii) по меньшей мере два антигена для Т-клеток, где по меньшей мере один из антигенов для Т-клеток представляет собой антиген для Т-хелперных клеток; или (iii) антиген для В-клеток и по меньшей мере два антигена для Т-клеток, где по меньшей мере один из антигенов для Т-клеток представляет собой антиген для Т-хелперных клеток.
16. Способ по любому из пп.1-15, где введение осуществляют путем, который включает подкожное, внутримышечное, внутрикожное, пероральное, интраназальное, трансмукозальное, ректальное, глазное, трансдермальное или черескожное введение или их комбинацию.
17. Способ по любому из пп.1-16, где синтетические наночастицы включают липидные наночастицы, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, пептидные или белковые частицы, наночастицы, которые включают комбинацию наноматериалов, сферические наночастицы, кубоидальные наночастицы, пирамидальные наночастицы, продолговатые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы.
18. Способ по п.17, где синтетические наночастицы содержат один или несколько полимеров.
19. Способ по п.18, где один или несколько полимеров включают сложный полиэфир.
20. Способ по п.19, где сложный полиэфир представляет собой сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером.
21. Способ по п.19 или 20, где сложный полиэфир представляет собой поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер(молочной и гликолевой кислоты) или поликапролактон.
22. Способ по п.20 или 21, где гидрофильный полимер включает полиэфир.
23. Способ по п.22, где полиэфир включает полиэтиленгликоль.
24. Способ по любому из пп.1-23, где доза адьюванта, по меньшей мере часть которого соединена с синтетическими наночастицами, входит в состав по меньшей мере одной лекарственной формы.

25. Способ по п.24, где указанная лекарственная форма входит в состав вакцины.
26. Способ по п.24 или 25, где доза адъюванта, по меньшей мере часть которого соединена с синтетическими наночастицами, входит в состав двух или более лекарственных форм и две или более лекарственных формы вводят совместно.
27. Способ по любому из пп.1-26, где у субъекта рак, инфекционное заболевание, аутоиммунное заболевание обмена веществ, дегенеративное заболевание, зависимость, атопическое состояние, астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) или хроническая инфекция.
28. Способ по любому из пп.1-27, где доза антигена включает никотин.
29. Способ по любому из пп.1-28, где доза адъюванта включает R848 и доза антигена включает никотин и антиген для Т-хелперных клеток, где никотин и антиген для Т-хелперных клеток также соединены с синтетическими наночастицами, и где синтетические наночастицы включают один или несколько полимеров.
30. Способ по п.29, где один или несколько полимеров включают сложный полиэфир, соединенный с гидрофильным полимером.
31. Способ по п.30, где гидрофильный полимер включает полиэфир.
32. Способ по п.30 или 31, где сложный полиэфир представляет собой поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер(молочной и гликолевой кислоты) или поликапролактон.
33. Способ по п.31 или 32, где полиэфир включает полиэтиленгликоль.

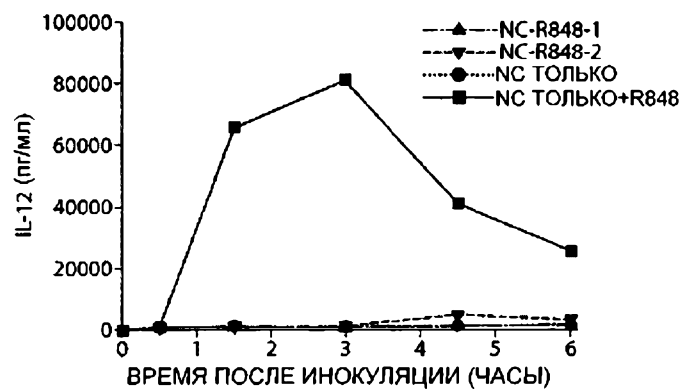


Фиг. 1А



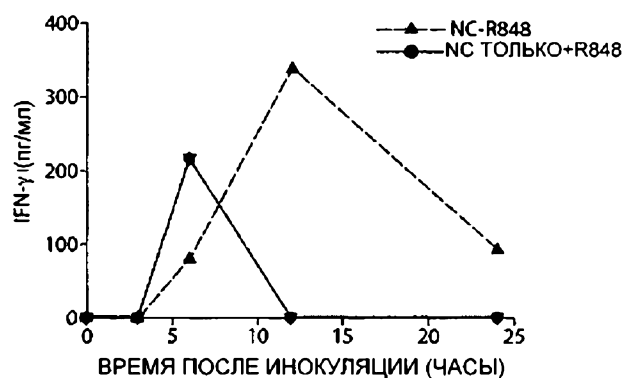
Фиг. 1В

СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ IL-12 ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ НС (3 МЫШИ/ГРУППА)



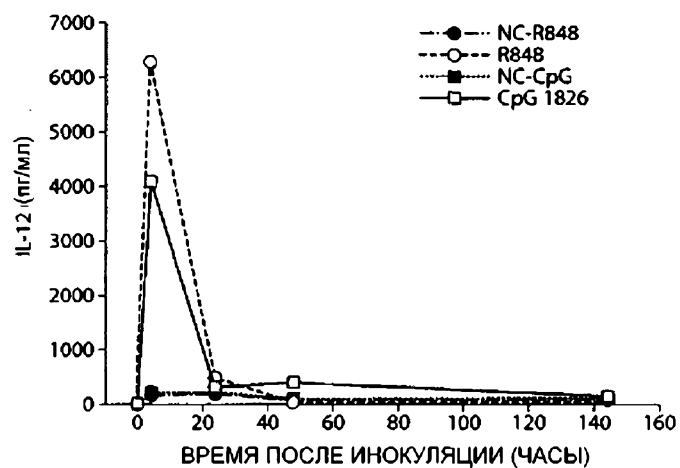
Фиг. 1С

СИСТЕМНЫЙ IFN-γ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ НС



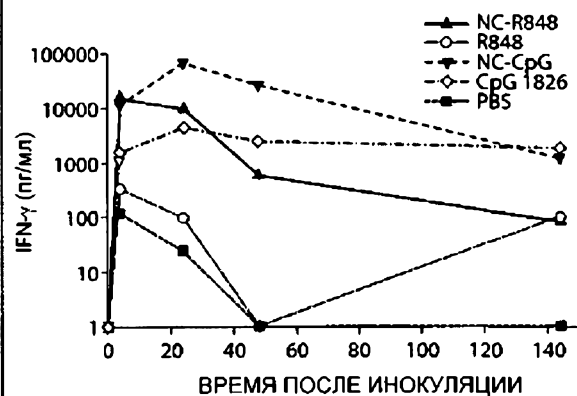
Фиг. 2

СИСТЕМНАЯ ИНДУКЦИЯ IL-12 СВОБОДНЫМИ И СОЕДИНЕННЫМИ С НС АГОНИСТАМИ TLR

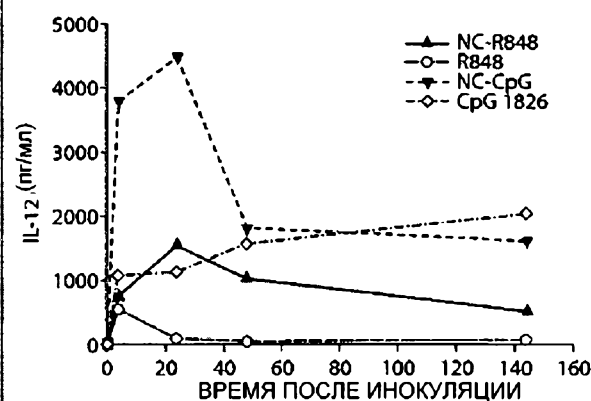


Фиг. 3

**МЕСТНАЯ ИНДУКЦИЯ IFN- γ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ
СВОБОДНЫМИ И СОЕДИНЕННЫМИ С НС АГОНИСТАМИ TLR**

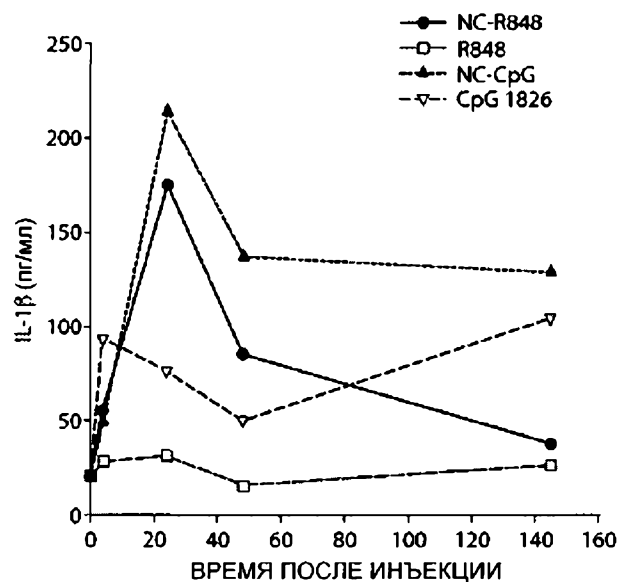


**МЕСТНАЯ ИНДУКЦИЯ IL-12 ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ
СВОБОДНЫМИ И СОЕДИНЕННЫМИ С НС АГОНИСТАМИ TLR**



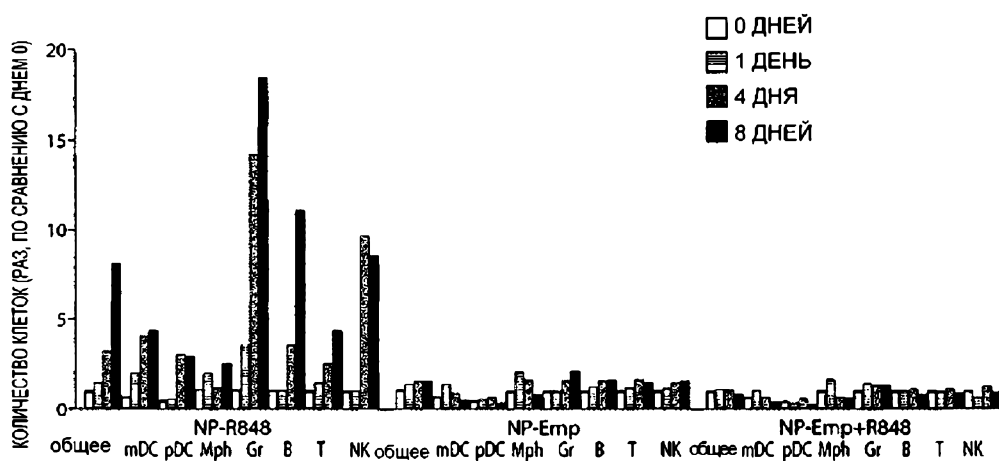
Фиг. 4

**ИНДУКЦИЯ IL-1 β СВОБОДНЫМИ И
СОЕДИНЕННЫМИ С НС АГОНИСТАМИ TLR**

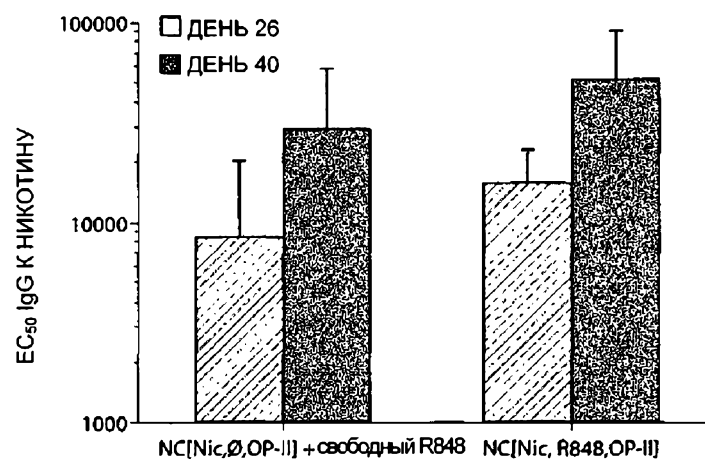


Фиг. 4 (продолжение)

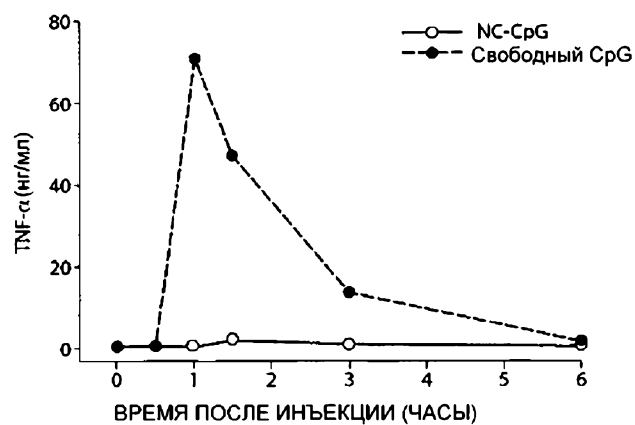
**ДИНАМИКА КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ В ДРЕНИРУЮЩИХ LN ПОСЛЕ
ПОДКОЖНОЙ ИНЪЕКЦИИ СВОБОДНЫМ ИЛИ СОЕДИНЕННЫМ С NC R848**



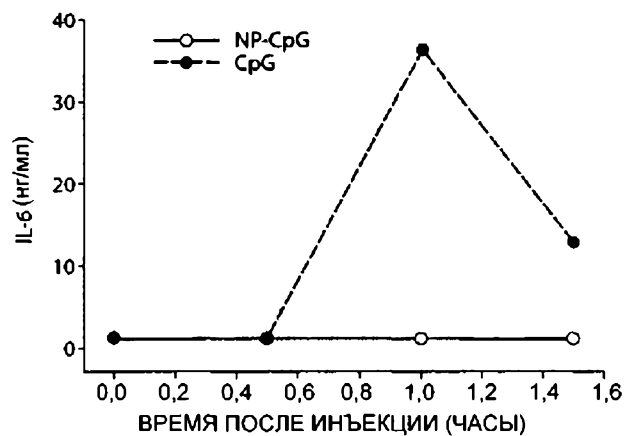
Фиг. 5



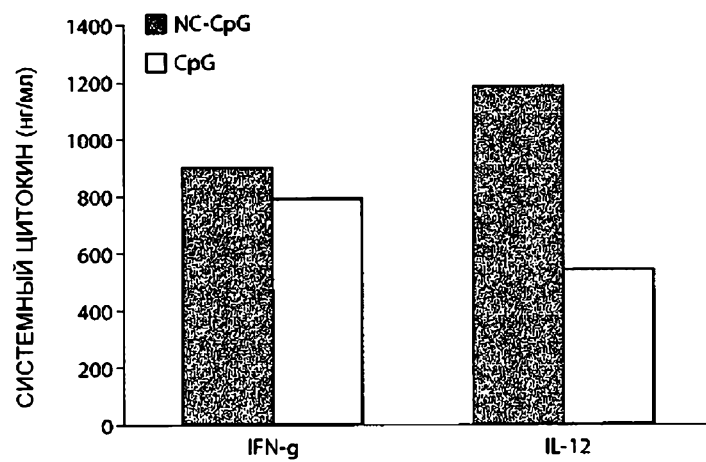
Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8

