

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **022699**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2016.02.29**

(21) Номер заявки  
**201171479**

(22) Дата подачи заявки  
**2010.05.26**

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

---

(54) **НАЦЕЛЕННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ НАНОНОСИТЕЛИ С рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ  
ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СРЕДСТВ**

---

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

(32) **2009.05.27**

(33) **US**

(43) **2012.06.29**

(86) **PCT/US2010/001560**

(87) **WO 2010/138193 2010.12.02**

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

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

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

(56) **WO-A2-2009051837  
US-A1-2008160089  
WO-A2-2004098509**

**DIWAN M. ET AL.: " Enhancement  
of immune responses by co-delivery of  
a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus  
toxoidin biodegradable nanospheres", JOURNAL  
OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER,  
AMSTERDAM, NL, vol . 85, no. 1-3, 13  
December 2002 (2002-12-13), pages 247-262,  
XP004397783, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.  
1016/50168-3659(02)00275-4, abstract**

**WO-A2-2008115319  
WO-A1-2010042870  
WO-A1-2009076158  
WO-A2-2010003009  
WO-A2-2010025324  
WO-A2-2010123569  
WO-A2-2010138192  
WO-A2-2010138194**

(57) Изобретение относится к композициям и соответствующим им способам на основе синтетических наноносителей, которые целенаправленно воздействуют на сайты действия клеток, таких как антиген-презентирующие клетки (АРС), и включает иммуномодулирующие средства, которые диссоциируют от синтетических наноносителей рН-зависимым способом. Также раскрыты композиции и способы, относящиеся к синтетическим наноносителям, которые инкапсулируют лабильные иммуномодулирующие средства, которые отделяются от синтетических наноносителей рН-зависимым способом.

**B1****022699****022699****B1**

## Родственные заявки

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

## Область изобретения

Данное изобретение касается композиций и относящихся к ним способов из синтетических наноносителей, которые целенаправленно воздействуют на сайты действия клеток, таких как антиген-презентирующие клетки (APC), и включает иммуномодулирующие средства, которые диссоциируют от синтетических наноносителей рН-зависимым способом. Данное изобретение дополнительно относится к защите лабильных иммуномодулирующих средств посредством их инкапсуляции в синтетических наноносителях.

## Предпосылки

Иммуномодулирующие средства применяют для получения иммунных ответов у субъектов. Стимуляция иммунной системы, которая включает стимуляцию любого из врожденного иммунитета и приобретенного иммунитета, или и первого, и второго, является сложным явлением, которое может привести либо к защитным, либо к неблагоприятным физиологическим последствиям для хозяина. В последние годы возрос интерес к механизмам, лежащим в основе врожденного иммунитета, который, как полагают, инициирует и поддерживает приобретенный иммунитет. Данный интерес отчасти вызван недавним открытием семейства высококонсервативных белков образраспознающих рецепторов, известных как Toll-подобные рецепторы (TLR), которые, как полагают, вовлечены во врожденный иммунитет в качестве рецепторов для патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP).

Таким образом, композиции и способы, пригодные для модулирования врожденного иммунитета, представляют огромный интерес, поскольку они могут касаться терапевтических подходов для состояний, включающих воспаление, аллергию, астму, инфекцию, рак, иммунодефицит и т.д.

Время от времени предпочтительно связывать такие средства с носителями для доставки. Однако информация относительно того, как возможно контролировать высвобождение таких средств, в особенности лабильных иммуномодулирующих средств, из носителей для доставки и какой тип высвобождения предусматривает оптимальные эффекты *in vivo*, ограничена.

Существует необходимость в новых носителях для доставки иммуномодулирующих средств, которые делают возможным оптимальное высвобождение, а также к относящимся к ним способам.

### Краткое описание данного изобретения

Аспекты данного изобретения относятся к композициям, включающим синтетические наночастицы, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наночастицей, при этом иммуномодулирующее средство диссоциирует от синтетического наночастицы согласно следующему соотношению:  $IA \text{ (высв.) } (4,5)_{24\%}/IA \text{ (высв.) } (7,4)_{24\%} \geq 1/2$ , где  $IA \text{ (высв.) } (4,5)_{24\%}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наночастице при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наночастиц, и где  $IA \text{ (высв.) } (7,4)_{24\%}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, деленный на сумму вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наночастице при воздействии на синтетический наночастицу водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наночастиц.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство инкапсулировано в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство включает лабильное иммуномодулирующее средство, такое как имидазохинолин, производное аденина или олигонуклеотид, которые включают 5'-CG-3', где С неметилирован и где олигонуклеотид включает остов, включающий одну или несколько нестабилизированных межуikleотидных связей. В определенных вариантах осуществления имидазохинолин включает имидазохинолиновый амин, имидазопиридиновый амин, 6,7-конденсированный циклоалкилимидазопиридиновый амин, имидазохинолиновый амин, имиквимод или резиквимод.

В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида не включает стабилизирующих химических модификаций, чья функция стабилизировать остов в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида включает остов, который не модифицирован включением фосфоротиоатных стабилизирующих химических модификаций. В некоторых вариантах осуществ-

ления иммуномодулирующим средством является адъювант. В определенных вариантах осуществления адъювант включает агонист Toll-подобного рецептора (TLR), такой как агонист TLR 3, агонист TLR 7, агонист TLR 8, агонист TLR 7/8 или агонист TLR 9.

В некоторых вариантах осуществления агонистом TLR является иммуностимулирующая нуклеиновая кислота, такая как иммуностимулирующая ДНК или иммуностимулирующая РНК. В определенных вариантах осуществления иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, которая включает одну или несколько стабилизирующих химических модификаций, чья функция стабилизировать остов в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления адъювант включает универсальный Т-клеточный антиген.

В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель дополнительно включает В-клеточный антиген и/или Т-клеточный антиген. В определенных вариантах осуществления синтетические наноносители дополнительно включают свойство нацеливания на антигенпрезентирующие клетки (APC). В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители включают один или несколько биоразлагаемых полимеров. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с одним или несколькими биоразлагаемыми полимерами посредством связывающей иммуномодулирующей части. В определенных вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает поли(лактид), поли(гликолид) или сополимер(лактида и гликолида).

В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В определенных вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующая соединение часть включает амидную связь. В некоторых вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующая соединение часть включает сложноэфирную связь.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители включают наночастицы на основе липидов, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка, наночастицы, которые содержат комбинацию наноматериалов, сфероидальные наночастицы, кубические наночастицы, пирамидальные наночастицы, вытянутые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы.

Аспекты данного изобретения относятся к композициям, включающим синтетические наноносители, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем, при этом иммуномодулирующее средство диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:  $IA(4,5)_{24\%}/IA(4,5)_6 \geq 1,2$ , где  $IA(4,5)_{24\%}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей, и где  $IA(4,5)_6$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 6 ч, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство включает лабильное иммуномодулирующее средство, инкапсулированное в синтетическом наноносителе. В определенных вариантах осуществления лабильное иммуномодулирующее средство включает имидазохинолин, производное аденина или олигонуклеотид, которые включают 5'-CG-3', где С неметилирован и где олигонуклеотид включает остов, включающий одну или несколько нестабилизированных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления имидазохинолин включает имидазохинолиновый амин, имидазопиридиновый амин, 6,7-конденсированный циклоалкилимидазопиридиновый амин, имидазохинолиновый амин, имиквимод или резиквимод. В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида не включает стабилизирующие химические модификации, чья функция стабилизировать остов в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида включает остов, который не модифицирован включением фосфоротиоатных стабилизирующих химических модификаций.

Дальнейшие аспекты данного изобретения относятся к композициям, включающим синтетические наноносители, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем, при этом иммуномодулирующее средство диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:  $6 \leq IA(4,5)_{24\%}/IA(4,5)_6 \leq 1,2$ , где  $IA(4,5)_{24\%}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей, и где  $IA(4,5)_6$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 6 ч, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство включает лабильное иммуномодулирующее средство, инкапсулированное в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления лабильное иммуномодулирующее средство включает имидазохинолин, производное аденина или олигонуклеотид, которые включают 5'-CG-3', где С неметилирован и где олигонуклеотид вклю-

часть остов, включающий одну или несколько нестабилизированных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления имидазохинолин включает имидазохинолиновый амин, имидазопиридиновый амин, 6,7-конденсированный циклоалкилимидазопиридиновый амин, имидазохинолиновый амин, имиквимод или резиквимод.

В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида не включает стабилизирующих химических модификаций, чья функция стабилизировать остов в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления остов олигонуклеотида включает остов, который не модифицирован включением фосфоротиоатных стабилизирующих химических модификаций. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство инкапсулировано в синтетическом наноносителе.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующим средством является адъювант. В определенных вариантах осуществления адъювант включает агонист Toll-подобного рецептора (TLR), такой как агонист TLR 3, агонист TLR 7, агонист TLR 8, агонист TLR 7/8 или агонист TLR 9. В определенных вариантах осуществления агонистом TLR является иммуностимулирующая нуклеиновая кислота, такая как иммуностимулирующая ДНК или иммуностимулирующая РНК.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, которая включает одну или несколько стабилизирующих химических модификаций, чья функция стабилизировать остов в физиологических условиях. В определенных вариантах осуществления адъювант включает универсальный Т-клеточный антиген. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель дополнительно включает В-клеточный антиген и/или Т-клеточный антиген.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители дополнительно включают свойство нацеливания на антигенпрезентирующие клетки (APC). В определенных вариантах осуществления синтетические наноносители включают один или несколько биоразлагаемых полимеров. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с одним или несколькими биоразлагаемыми полимерами посредством связывающей иммуномодулирующее средство части. В определенных вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает поли(лактид), поли(гликолид) или сополимер(лактида и гликолида).

В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Д, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В определенных вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующее соединение часть включает амидную связь. В некоторых вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующее соединение часть включает сложноэфирную связь.

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители включают наночастицы на основе липидов, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка, наночастицы, которые содержат комбинацию наноматериалов, сфероидальные наночастицы, кубические наночастицы, пирамидальные наночастицы, вытянутые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы. В определенных вариантах осуществления композиции, связанные с данным изобретением, дополнительно включают фармацевтически приемлемый эксципиент.

Дополнительные аспекты данного изобретения относятся к композициям, включающим вакцину, которая включает любую из композиций, связанных с данным изобретением.

Дополнительные аспекты данного изобретения включают способы, которые включают введение любой из композиций, связанных с данным изобретением, субъекту. В некоторых вариантах осуществления композиции находятся в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления у субъекта - рак, инфекционное заболевание, неаутоиммунное нарушение обмена веществ, дегенеративное заболевание или привыкание.

#### **Краткое описание графических материалов**

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

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

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

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

фиг. 5 демонстрирует уровень индукции антител синтетическими наноносителями, которые высвобождают сложный фосфодиэфир, CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту без

остатка тиокислоты или CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту с остатком тиокислоты;

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

фиг. 7 демонстрирует уровень индукции антител синтетическими наноносителями, которые транспортируют удерживаемый фосфодиэфирный (PO) CpG, обозначенных как NC-Nic/PO-CpG;

фиг. 8 демонстрирует высвобождение удерживаемого PO-CpG из наноносителей при pH 4,5 по сравнению с pH 7,5. Данные демонстрируют, что лабильное иммуномодулирующее средство, такое как PO-CpG, защищено инкапсулированием в синтетическом наноносителе. Такое лабильное средство может высвобождаться в требуемом месте действия с pH 4,5 (например, в эндосоме/лизосоме), при этом низкие уровни высвобождения наблюдаются при pH 7,4 (например, обычно pH снаружи эндосомы/лизосомы).

#### Подробное описание

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

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

Как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки с множественным числом, если содержание четко не диктует иное.

Например, ссылка на "полимер" включает смесь из двух или более таких молекул, ссылка на "растворитель" включает смесь из двух или более таких растворителей, ссылка на "адгезив" включает смеси из двух или более таких материалов и т.п.

#### Введение.

Данное изобретение является полезным в том, что оно обеспечивает способ высвобождения иммуномодулирующих средств более напрямую в местах действия представляющих интерес клеток, в частности антиген-презентирующих клеток, что в результате приведет к благоприятному иммунному ответу и/или уменьшит нецелевые эффекты и токсичность, поскольку большая часть высвобождения иммуномодулирующих средств будет на месте действия в представляющих интерес клетках. Это представляет отдельный интерес для доставки адъювантов. Свойства контролируемого высвобождения впервые предлагают контролируемый способ доставки иммуномодулирующих средств к представляющим интерес иммунитам, включая возможность высвобождения иммуномодулирующих средств на протяжении продолжительного периода. Все это ведет к очень настраиваемой системе с получением оптимального высвобождения иммуномодулирующего средства так, чтобы оно высвобождалось преимущественно на месте действия требуемых клеток.

Авторы дополнительно узнали, что связывание лабильных иммуномодулирующих средств в синтетических наноносителях по данному изобретению посредством инкапсулирования лабильных иммуномодулирующих средств в синтетических наноносителях по данному изобретению и обеспечение контролируемого способа доставки лабильных иммуномодулирующих средств к представляющим интерес иммунитам, предпочтительно на протяжении продолжительного периода, даст в результате целенаправленную доставку лабильных иммуномодулирующих средств, минимизируя при этом нецелевые эффекты иммуномодулирующих средств, особенно нецелевые эффекты, связанные с систематическим введением иммуномодулирующих средств. Кроме того, данный подход может улучшить результативность лабильных иммуномодулирующих средств, имеющих короткий период полувыведения, которые в ином случае могут не иметь требуемый уровень фармакологической активности.

В одном варианте осуществления данное изобретение касается определенных олигонуклеотидов. В последнее время был ряд сообщений, описывающих иммуностимулирующий эффект конкретных типов молекул нуклеиновых кислот, включая CpG-нуклеиновые кислоты, с высоким содержанием GU оцПНК (одноцепочечные ПНК) и двуцепочечные ПНК. Следует отметить, что недавно сообщалось о том, что Toll-подобный рецептор 9 (TLR9) узнает бактериальную ДНК и олигонуклеотиды, содержащие CpG мотив, где цитозин метилирован. Hemmi H. et al. (2000) Nature, 408:740-5; Bauer S. et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA, 98:9237-42. Эффекты CpG-содержащих олигонуклеотидов на иммунную модуляцию подробно были описаны в патентах США, таких как патенты США № 6194388, 6207646, 6239116 и 6218371, и в опубликованных международных патентных заявках, таких как WO98/37919, WO98/40100, WO98/52581 и WO99/56755. Неметилированной может быть вся иммуностимулирующая нуклеиновая кислота или метилированными могут быть части, но, по меньшей мере, должен быть метилирован C из 5'-CG-3'.

Естественные ДНК-олигонуклеотиды содержат фосфодиэфирные связи, которые быстро расщепляются нуклеазами, обнаруживаемыми во внеклеточной среде; Yu, D. et al., Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: in vitro and in vivo immunostimulatory properties, Biochem Biophys Res

Commun, 2002, 297(1): p. 83-90 ("Yu et al."); Heeg, K., et al., Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides, Int J. Med. Microbiol, 2008, 298(1-2): p. 33-8 ("Heeg et al."). Такие естественные олигонуклеотиды могут считаться лабильными иммуномодулирующими средствами.

Соответственно способы химической стабилизации связей путем замещения фосфодиэфирной связывающей группы фосфоротиоатной группой подробно освещены в литературе; см. патент США № 6811975 "Фосфоротиоатные олигонуклеотиды с модифицированными межнуклеозидными связями".

Фосфоротиоатные CpG-содержащие олигонуклеотиды систематично вводили в качестве вакцинных адъювантов; Yu et al. Однако систематичное введение стабилизированных CpG-олигонуклеотидов может привести к нецелевым иммуностимулирующим эффектам, таким как общее воспаление, неспецифическая активация лимфоцитов и гриппоподобные симптомы; Haas, T., et al., Sequence independent interferon-alpha induction by multimerized phosphodiester DNA depends on spatial regulation of Toll-like receptor-9 activation in plasmacytoid dendritic cells, Immunology, 2009, 126(2): p. 290-8 ("Haas et al."). Соответственно такие олигонуклеотиды могут быть эффективно включены в практическое осуществление настоящего изобретения, как это описано более детально ниже.

Авторы неожиданно и к удивлению обнаружили, что проблемы и ограничения, отмеченные выше, могут быть преодолены применением изобретения, раскрытого в данном документе. В частности, авторы неожиданно обнаружили, что возможно обеспечение наряду со связанными с ними способами композиции, которая включает синтетические наноносители, включающие иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем; где иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$IA(\text{высв.}) (4,5)_t\% / IA(\text{высв.}) (7,4)_t\% \geq 1,2;$$

где  $IA(\text{высв.}) (4,5)_t\%$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  часов, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  часов, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  часов, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее образцов синтетических наноносителей; и где  $IA(\text{высв.}) (7,4)_t\%$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 7,4 в течение  $t$  часов, деленный на сумму вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 7,4 в течение  $t$  часов, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 7,4 в течение  $t$  часов, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей; и где  $t$  равно 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 ч.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, отделяется от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$\begin{aligned}
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,3, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,4, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,6, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,7, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,8, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,9, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 2, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 2,2, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 2,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 2,7, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 3, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 3,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 4, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 4,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 5,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 6, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 6,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 7, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 7,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 8, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 8,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 9, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 9,5, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 10, \\
 &IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 10,5
 \end{aligned}$$

или

$$IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 11,$$

где где  $IA(высв.) (4,5)t\%$ ,  $IA(высв.) (7,4)t\%$  и  $t$  являются такими, как определено выше.

В других вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$2 \leq IA(высв.) (4,5) t\% / IA(высв.) (7,4) t\% \geq 1,2,$$

$2,5 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $3 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $3,5 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $4 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $4,5 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $5 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $6 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $7 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $8 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $9 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 1,2,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 2,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 2,5,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 3,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 3,5,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 4,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 4,5,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 5,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 6,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 7,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 8,$   
 $10 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 9,$   
 $3 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 2,$   
 $4 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 3,$   
 $5 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 4,$   
 $6 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 5,$   
 $7 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 6,$   
 $8 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 7$  или  
 $9 \leq IA(высв.) (4,5)_t \% / IA(высв.) (7,4)_t \% \geq 8,$

где  $IA(высв.) (4,5)_t \%$ ,  $IA(высв.) (7,4)_t \%$  и  $t$  являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления  $t$  равно 24 ч.

Соответственно данное изобретение относится к композициям и способам, включающим синтетические наноносители, которые высвобождают иммуномодулирующие средства при значительно различающихся скоростях в нейтральном и кислом pH. При доставке иммуномодулирующих средств, для того, чтобы получить наиболее сильный эффект, желательно, чтобы большая часть иммуномодулирующего средства высвободилась внутри APC, где они смогут оказывать требуемый эффект. При введении иммуномодулирующих средств в свободной форме, или при их высвобождении и синтетической наночастицы вне APC, лишь небольшая часть иммуномодулирующего средства найдет путь к APC, в то время как остаток распространится по телу, при этом иммунная стимуляция будет меньшей и может привести к вредным эффектам. Приведенные в данном документе синтетические наноносители по данному изобретению предпочтительно поглощаются APC. После поглощения APC синтетические наноносители считаются поглощенными посредством эндоцитоза в эндосомальный/лизосомальный компартмент, где pH становится более кислым по сравнению с нейтральным pH снаружи клеток. В этих условиях иммуномодулирующее средство проявляет pH-чувствительную диссоциацию от синтетического наноносителя (например, от связывающей иммуномодулирующее средство части) и высвобождается из синтетического наноносителя.

Иммуномодулирующее средство затем имеет возможность взаимодействовать с рецепторами, связанными с эндосомой/лизосомой, и стимулировать требуемый иммунный ответ. Свойство синтетических наноносителей по данному изобретению иметь более низкое высвобождение иммуномодулирующих средств при или около нейтрального pH или в вариантах осуществления при или около значения физио-

логического pH (т.е. pH 7,4), но повышенное высвобождение при или около pH 4,5 является желаемым, поскольку оно нацеливает иммуномодулирующие средства на эндосомальный/лизосомальный компартмент APC, на которые нацелены синтетические наноносители.

Иммуномодулирующие средства могут быть связаны с синтетическими наноносителями любым способом. В целом, связывание может быть результатом связи между иммуномодулирующим средством и синтетическим наноносителем. Данная связь может в результате дать иммуномодулирующее средство, которое прикреплено к поверхности синтетического наноносителя и/или содержится (инкапсулировано) в синтетическом наноносителе. В некоторых вариантах осуществления, однако, иммуномодулирующее средство инкапсулируется синтетическим наноносителем скорее вследствие структуры синтетического наноносителя, чем в связи с синтетическим наноносителем.

Если связывание происходит вследствие связи между иммуномодулирующим средством и синтетическим наноносителем, то связывание происходит через связывающую иммуномодулирующее средство часть. "Связывающая иммуномодулирующее средство часть" может быть любой частью, посредством которой иммуномодулирующее средство связывается с синтетическим наноносителем. Такие части включают ковалентные связи, такие как амидная связь или сложноэфирная связь, а также отдельные молекулы, которые связывают (ковалентно или нековалентно) иммуномодулирующее средство с синтетическим наноносителем. Такие молекулы включают линкеры или полимеры или их элементарное звено. Например, связывающая иммуномодулирующее средство часть может включать загруженный полимер, с которым электростатически связывается иммуномодулирующее средство (например, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота). В качестве другого примера связывающая иммуномодулирующее средство часть может включать полимер или его элементарное звено, с которым ковалентно связывается иммуномодулирующее средство.

В некоторых вариантах осуществления полимер включает сложный полиэфир, поликарбонат, полиамид или простой полиэфир. В других вариантах осуществления полимер или его элементарное звено включают поли(этиленгликоль) (PEG), поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), блок-сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон или их элементарное звено. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы полимер был биоразлагаемым. Таким образом, в данных вариантах осуществления предпочтительно, что если полимер включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль) или его элементарное звено, то полимер включает блок-сополимер простого полиэфира и биоразлагаемого полимера с тем, чтобы полимер был биоразлагаемым. В других вариантах осуществления полимер сам по себе не включает простой полиэфир или его элементарное звено, такой как поли(этиленгликоль) или его элементарное звено. Связывающая иммуномодулирующее средство часть, которая приведена в данном документе, таким образом может включать один из вышеупомянутых полимеров или его элементарное звено (например, лактид или гликолид).

В некоторых вариантах осуществления для применения в составе синтетического наноносителя полимер из соединений или конъюгатов, приведенных в данном документе, является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C является биоразлагаемым или и то и другое. В других вариантах осуществления полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C, но растворимым при pH 4,5 и при 25°C. В еще других вариантах осуществления полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C, но растворимым при pH 4,5 и при 25°C и биоразлагаемым. В других вариантах осуществления любой из приведенных в данном документе полимеров может иметь средневесовой молекулярный вес, который определяют гель-проникающей хроматографией, от приблизительно 800 до 10000 Да (например, 2000 Да).

В одном варианте осуществления иммуномодулирующим средством является адъювант, такой как имидазохинолин. Имидазохинолин включает соединения, такие как имиквимод и резиквимод (также известный как R848). Такие адъюванты могут быть связанными с полимером, как приведено выше. Например, резиквимод сконъюгировали с полимером полимолочной кислоты (PLA) ~2000 Да. В исследованиях высвобождения *in vitro* такой вариант осуществления демонстрировал повышение высвобождения R848 в 3-6 раз при падении pH от 7,4 до 4,5. Табл. 1 приводит композиции протестированных частиц. Они включали два состава, которые инкапсулировали R848, два состава с PLA, ковалентно связанной с R848 через амин R848, и четыре состава с PLA, ковалентно связанной с R848 (посредством способа с раскрытием кольца). Во всех составах высвобождение R848 значительно повышалось при более низком pH. Скорость высвобождения инкапсулированного намного выше, чем скорости высвобождения сконъюгированного, и также есть различия в скоростях высвобождения среди способов конъюгации.

Таблица 1

## Целевые составы с ковалентным R848

Состав	Загрузка R848*	Загрузка пептида ova	PLA-PEG-NIC	Тип конъюгата PLA-R848**	PLA (15-20K, BIR202H)	Химия
1	E1,5%	1,1-2,2%	25%		75%	
2	E1,5%++	1,1-2,2%	25%		75%	
3	C75%	0,15-0,31%	25%	Способ 1		Амин
4	C75%	0,15-0,31%	25%	Способ 1		Амин
5	C75%	0,15-0,31%	25%	Способ 5		ROP-выс. MB
6	C75%	0,15-0,31%	25%	Способ 5		ROP-низ. MB
7	C50%	0,15-0,31%	25%	Способ 5	25%	ROP-низ. MB
8	C25%	0,15-0,31%	25%	Способ 5	50%	ROP-низ. MB

\*C=ковалентный R848;

E=инкапсуляция R848.

Хотя вышеприведенный пример был с PLA, иммуномодулирующие средства, такие как R848, могут быть связаны с другими полимерами или их элементарными звеньями, такими как те, что приведены выше или в других частях данного документа, включая блок-сополимер сополимера полилактида и гликолида (PLGA) или его элементарное звено. Иммуномодулирующие средства, такие как R848, могут быть связаны с такими полимерами или их элементарными звеньями через амидную или сложноэфирную связь. Примеры способов осуществления такого связывания приведены в других частях документа и в примерах.

Авторы также неожиданно обнаружили, что возможно обеспечение, наряду с соответствующими способами, композиции, включающей синтетические наноносители, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем; при этом иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2;$$

где  $IA(4,5)_{t1}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t_1$ , взятый как среднее образцов синтетических наноносителей; и где  $IA(4,5)_{t2}$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t_2$ , взятый как среднее образцов синтетических наноносителей; и где  $t_1$  равно 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 ч;  $t_2$  равно 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 или 28 ч и  $t_1 > t_2$ . В некоторых вариантах осуществления  $t_1$  равно 24 ч, а  $t_2$  равно 6 ч.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,5,$$

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2,$$

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3,$$

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 4,$$

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 5,$$

$$IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 7, \quad IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 8, \quad IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 9$$

$$\text{или } IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 10;$$

где  $IA(4,5)_{t1}$ ,  $IA(4,5)_{t2}$ ,  $t_1$  и  $t_2$  являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления  $t_1$  равно 24 ч, а  $t_2$  равно 6 ч.

В других вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, диссоциирует от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \leq 1,2,$$

$$\begin{aligned}
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2, & \quad 10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2,5, \\
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3, & \quad 10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3,5, \\
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 4, & \quad 10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 4,5, \\
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 5, & \quad 10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 6, \\
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 7, & \quad 10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 8, \\
10 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 9, & \quad 9 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
8 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 7 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
4,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 4 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
3,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 3 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
2,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 2 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
1,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 3 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2, \\
4 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3, & \quad 5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 4, \\
6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 5, & \quad 7 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 6, \\
8 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 7 & \quad \text{или} \quad 9 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 8;
\end{aligned}$$

где  $IA(4,5)_{t1}$ ,  $IA(4,5)_{t2}$ ,  $t1$  и  $t2$  являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления  $t1$  равно 24 ч, а  $t2$  равно 6 ч.

Синтетические наноносители по данному изобретению также, как было показано, проявляют свойство усиления гуморального иммунного ответа на специфический антиген. Такой усиленный гуморальный иммунный ответ, как было обнаружено, повышается в некоторых вариантах осуществления более быстрым высвобождением иммуномодулирующего средства. В одном варианте осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, и CpG-содержащая иммуностимулирующая нуклеиновая кислота инкапсулирована в синтетическом наноносителе. При исследованиях *in vitro*, описанных далее ниже в примерах, было обнаружено, что оптимальное высвобождение CpG-содержащих иммуностимулирующих нуклеиновых кислот из синтетических наноносителей продуцировало повышенный гуморальный иммунный ответ на никотин, который также был связан с синтетическими наноносителями. В некоторых вариантах осуществления такое оптимальное высвобождение было обнаружено как более хорошее усиление ответа посредством антител на антиген.

Оптимальным высвобождением является диссоциация иммуномодулирующего средства от синтетического наноносителя, которая дает наилучшие уровни требуемого эффекта(эффектов). В некоторых вариантах осуществления требуемым эффектом является немедленный иммунный ответ требуемого уровня (т.е. ответ, который происходит вскоре после введения синтетического наноносителя). Обычно немедленным иммунным ответом является ответ, измеряемый порядка секунд, минут или нескольких часов. В других вариантах осуществления требуемым эффектом является иммунный ответ требуемого уровня, который происходит спустя несколько часов. В еще одних других вариантах осуществления требуемым эффектом является иммунный ответ требуемого уровня, который поддерживается в течение продолжительного периода времени, например в течение 1, 2, 5, 10, 15 или более часов. В других вариантах осуществления продолжительный период времени составляет в течение 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или более суток. В следующих вариантах осуществления продолжительный период времени составляет в течение 1, 2, 5, 10 или более месяцев. В следующих вариантах осуществления продолжительный период времени составляет в течение 1, 2, 5, 10 или более лет. В некоторых вариантах осуществления композиция из синтетических наноносителей, которая обеспечивает оптимальное высвобождение, является композицией, в которой иммуномодулирующее средство диссоциирует от синтетического наноносителя согласно одному из вышеприведенных соотношений.

В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, предпочтительно лабильное иммуномодулирующее средство, которое диссоциирует от синтетического наноносителя со средней скоростью, удовлетворяет следующему соотношению:

$$\begin{aligned}
 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
 4 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 3 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, \\
 2 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,2, & \quad 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2, \\
 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2,5, & \quad 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3, \\
 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 3,5, & \quad 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 4, \\
 6 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 5, & \quad 4 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,5, \\
 3,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,5, & \quad 3 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,5, \\
 2,5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 1,5, & \quad 5 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2, \\
 4 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2 & \quad \text{или} \quad 3 \leq IA(4,5)_{t1}/IA(4,5)_{t2} \geq 2;
 \end{aligned}$$

где  $IA(4,5)_{t1}$ ,  $IA(4,5)_{t2}$ ,  $t1$  и  $t2$  являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления  $t1$  равно 24 ч, а  $t2$  равно 6 ч.

В другом примере резиквимод инкапсулировали в синтетическом наноносителе. При исследованиях *in vitro*, описанных далее ниже в примерах, было обнаружено, что резиквимод, содержащийся в синтетических наноносителях, усиливал гуморальный иммунный ответ на никотин, также связанный с синтетическими наноносителями. Также было обнаружено, что среднее высвобождение резиквимода из синтетических наноносителей было оптимальным, поскольку оно в результате приводило к более высокому уровню индукции антител, чем быстрое или медленное высвобождение резиквимода.

Соответственно приведенные в данном документе синтетические наноносители могут содержать один или несколько антигенов. Антигенами могут быть В-клеточные антигены, или Т-клеточные антигены, или комбинация из того и другого. В некоторых вариантах осуществления такие антигены могут быть связаны с синтетическими наноносителями так, чтобы они присутствовали на поверхности синтетических наноносителей, были инкапсулированы в наноносителях или и то и другое. В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство усиливает иммунный ответ на такой антиген. Как упомянуто выше, антиген может быть также связан с синтетическими наноносителями. В других вариантах осуществления, однако, такой антиген ковалентно не связан с синтетическими наноносителями. В некоторых из этих вариантов осуществления такой антиген может быть введен совместно субъекту. В еще других из этих вариантов осуществления такой антиген не вводят совместно субъекту.

#### Определения.

"Адьювант" означает средство, которое не представляет собой конкретный антиген, но увеличивает силу и продолжительность иммунного ответа на антиген. Такие адьюванты могут включать, без ограничения, стимуляторы образраспознающих рецепторов, таких как Toll-подобные рецепторы, RIG-1 и NOD-подобные рецепторы (NLR), минеральные соли, такие как квасцы, объединенные с монофосфолипидными (MPL) A из *Enterobacteria*, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* или *Shigella flexneri*, или, в частности, с MPL® (AS04), MPL A из вышеупомянутых бактерий отдельно, сапонины, такие как QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, эмульсии, такие как MF59™, Montanide® ISA 51 и ISA 720, AS02 (QS21+скавален+MPL®), липосомы и липосомальные составы, такие как AS01, синтезированные или специально полученные микрочастицы и микротранспортеры, такие как происходящие от бактерий везикулы из внешней мембраны (OMV) из *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и других, или хитозановые частицы, средства, образующие депо, такие как блок-сополимеры Pluronic®, специально модифицированные или полученные пептиды, такие как мурамил-дипептид, аминокислоты, такие как RC529, или белки, такие как бактериальные токсины или фрагменты токсинов. В вариантах осуществления адьюванты включают агонисты для образраспознающих рецепторов (PRR), включая, без ограничения, Toll-подобные рецепторы (TLR), в особенности TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 и/или их комбинации. 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 упомянутые адьюванты включают имидазохинолины; такие как резиквимод (также известный как R848); адениновые производные, такие как те, которые описаны в патенте США № 6329381 (Sumitomo Pharmaceutical Company); иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК. В специфических вариантах осуществления синтетические наноносители включают в качестве адьювантов соединения, которые представляют собой агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR) 7 и 8 ("агонисты TLR 7/8"). С практической стороны соединения-агонисты TLR 7/8 раскрыты в патенте США № 6696076 Tomai et al., включая, без ограничения, имидазохинолинамины, имидазопиридинамины, 6,7-конденсированные циклоалкилимидазопиридинамины и 1,2-мостиковые имидазохинолинамины. Предпочтительные адьюванты включают имиквимод и резиквимод. В конкретных вариантах осуществления адьювант может быть агонистом для поверхностной молекулы CD 40 DC (денд-

ритных клеток). В определенных вариантах осуществления синтетический наноноситель включает адъювант, который способствует созреванию DC (необходимых для эффективного примирования наивных Т-клеток) и продуцирования цитокинов, таких как интерфероны I типа, которые, в свою очередь, стимулируют иммунный ответ с помощью антител и цитотоксический иммунный ответ против требуемого антигена. В вариантах осуществления адъюванты также могут содержать иммуностимулирующие РНК молекулы, такие как, без ограничения, дсРНК или поли I:C (TLR3 стимулятор), и/или раскрытые у 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., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" U.S. Pat. Appl. Publ. US 2006241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" WO 2003086280 A2. В некоторых вариантах осуществления адъювантом может быть агонист TLR-4, такой как бактериальный липополисахарид (LPS), VSV-G и/или HMGB-1. В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут включать агонисты TLR-5, такие как флагеллин, или их части, или производные, включая, без ограничения, описанные в патентах США № 6130082, 6585980 и 7192725. В специфических вариантах осуществления синтетические наноносители включают лиганд к Toll-подобному рецептору (TLR)-9, такой как иммуностимулирующий олигонуклеотидные молекулы, включающие мотивы 5'-CG-3', где С неметилирован, которые индуцируют секрецию интерферона I типа и стимулируют активацию Т- и В-клеток, приводя к повышенной продукции антител и цитотоксическим Т-клеточным ответам (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 некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть провоспалительными стимулами, выделенными некротическими клетками (например, кристаллы уратов). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами каскада комплемента (например, CD21, CD35 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами иммунных комплексов. Адъюванты также включают агонисты рецептора комплемента, такие как молекула, которая связывается с CD21 или CD35. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора комплемента индуцирует опсонизацию эндогенного комплемента синтетического наноносителя. В некоторых вариантах осуществления адъюванты являются цитокинами, которые относятся к малым протеинам или биологическим факторам (в диапазоне 5-20 кДа), которые выделяются клетками и имеют специфические эффекты на межклеточное взаимодействие, коммуникацию и поведение других клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист цитокинового рецептора является малой молекулой, антителом, сшитым белком или аптамером.

"Введение" или "ввод" означает обеспечение лекарства пациенту фармакологически пригодным способом.

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

В вариантах осуществления нацеливающие части для известных мишеней на макрофагах ("МФ") включают любую нацеливающую часть, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), которая заметно экспрессируется и/или представлена на макрофагах (т.е. маркеры макрофагов субкапсулярного синуса). Иллюстративные маркеры СКС-МФ включают, без ограничения,

CD4 (L3T4, W3/25, T4);  
 CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ L-цепь интегрина);  
 CD11b ( $\alpha$ M-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c ( $\alpha$ X-интегрин, p150, 95, AXb2); CDw12 (p90-120); CD13 (APN, gp150, ЕС 3.4.11.2); CD14 (LPS-R); CD15 (X-гаптен, Льюис X, SSEA-1, 3-FAL); CD15s (сиалил-Льюис X); CD15u (3'-сульфо-Льюис X); CD15su (6-сульфосиалил-Льюис X); CD16a (FCRIIIA); CD16b (Fc $\gamma$ RIIIb); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин  $\beta$ 2, CD11a,b,c  $\beta$ -субъединица); CD26 (DPP IV эктоэнзим, ADA-связывающий белок); CD29 (тромбоцитарный GPIIa,  $\beta$ -1 интегрин, GP); CD31 (PECAM-1, эндотелин); CD32 (FC $\gamma$ RII); CD33 (gp67); CD35 (CR1, C3b/C4b рецептор); CD36 (GpIIIB, GPIV, PASIV); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD43 (сиалофорин, лейкосиалин); CD44 (EMCR11, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейтрофиллин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49a (VLA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ 1-интегрин); CD49b (VLA-2 $\alpha$ , gpl $\alpha$ ,  $\alpha$ 2-интегрин); CD49c (VLA-3 $\alpha$ ,  $\alpha$ 3-интегрин); CD49e (VLA-5 $\alpha$ ,  $\alpha$ 5-интегрин); CD49f (VLA-6 $\alpha$ ,  $\alpha$ 6-интегрин, gplc); CD50 (ICAM-3); CD51 (интегрин  $\alpha$ , VNR- $\alpha$ , витронектин-R $\alpha$ ); CD52 (CAMPATH-1, HE5); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD59 (1F5Ag, H19, протектин, MACIF, M1RL, P-18); CD60a (GD3); CD60b (9-O-ацетил GD3); CD61 (GP IIIa,  $\beta$ 3-интегрин); CD62L (L-селектин, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD63 (LIMP, MLA1, gp55, NGA, LAMP-3, ME491); CD64 (Fc $\gamma$ RI); CD65 (церамид, VIM-2); CD65s (сиалированный CD65, VIM2); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиалозамаскированный лактозамин); CD75S ( $\alpha$ 2,6-сиалированный лактозамин); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD84 (p75, GR6); CD85a (ILT5, LIR2, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD87 (uPAR); CD88 (C5aR);

CD89 (Fc-рецептор к IgA, FcαR); CD91 (α2M-R, LRP); CDw92 (p70); CDw93 (GR11); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD97 (BL-KDD/F12); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD99R (CD99, связываемый моноклоноальными антителами); CD100 (SEMA4D); CD101 (IGSF2, F126, V7); CD102 (ICAM-2); CD111 (PVRL1, HveC, PRR1, нектин 1, HIgR); CD112 (HveB, PRR2, PVRL2, нектин 2); CD114 (CSF3R, G-CSRF, HG-CSFR); CD115 (c-fms, CSF-1R, M-CSFR); CD116 (GMCSFRα); CDw119 (IFNγR, IFNγRA); CD120a (TNFRI, p55); CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2Rβ); CD123 (IL-3Rα); CD124 (IL-4Rα); CD127 (p90, IL-7R, IL-7Rα); CD128a (IL-8Ra, CXCR1, (ориентировочно переименованный как CD181)); CD128b (IL-8Rb, CSCR2, (ориентировочно переименованный как CD182)); CD130 (gp130); CD131 (общая β-субъединица); CD132 (общая γ-цепь, IL-2Rγ); CDw136 (MSP-R, RON, p158-ron); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD141 (тромбомодулин, фетомодулин); CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD148 (HPTP-η, p260, DEP-1); CD155 (PVR); CD156a (CD156, ADAM8, MS2); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CDw156C (ADAM10); CD157 (Mo5, BST-1); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD165 (AD2, gp37); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (сиалоадгезин, сиглек-1); CD170 (сиглек-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1α, MyD-1); CD172b (SIRPβ); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD181 (CXCR1, (прежде известный как CD128a)); CD182 (CXCR2, (прежде известный как CD128b)); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD191 (CCR1); CD192 (CCR2); CD195 (CCR5); CDw197 (CCR7 (был CDw197)); CDw198 (CCR8); CD204 (MSR); CD205 (DEC-25); CD206 (MMR); CD207 (лангерин); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD224 (GGT); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD230 (прионный белок (PrP)); CD232 (VESP-R); CD244 (2B4, P38, NAIL); CD245 (p220/240); CD256 (APRIL, TALL2, суперсемейство TNF (лиганд), член 13); CD257 (BLYS, TALL1, суперсемейство TNF (лиганд), член 13b); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNBF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD277 (BT3.1, семейство B7: бутирофилин 3); CD280 (TEM22, ENDO180); CD281 (TLR1, TOLL-подобный рецептор 1); CD282 (TLR2, TOLL-подобный рецептор 2); CD284 (TLR4, TOLL-подобный рецептор 4); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, Na/K-АТФаза, β3-субъединица); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD300e (CMRF-35L1); CD302 (DCL1); CD305 (LAIR1); CD312 (EMR2); CD315 (CD9P1); CD317 (BST2); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw328 (сиглек-7); CDw329 (сиглек-9); CD68 (gp 110, макросиалин);

и/или рецептор маннозы; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

В вариантах осуществления нацеливающие части для известных мишеней на дендритных клетках ("ДК") включают любую нацеливающую часть, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), которая заметно экспрессируется

и/или представлена на ДК (т.е. маркер ДК). Иллюстративные маркеры ДК включают, без ограничения,

CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD1c (M241, R7);  
 CD1d (R3); CD1e (R2); CD11b ( $\alpha$ M-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c ( $\alpha$ X-интегрин, p150, 95, AXb2); CDw117 (лактозилцерамид, LacCer); CD19 (B4); CD33 (gp67); CD 35 (CR1, рецептор C3b/C4b); CD 36 (GpIIb, GPIV, PASIV); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD49d (VLA- $\alpha$ 4,  $\alpha$ 4-интегрин); CD49e (VLA- $\alpha$ 5,  $\alpha$ 5-интегрин); CD58 (LFA-3); CD64 (Fc $\gamma$ RI); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (экто-5'нуклеотидаза); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD83 (HB15); CD85a (ILT5, LIR3, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD88 (C5aB); CD97 (BL-KDD/F12); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD116 (GM-CSFR $\alpha$ ); CD120a (TMFRI, p55); CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80); CD123 (IL-3R $\alpha$ ); CD139; CD148 (HPTP- $\eta$ , DEP-1); CD150 (SLAM, IPO-3); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CD157 (Mo5, BST-1); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (сиалоадгезин, сиглек-1); CD170 (сиглек-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1 $\alpha$ , MyD-1); CD172b (SIRP $\beta$ ); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD193 (CCR3); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (ws CDw197)); CDw197 (CCR7, EBI1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CD206 (MMR); CD207 (лангерин); CD208 (DC-LAMP); CD209 (DCSIGN); CDw218a (IL18R $\alpha$ ); CDw218b (IL8R $\beta$ ); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD230 (прионный белок (PrP)); CD252 (OX40L, суперсемейство TNF (лиганд), член 4); CD258 (LIGHT, суперсемейство TNF (лиганд), член 14); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD271 (NGFR, p75, суперсемейство TNFR, член 16); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1, PDL1); CD275 (B7H2, ICOSL); CD276 (B7H3); CD277 (BT3.1, семейство B7: бутирофилин 3); CD283 (TLR3, TOLL-подобный рецептор 3); CD289 (TLR9, TOLL-подобный рецептор 9); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3,  $\beta$ 3-субъединица Na/K-АТФазы); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD301 (MGL1, CLECSF14); CD302 (DCL1); CD303 (BDCA2); CD304 (BDCA4); CD312 (EMR2); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD320 (8D6); и CD68 (gp110, макросиалин); MHC II класса; BDCA-1; сиглек-H;

где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

В вариантах осуществления нацеливание может быть выполнено с помощью любой нацеливающей части, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессируется и/или представлен на В-клетках (т.е. маркер В-клеток). Иллюстративные маркеры В-клеток включают, без ограничения,

CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD2 (рецептор Е-розетки, T11, LFA-2); CD5 (T1, Trp67, Leu-1, Ly-1); CD6 (T12); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ L-цепь интегрина); CD11b ( $\alpha$ M-цепь интегрина, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c ( $\alpha$ X-интегрин, P150, 95, Axb2); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин  $\beta$ 2,  $\beta$ -субъединица CD11a, b, c); CD19 (B4); CD20 (B1, Bp35); CD21 (CR2, EBV-R, C3dR); CD22 (BL-CAM, Lyb8, сиглек-2); CD23 (Fc $\epsilon$ RII, B6, BLAST-2, Leu-20); CD24 (BBA-1, HSA); CD25 (Tас-антиген, IL-2R $\alpha$ , p55); CD26 (DPP IV эктоэнеим, ADA-связывающий белок); CD27 (T14, S152); CD29 (тромбоцитарный GPIIa, интегрин  $\beta$ -1, GP); CD31 (PECAM-1, эндокам); CD32 (FC $\gamma$ RII); CD35 (CR1, C3b/C4b рецептор); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD44 (ECMR1, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейтрофилин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49b (VLA-2 $\alpha$ , gpla,  $\alpha$ 2-интегрин); CD49c (VLA-3 $\alpha$ ,  $\alpha$ 3-интегрин); CD49d (VLA-4 $\alpha$ ,  $\alpha$ 4-интегрин); CD50 (ICAM-3); CD52 (CAMPATH-1, HES); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD60a (GD3); CD62L (L-селектин, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиалозамаскированный лактозамин); CD75S ( $\alpha$ 2, 6-сиализированный лактозамин); CD77 (Pk-антиген, BLA, CTH/Gb3); CD79a (Ig $\alpha$ , MB1); CD79b (Ig $\beta$ , B29); CD80; CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD83 (HB15); CD84 (P75, GR6); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CDw92 (p70); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD100 (SEMA4D); CD102 (ICAM-2); CD108 (SEMA7A, антиген группы крови JMH); CDw119 (IFN $\gamma$ R, IFN $\gamma$ Ra); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR1I, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2R $\beta$ ); CD124 (IL-4R $\alpha$ ); CD130 (gp130); CD132 (общая  $\gamma$ -цепь, IL-2R $\gamma$ ); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD150 (SLAM, IPO-3); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD171 (L1CMA, NILE); CD175s (сиалил-Tn (S-Tn)); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD185 (CXCR5); CD192 (CCR2); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (был CDw197)); CDw197 (CCR7, EBI1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CDw218a (IL18R $\alpha$ ); CDw218b (IL18R $\beta$ ); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGF1I-R); CD224 (GGT); CD225 (Leu13); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD229 (Ly9); CD230 (прионный белок (Prp)); CD232 (VESP-R); CD245 (p220/240); CD247 (зета-цепь CD3); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R,

суперсемейство TNF-R, член 11a); CD267 (TACI, суперсемейство TNF-R, член 13B); CD268 (BAFFR, суперсемейство TNF-R, член 13C); CD269 (BCMA, суперсемейство TNF-R, член 16); CD275 (B7H2, ICOSL); CD277 (BT3.1.семейство B7: бутирофилин 3); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3  $\beta$ 3-субъединица Na/K-АТФазы); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD305 (LAIR1); CD307 (IRTA2); CD315 (CD9P1); CD316 (EW12); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw327 (ситлек-6, CD33L); CD68 (gp 100, макросиалин); CXCR5; VLA-4; MHC II класса; поверхностный IgM; поверхностный IgD; APRL; и/или BAFF-R;

где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия. Примеры маркеров включают те, которые предусмотрены в других местах данного документа.

В некоторых вариантах осуществления нацеливание на В-клетки может быть выполнено с помощью любой нацеливающей части, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), которая заметно экспрессируется и/или представлена на В-клетках при активации (т.е. маркер активированных В-клеток). Иллюстративные маркеры активированных В-клеток включают, без ограничения,

CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD15s (сиалил-Льюис X); CD15u (3'-сульфо-Льюис X); CD15su (6-сульфосиалил-Льюис X); CD30 (Ber-H2, Ki-1); CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD70 (Ki-24, CD27 лиганд); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD86 (B7-2/B70); CD97 (BLKDD/F12); CD125 (IL-5R $\alpha$ ); CD126 (IL-6R $\alpha$ ); CD138 (синдекан-1, гепарансульфат-протеогликан); CD152 (CTLA-4); CD252 (OX40L, суперсемейство TNF(лиганд), член 4); CD253 (TRAIL, суперсемейство TNF(лиганд), член 10); CD279 (PD1); CD289 (TLR9, TOLL-подобный рецептор 9); и CD312 (EMR2);

где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия. Примеры маркеров включают те, которые предусмотрены в других местах данного документа.

"В-клеточный антиген" означает любой антиген, который встречается в природе или может быть сконструирован для того, чтобы узнаваться В-клеткой, и запускает (естественным образом или будучи сконструированным, как известно в области техники) иммунный ответ у В-клетки (например, антиген, который специфически распознается В-клеточным рецептором на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся Т-клеточным антигеном, также является В-клеточным антигеном. В других вариантах осуществления Т-клеточный антиген также не является В-клеточным антигеном. В-клеточные антигены включают, без ограничения, белки, пептиды, малые молекулы и углеводы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является небелковым антигеном (т.е. не является белковым или пептидным антигеном). В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является углеводом, связанным с инфекционным агентом. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является гликопротеином или гликопептидом, связанным с инфекционным агентом. Инфекционный агент может быть бактерией, вирусом, грибом, простейшим, паразитом или прионом. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является слабоиммуногенным антигеном. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является веществом, которым злоупотребляют, или его частью. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является вызывающим привыкание веществом или его частью. Вызывающие привыкание вещества включают, без ограничения, никотин, наркотическое средство, средство от кашля, транквилизатор и седативное средство. В некоторых вариантах осуществления В-клеточным антигеном является токсин, например токсин из химического оружия или естественных источников, или загрязняющее вещество. В-клеточный антиген также может быть средством, вредным для окружающей среды. В других вариантах осуществления В-клеточный антиген является аллоантигеном, аллергеном, контактным сенсибилизирующим веществом, антигеном дегенеративного заболевания, гаптеном, антигеном инфекционного заболевания, раковым антигеном, антигеном атопического заболевания, вызывающим привыкание веществом, ксеноантигеном или ферментом нарушения обмена веществ или продуктом данного фермента.

"Биоразлагаемый полимер" означает полимер, который распадается с течением времени при введении в организм субъекта. Биоразлагаемый полимер включает, без ограничения, сложные полиэфиры, поликарбонаты, поликетали или полиамиды. Такие полимеры могут включать поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер простого полиэфира,

например поли(этиленгликоля), и сложного полиэфира, поликарбоната или полиамида или другой биоразлагаемый полимер. В вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер поли(этиленгликоля) и поли(молочной кислоты), поли(гликолевой кислоты), блок-сополимера(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактона. В некоторых вариантах осуществления, однако, биоразлагаемый полимер не включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль), или состоит только из простого полиэфира. В целом, для применения в составе синтетического наноносителя биоразлагаемый полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C. Биоразлагаемый полимер в вариантах осуществления имеет средневесовой молекулярный вес в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 50000 Да, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В некоторых вариантах осуществления средневесовой молекулярный вес составляет от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да, предпочтительно от 800 до 10000 Да, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В других вариантах осуществления средневесовой молекулярный вес составляет от 1000 до 10000 Да, что определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В варианте осуществления биоразлагаемый полимер не включает поликеталь.

"Вводят совместно" означает введение двух или более лекарственных средств субъекту таким способом, который коррелирует во времени. В вариантах осуществления совместное введение может происходить путем введения двух или более лекарственных средств в одной лекарственной форме. В других вариантах осуществления совместное введение может охватывать введение двух или более лекарственных средств в различных лекарственных формах, но в определенном промежутке времени, предпочтительно в пределах 1 месяца, более предпочтительно в пределах 1 недели, еще более предпочтительно в пределах 1 суток и еще более предпочтительно в пределах 1 ч.

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

"Происходящий от" означает адаптированный или модифицированный по сравнению с исходным источником. Например, в качестве неограничивающего примера, пептидный антиген, происходящий от инфекционного штамма, может иметь несколько искусственных аминокислотных остатков, которые замещают естественные аминокислотные остатки, обнаруживаемые в исходном антигене, который обнаруживается у инфекционного штамма. Адаптации или модификации могут быть по ряду причин, включая, без ограничения, повышенную специфичность, более легкий процессинг антигена или повышенную безопасность.

"Лекарственная форма" означает лекарство в среде, транспортёре, носителе или устройстве, пригодном для введения субъекту.

"Эффективное количество" композиции по данному изобретению представляет собой количество, эффективное для определенной цели. Например, если эффективное количество предназначено для терапевтической цели, то количество является эффективным для лечения, ослабления, улучшения, облегчения, замедления начала, ингибирования развития, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния, приведенных в данном документе.

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

"Проявляет pH-чувствительную диссоциацию" означает, что связь между двумя частицами, такими как иммуномодулирующее средство, и синтетическим наноносителем или связывающей иммуномодулирующее средство частью значительно ослабляется или устраняется путем изменения pH среды. В вариантах осуществления соответствующие pH-чувствительные диссоциации могут удовлетворять любому из приведенных в данном документе соотношений или сочетаний.

"IA (высв.) (4,5)<sub>t</sub>%" определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение *t* часов, делен-

ный на сумму вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  часов, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  часов, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей). В вариантах осуществления  $t$  равно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 ч. В предпочтительных вариантах осуществления  $t$  равно 24 ч.

"IA (высв.) (7,4)<sub>t</sub>%" определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение  $t$  часов, деленный на сумму вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение  $t$  часов, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение  $t$  часов, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей). В вариантах осуществления  $t$  равно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 42 или 30 ч. В предпочтительных вариантах осуществления  $t$  равно 24 ч.

"IA (4,5)<sub>t1</sub>" определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной средой при pH 4,5 в течение  $t_1$  часов, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей. "IA (4,5)<sub>t2</sub>" определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной средой при pH 4,5 в течение  $t_2$  ч, взятый как среднее образцов синтетических наноносителей.  $t_1$  равно 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 ч;  $t_2$  равно 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 или 28 ч; и  $t_1 > t_2$ . В предпочтительных вариантах осуществления  $t_1$  равно 24 ч, а  $t_2$  равно 6 ч.

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

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

"Связывающая иммуномодулирующее средство часть" представляет собой любую часть, посредством которой иммуномодулирующее средство связывается с синтетическим наноносителем. Такие части включают ковалентные связи, такие как амидная связь или сложноэфирная связь, а также отдельные молекулы, которые связывают (ковалентно или нековалентно) иммуномодулирующее средство с синтетическим наноносителем. Такие молекулы включают линкеры или полимеры или их элементарное звено. Например, связывающая иммуномодулирующее средство часть может включать загруженный полимер, с которым электростатически связывается иммуномодулирующее средство (например, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота). В качестве другого примера, связывающая иммуномодулирующее средство часть может включать полимер или его элементарное звено, с которым ковалентно связывается иммуномодулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления часть включает сложный полиэфир. В других вариантах осуществления часть включает поли(этиленгликоль), поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), блок-сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. Часть может также включать элементарное звено из любого из вышеупомянутых полимеров, такое как лактид или гликолид.

"Лабильное иммуномодулирующее средство(средства)" означает иммуномодулирующее средство или средства, которые являются нестабильными при физиологических условиях и распадаются до точки, где они более не являются фармакологически активными. В вариантах осуществления наблюдается, что лабильные иммуномодулирующие средства имеют период полувыведения из организма меньше 24, предпочтительно меньше 12, более предпочтительно меньше 10, еще более предпочтительно меньше 8 ч и еще более предпочтительно меньше 6 ч. В вариантах осуществления лабильные иммуномодулирующие средства включают имидазохинолины, производное аденина или олигонуклеотиды, которые включают 5'-CG-3', где C неметилирован и где олигонуклеотид включает остов, включающий одну или несколько нестабилизированных межнуклеотидных связей. В вариантах осуществления имидазохинолины вклю-



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

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

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

"Субъект" означает животное, включая млекопитающих, таких как человек и приматы; птиц; животных домашнего хозяйства или фермы, таких как кошки, собаки, овцы, козы, крупный рогатый скот, лошади и свиньи; лабораторных животных, таких как мыши, крысы и морские свинки, рыбы и тому подобное.

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

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

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

Синтетические наноносители могут включать наночастицы на основе липидов, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка (такие как наночастицы альбумина). Синтетические наноносители могут быть рядом различных форм, включая, без ограничения, сферическую, кубическую, пирамидальную, вытянутую, цилиндрическую, тороидальную и тому подобное. Синтетические наноносители согласно данному изобретению имеют одну или несколько поверхностей. Примеры синтетических наноносителей, которые могут быть адаптированы для использования в практическом применении данного изобретения, включают (1) биоразлагаемые наночастицы, раскрытые в патенте США № 5543158, Gref et al., (2) полимерные наночастицы из опубликованной заявки на патент США № 20060002852, Saltzman et al., (3) сконструированные литографическим способом наночастицы из опубликованной заявки на патент США 20090028910, DeSimone et al., (4) раскрытие WO 2009/051837, von Andrian et al., или (5) наночастицы, раскрытые в опубликованной заявке на патент США № 2008/0145441, Penades et al.

Синтетические наноносители согласно данному изобретению, которые имеют минимальный раз-

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

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

Часто желательно применение популяции синтетических наноносителей, которая является относительно равномерной с точки зрения размера, формы и/или композиции так, чтобы каждый синтетический наноноситель имел сходные свойства. Например, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95% синтетических наноносителей может иметь минимальный размер или максимальный размер, который попадает в пределы 5, 10 или 20% от среднего диаметра или среднего размера. В некоторых вариантах осуществления популяция синтетических наноносителей может быть гетерогенной по отношению к размеру, форме и/или композиции.

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

"Т-клеточный антиген" означает любой антиген, который распознается и инициирует иммунный ответ в Т-клетках (например, антиген, который специфически распознается Т-клеточным рецептором на Т-клетках или клетках НКТ посредством презентации антигена или его части, которые связаны с молекулой класса I или класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС) или связаны с CD1-комплексом). В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся Т-клеточным антигеном, также является В-клеточным антигеном. В других вариантах осуществления Т-клеточный антиген также не является В-клеточным антигеном. Т-клеточные антигены обычно являются белками или пептидами. Т-клеточные антигены могут быть антигенами, которые стимулируют ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток или оба из них. Т-клеточные антигены, следовательно, в некоторых вариантах осуществления могут эффективно стимулировать оба варианта ответа.

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный антиген является Т-хелперным антигеном, который является Т-клеточным антигеном, который может давать усиленный ответ на несвязанный В-клетками антиген благодаря стимуляции "помощи" Т-клеток. В вариантах осуществления Т-хелперный антиген может содержать один или несколько пептидов, происходящих от столбнячного токсина, вируса Эпштейна-Барр, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса кори, вируса, вызывающего эпидемический паротит, вируса краснухи, цитомегаловируса, аденовируса, дифтерийного анатоксина или PADRE-пептида. В других вариантах осуществления Т-хелперный антиген может включать один или несколько липидов или гликолипидов, включая, но без ограничений:  $\alpha$ -галактозилцерамид ( $\alpha$ -GalCer), гликофинголипиды, связанные по  $\alpha$ -положению (из *Sphingomonas* spp.), галактозилдиацилглицеролы (из *Borrelia burgdorferi*), липофосфогликан (из *Leishmania donovani*) и фосфатидилинозитола тетраманнозид (PIM4) (из *Mycobacterium leprae*). Дополнительные липиды и/или гликолипиды, пригодные в качестве Т-хелперных антигенов, см. V. Cerundolo et al., "Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies", *Nature Rev. Immun.*, 9:28-38 (2009). В вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клеточные антигены могут быть производными CD4<sup>+</sup> Т-клеточных антигена, полученного из источника, например природного источника. В таких вариантах осуществления последовательности CD4<sup>+</sup> Т-клеточных антигенов, такие как те пептиды, которые связываются с МНС II, могут быть по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% идентичны антигену, полученному из данного источника. В вариантах осуществления Т-клеточный антиген, предпочтительно Т-хелперный антиген, может быть связанным с или несвязанным с синтетическим наноносителем.

"Его элементарное звено" относится к мономерному элементарному звену полимера, при этом по-

лимер в целом составлен из ряда связанных мономеров.

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

#### **Способы создания изобретенных соединений, конъюгатов или синтетических наноносителей**

Иммуномодулирующее средство может быть связано с синтетическим наноносителем любым способом так, чтобы диссоциация иммуномодулирующего средства от синтетического наноносителя удовлетворяла диссоциативным соотношениям, приведенным в данном документе. Способы определения того, удовлетворяют или нет иммуномодулирующие средства синтетических наноносителей приведенным в данном документе диссоциативным соотношениям, приведены выше и в примерах.

Олигонуклеотиды по данному изобретению могут быть инкапсулированы в синтетические наноносители с помощью ряда способов, включая, но без ограничений, C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles", J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, p. 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). Могут быть использованы другие способы, пригодные для инкапсулирования олигонуклеотидов в синтетические наноносители, включая, без ограничения, способы, раскрытые в патенте Соединенных Штатов № 6632671, Unger, 14 октября 2003 г.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство ковалентно связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части (например, полимера или его элементарного звена). В целом полимер или его элементарное звено может быть ковалентно связано с иммуномодулирующим средством несколькими способами.

Следующие способы или любой этап из приведенных способов приводятся в качестве примеров и могут быть осуществлены при любых подходящих условиях. В некоторых случаях реакция или любой этап приведенных способов могут быть осуществлены в присутствии растворителя или смеси растворителей.

Неограничивающие примеры растворителей, которые могут быть пригодны для применения в данном изобретении, включают, без ограничения, р-крезол, толуол, ксилол, мезителен, диэтиловый эфир, гликоль, петролейный эфир, гексан, циклогексан, пентан, дихлорметан (или метиленхлорид), хлороформ, диоксан, тетрагидрофуран (THF), диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), этилацетат (EtOAc), триэтиламин, ацетонитрил, метил-трет-бутиловый эфир (MTBE), N-метилпирридон (NMP), диметилацетамид (DMAC), изопропанол (IPA) их смеси или подобное. В некоторых случаях растворитель выбран из группы, состоящей из этилацетата, метиленхлорида, THF, DMF, NMP, DMAC, DMSO и толуола или их смесей.

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

Реакции или любому этапу из приведенных способов может быть позволено проходить в течение любого подходящего периода времени. В некоторых случаях реакции или любому этапу из приведенных способов позволяют проходить в течение приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50 мин, приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 4, приблизительно 8, приблизительно 12, приблизительно 16, приблизительно 24 ч, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4 суток или дольше. В некоторых случаях аликвоты реакционной смеси могут быть собраны и проанализированы в промежуточное время для определения хода реакции или лю-

бого этапа из приведенных способов. В некоторых вариантах осуществления реакция или любой этап из приведенных способов могут быть осуществлены в инертной атмосфере в безводных условиях (например, в атмосфере азота или аргона, в безводных растворителях и т.д.).

Продукты реакции и/или промежуточные продукты могут быть выделены (например, посредством дистилляции, колоночной хроматографии, экстракции, осаждения и т.д.) и/или проанализированы (например, газожидкостной хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией, ядерной магнитно-резонансной спектроскопией и т.д.) с использованием общеизвестных методик. В некоторых случаях синтетический наноноситель может быть проанализирован для определения загрузки иммуномодулирующего средства, например, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

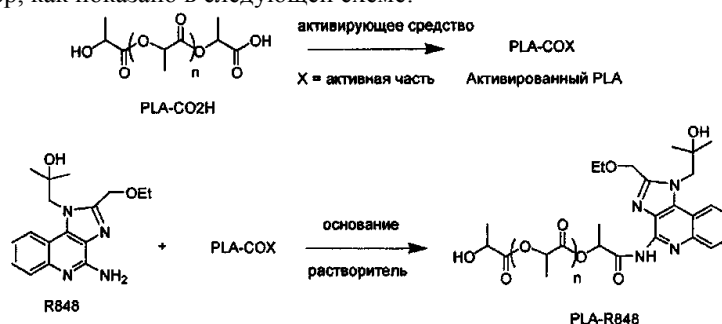
Полимеры могут иметь любой подходящий молекулярный вес. Например, полимеры могут иметь низкий или высокий молекулярный вес. Неограничивающие значения молекулярного веса включают 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 Да или более. В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют средневесовой молекулярный вес от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да. Молекулярный вес полимера может быть определен с помощью гелепроникающей хроматографии.

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

#### Способ 1.

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

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

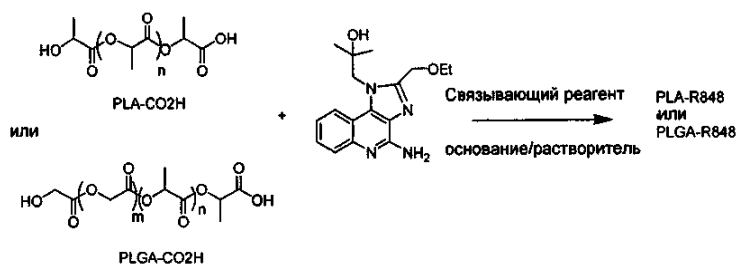


Активирующие реагенты, которые могут быть применены для превращения полимеров или их элементарных звеньев, таких как PLA или PLGA, в активированную ацилированную форму, включают, без ограничения, циануровый фторид, N,N-тетраметилфторформамидингексафторфосфат (TFFH); ацилимидазолы, такие как карбонилдиимидазол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

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

#### Способ 2.

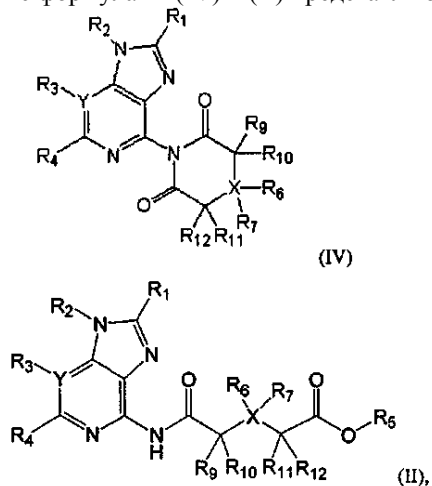
Полимер или его элементарное звено (например, PLA, PLGA, имеющие любой пригодный молекулярный вес) с кислотной концевой группой вступают в реакцию с иммуномодулирующим средством (например, R848) в присутствии активирующего или связывающего реагента, который превращает полимер или его элементарное звено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



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

## Способ 3.

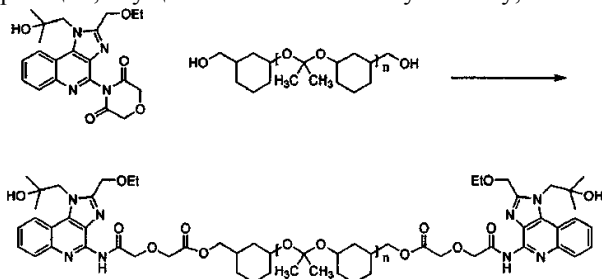
Иммуномодулирующие средства, такие как R848, также могут быть связаны с полимерами или их элементарными звеньями, которые заканчиваются гидроксильной группой. Такие полимеры или их элементарные звенья включают полиэтиленгликоль, полилактид, сополимер полилактида и гликолида, поликапролактон и другие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



где  $R_1 = \text{H}$ , OH, SH,  $\text{NH}_2$  или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино;  $R_2 = \text{H}$ , алкил или замещенный алкил;  $Y = \text{N}$  или C;  $R_3$  отсутствует, если  $Y = \text{N}$ ; или представляет собой H, алкил, замещенный алкил, или объединен с  $R_4$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены, если  $Y = \text{C}$ ;  $R_4$  представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино, если не объединен с  $R_3$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами пиридинового кольца, к которому они присоединены; или объединен с  $R_3$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;  $R_5$  представляет собой полимер или его элементарное звено; X представляет собой C, N, O или S; каждый из  $R_6$  и  $R_7$  независимо представляет собой H или замещен и каждый из  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  и  $R_{12}$  независимо представляет собой H, галоген, OH, тио,  $\text{NH}_2$  или замещенный или незамещенный алкил, арил, гетероцикл, алкокси, арилокси, алкилтио, арилтио, алкиламино или ариламино.

Катализаторы включают, без ограничения, фосфазинные основания, 1,8-дизабиклоундец-7-ен (DBU), 1,4,7-триазабициклодецен (TBD) и N-метил-1,4,7-триазабициклодецен (MTDB). В данной области техники известны и приводятся другие катализаторы, например у Kamber et al., *Organocatalytic Ring-Opening Polymerization*, Chem. Rev., 2007, 107, 58-13-5840. Неограничивающие примеры подходящих растворителей включают метиленхлорид, хлороформ и THF.

Конкретный пример реакции, осуществляемой по такому способу, показан ниже

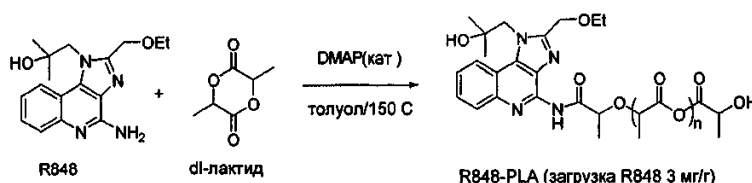


где  $R_5\text{-OH}$  содержит две гидроксильные группы (например, диол,  $\text{HO-R}_5\text{-OH}$ ), каждая из которых функционализована при помощи реакции с имидом, связанным с R848. В некоторых случаях  $\text{HO-R}_5\text{-OH}$  представляет собой полидиол, такой как поли(гексаметилкарбонат)диол или поликапролактондиол.

В вариантах осуществления, в которых задействован полидиол, одну из групп диола можно защитить защитной группой (например, t-бутилоксикарбонил), таким образом полидиолом может быть соединением с формулой  $\text{HO-R}_5\text{-OP}$ , в которой P является защитной группой. После реакции с иммуномодулирующим средством с образованием конъюгата иммуномодулирующего средства- $R_5\text{-OP}$ , причем защитную группу можно удалить и можно ввести в реакцию вторую группу диола с любым подходящим реагентом (например, PLGA, PLA).

## Способ 4.

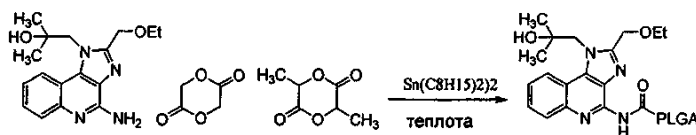
Конъюгат (например, R848-PLA) можно образовать посредством проводимой в одном сосуде полимеризации с раскрытием кольца иммуномодулирующего средства (например, R848) с полимером или его элементарным звеном (например, D/L-лактид) в присутствии катализатора, например, как показано в следующей схеме:



При одностадийной процедуре иммуномодулирующее средство и полимер или его элементарное звено можно объединить в единую реакционную смесь, содержащую катализатор. Реакция может быть объединена при подходящей температуре (например, при приблизительно  $150^\circ\text{C}$ ), а полученный в результате конъюгат может быть выделен с помощью общеизвестных методик. Неограничивающие примеры подходящих катализаторов включают DMAP и этилгексаноат олова.

## Способ 5.

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



Полимеры или их элементарные звенья могут быть сначала объединены и, в некоторых случаях, нагреты (например, до  $135^\circ\text{C}$ ) с образованием раствора. В раствор, содержащий полимеры или их элементарные звенья, может быть добавлено иммуномодулирующее средство с последующим добавлением катализатора (например, этилгексаноата олова). Полученный в результате конъюгат может быть выделен с помощью общеизвестных методик. Неограничивающие примеры подходящих катализаторов включают DMAP и этилгексаноат олова.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть ковалентно связанными с полимерной матрицей. В некоторых вариантах осуществления ковалентное соединение опосредовано линкером. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть нековалентно связаны с полимерной матрицей. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть инкапсулированы внутри, окружены и/или диспергированы по полимерной матрице. Альтернативно или дополнительно, иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть связаны с полимерной матрицей гидрофобными взаимодействиями, взаимодействиями зарядов, силами Ванн-дер-Ваальса и т.д.

Иммуномодулирующие средства могут быть также инкапсулированы в наноносители. Наноносители, таким образом, могут быть из любого материала, чувствительного к pH, при условии, что полученные по данному изобретению синтетические наноносители удовлетворяют приведенным в данном документе соотношениям диссоциаций. Такие синтетические наноносители хорошо известны в данной области техники и включают поликеталевые наноносители, pH-чувствительные липосомы, разбухающие под действием кислоты шитые наночастицы, такие как в Griset et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 2469-2471, которые в своем изначальном состоянии являются гидрофобными, но при клеточной интернализации трансформируются в гидрофильную структуру (гидрогелевая частица), и полимерные наночастицы, такие как в диссертации Griset с названием Delivery of Paclitaxel via pH-Responsive Polymeric Nanoparticles for Prevention of Lung Cancer and Mesothelioma Recurrence, Ohio State University, 2003. pH-чувствительные наноносители также включают такие, которые включают полимеры, которые растворяются при pH ниже 6, полимеры, которые разбухают при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители состоят не из поликеталевого материала. В другом варианте осуществления синтетические наноносители не являются мицеллами.

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

Примеры полимеров, подходящих для применения в данном изобретении, включают, без ограничения, полиэтилены, поликарбонаты (например, поли(1,3-диоксан-2он)), полиангидриды (например, поли(себаценовый ангидрид)), полигидроксикислоты (например, поли( $\beta$ -гидроксиалканоксид)), полипропиленфумераты, поликапролактоны, полиамиды (например, поликапролактон), полиацетали, простые полиэфиры, сложные полиэфиры (например, полилактид, полигликолид), сложные полиэфиры ортокислот, полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины и полисахариды (например, хитозан).

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть модифицированы с помощью липидных или жирно-кислотных групп. В некоторых вариантах осуществления жирно-кислотная группа может быть одной или несколькими из масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой, бегеновой или лигноцеридовой кислот. В некоторых вариантах осуществления жирно-кислотная группа может быть одной или несколькими из пальмитолеиновой, олеиновой, вакценовой, линолевой,  $\alpha$ -линоленовой,  $\gamma$ -линоленовой, арахидоновой, гадолеиновой, арахидоновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой или эруковой кислот.

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

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

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть одним или несколькими акриловыми

полимерами. В определенных вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилаты, 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, полицианакрилаты и комбинации, включающие один или несколько из вышеприведенных 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 быть катионными полимерами. В целом, катионные полимеры могут конденсировать и/или защищать отрицательно заряженные нити нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК или их производных). Аминосодержащие полимеры, такие как поли(лизин) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97 и Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), поли(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), являются положительно заряженными при физиологических значениях pH, образуют ионные пары с нуклеиновыми кислотами и опосредуют трансфекцию в различных клеточных линиях.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть разлагаемыми полиэфирами, несущими катионные боковые цепи (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633 и Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Примеры таких полиэфиров включают сополимер(L-лактида и лизина) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), сложный полиэфир серина (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), сложный полиэфир 4-гидрокси-L-пролина (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658 и Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633) и сложный полиэфир 4-гидрокси-L-пролина (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658 и Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

Свойства этих и других полимеров и способы их получения хорошо известны в данном уровне техники (см., например, патенты США № 6123727, 5804178, 5770417, 5736372, 5716404, 6095148, 5837752, 5902599, 5696175, 5514378, 5512600, 5399665, 5019379, 5010167, 4806621, 4638045 и № 4946929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7 и Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). В целом различные методы синтеза определенных подходящих полимеров описаны в *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386 и в патентах США № 6506577, 6632922, 6686446 и 6818732.

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

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

В некоторых вариантах осуществления синтетические наноносители могут необязательно содержать один или более амфифильных объектов. В некоторых вариантах осуществления амфифильный объект может способствовать получению синтетических наноносителей с повышенной стабильностью, улучшенной однородностью или повышенной вязкостью. В некоторых вариантах осуществления амфифильные объекты могут быть присоединены к внутренней поверхности липидной мембраны (например, липидного бислоя, липидного монослоя и т.д.). Многие амфифильные объекты, известные в данном уровне техники, подходят для применения при создании синтетических наноносителей в соответствии с данным изобретением. Такие амфифильные объекты включают, без ограничения, фосфоглицериды; фосфатидилхолины; дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC); диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE); диолеилксилопропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеилфосфатидилхолин, холестерин, сложные эфиры холестерина; диацилглицерол; диацилглицеролсукцинат; дифосфатидилглицерин (DPPG); гексанодеканол, жирные спирты, такие как полиэтиленгликоль (PEG); полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир,

поверхностно-активные жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота или олеиновая кислота, жирные кислоты, моноглицериды жирных кислот, диглицериды жирных кислот, амиды жирных кислот; сорбитантриолеат (Span®85) гликохолат; сорбитанмонолаурат (Span®20); полисорбат 20 (Tween®20); полисорбат 60 (Tween®60); полисорбат 65 (Tween®65); полисорбат 80 (Tween®80); полисорбат 85 (Tween®85); полиоксиэтилена моностеарат; суфрактин; полоксомер; сорбитановый сложный эфир жирной кислоты, такой как сорбитантриолеат, лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинозитол; сфингомиелин; фосфатидилэтаноламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидная кислота; цереброзиды; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерол; стеариламин; додециламин; гексадециламин, ацетилпальмитат; глицеринрицинолеат; гексадецилстеарат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль)5000-фосфатидилэтаноламин; поли(этиленгликоль)400-моностеарат; фосфолипиды, синтетические и/или природные моющие средства, имеющие высокие поверхностно-активные свойства; деоксихолаты; циклодекстрины; хаотропные соли; средства ионного спаривания, а также их комбинации. Компонентом амфифильного объекта может быть смесь различных амфифильных объектов. Специалистам в данном уровне техники будет понятно, что это - примерный, не являющийся исчерпывающим, перечень веществ с поверхностно-активным действием. Любое амфифильное средство может быть использовано при создании синтетических наноносителей, которые будут применены в соответствии с данным изобретением.

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

Синтетические наноносители могут быть получены с помощью широкого разнообразия способов, известных в данной области техники. Например, синтетические наноносители могут быть сформированы способами, такими как нанопреципитация, потоковая фокусировка с использованием жидкостных каналов, распылительная сушка, испарение растворителя однокомпонентных и двухкомпонентных эмульсий, экстракция растворителем, разделение фаз, размалывание, микроэмульсионные процедуры, микросборка, наносборка, жертвенные слои, простая и комплексная коацервация, и другими способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Альтернативно или дополнительно, описаны синтезы водных и органических растворителей для монодисперсных полупроводниковых, проводящих, магнитных, органических и других наноматериалов (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545 и Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). Дополнительные способы были описаны в литературе (см., например, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; and Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755, и также патенты США № 5578325 и 6007845).

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

Если частицы, полученные любым из указанных выше способов, имеют диапазон размеров за пределами желаемого диапазона, то они могут быть отсортированы по размеру с помощью, например, микрофильтра.

Связывание может быть достигнуто множеством разных способов и может быть ковалентным или нековалентным. Такое связывание может быть организовано, чтобы быть на поверхности или внутри синтетического наноносителя по данному изобретению. Элементы синтетических наноносителей по данному изобретению (такие как части, которые содержит иммуноспецифическая поверхность, части нацеливания, полимерные матрицы и т.п.) могут быть напрямую связаны друг с другом, например, одной или более ковалентными связями или могут быть связаны одним или более линкерами. Дополнительные способы функционализации синтетических наноносителей могут быть адаптированы из опубликованной

патентной заявки США № 2006/0002852, Saltzman et al., опубликованной патентной заявки США № 2009/0028910, DeSimone et al. или опубликованной международной патентной заявки WO/2008/127532 A1, Murthy et al.

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

В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. Чтобы дать лишь несколько примеров, расщепляемые линкеры включают пептидные линкеры, расщепляемые протеазами, нуклеазо-чувствительные линкеры из нуклеиновых кислот, липазо-чувствительные липидные линкеры, гликозидазо-чувствительные углеводные линкеры, pH-чувствительные линкеры, гипоксия-чувствительные линкеры, фото-расщепляемые линкеры, термолабильные линкеры, фермент-расщепляемые линкеры (например, эстеразой расщепляемый линкер), УЗИ-чувствительные линкеры, линкеры, расщепляемые рентгеновскими лучами и т.д. В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым линкером.

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

Могут быть использованы взаимодействия нековалентного специфического связывания. Например, биотином может быть функционализирована или одна частица, или биомолекула, а еще одна функционализирована стрептавидином. Эти две части специфически связываются друг с другом нековалентно и с высокой аффинностью, тем самым связывая частицу и биомолекулу. Аналогичным образом могут быть использованы другие пары специфического связывания. С другой стороны, гистидин-меченые биомолекулы могут быть связаны с частицами, сконъюгированными с никель-нитролотриуксусной кислотой (Ni-NTA).

Дополнительную общую информацию о связывании см. журнал *Bioconjugate Chemistry*, опубликованный Американским химическим обществом, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210; "Cross-Linking," Химическая техническая библиотека Пирса, доступная на веб-сайте Pierce и первоначально опубликованная в 1994-95 гг. в каталоге Pierce и ссылки, цитируемые в них; Wong S.S., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991 и Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, 1996.

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

#### **Фармацевтические композиции и способы применения**

Композиции согласно данному изобретению содержат синтетические наноносители по данному изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями. Композиции могут быть получены с использованием традиционного фармацевтического производства и рецептурных методик для получения пригодных лекарственных форм. В варианте осуществления синтетические наноносители по данному изобретению суспендированы в стерильном физиологическом растворе для инъекций вместе с консервантом.

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

Композиции по данному изобретению могут быть введены различными путями введения, включая, без ограничения, подкожный, внутримышечный, внутрикожный, пероральный, парентеральный, интраназальный, чресслизистый, ректальный; глазной, трансдермальный, чрескожный или посредством ком-

бинации этих путей.

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

### Примеры

Пример 1. Получение активированного полимера.

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

Альтернативно, реакцию можно осуществить в DMF, THF, диоксане или CHCl<sub>3</sub> вместо DCM. DCC можно использовать вместо EDC (получаемую в результате DCC-мочевину отфильтровывают перед осаждением сложного эфира PLA-NHS из простого эфира). Количество EDC или DCC и NHS может варьировать в диапазоне 2-10 экв. PLA.

Таким же образом PLA с iv 0,33 дл/г и кислотным числом 0,11 ммоль/г, или PLGA (резомер RG653H, 65% лактида-35% гликолида, iv: 0,39 дл/г и кислотным числом 0,08 ммоль/г), или PLGA (резомер RG752H, 75% лактида-25% гликолида, iv: 0,19 дл/г и кислотным числом 0,22 ммоль/г) превращают в соответствующий активированный PLA-NHS или PLGA-NHS сложный эфир и хранят в атмосфере аргона в морозилке с температурой ниже -10°C до использования.

Пример 2. Получение активированного полимера.

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

Пример 3. Получение активированного полимера.

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

Пример 4. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

## Пример 5.

Конъюгация иммуномодулирующего средства PLA-NHS (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), DIPEA (0,15 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) и DMAP (25 мг, 0,21 ммоль, 1,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF в атмосфере аргона. Полученный в результате раствор нагревали при 50-60°C в течение 2 дней. Раствор охладили до КТ и добавили к 40 мл деионизированной (DI) воды для осаждения полимерного продукта. Затем полимер промыли DI водой (40 мл) и простым эфиром (2×40 мл) и высушили при 30°C под вакуумом с получением конъюгата PLA-R848 в виде белого пенистого твердого вещества (0,7 г, 20 мг полимера гидролизовали в растворе из 0,2 мл THF, 0,1 мл MeOH и 0,1 мл 15% NaOH). Количество R848 на полимере, как определили, составило приблизительно 35 мг/г согласно обращенно-фазовому ВЭЖХ-анализу (колонка C18, подвижная фаза A: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза B: 0,1% TFA в CH<sub>3</sub>CN, градиент).

## Пример 6. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

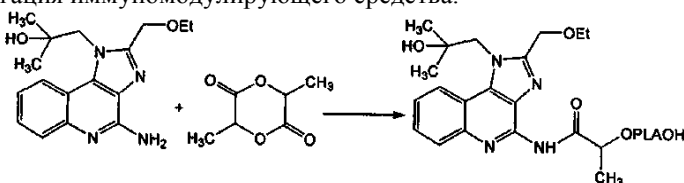
## Пример 7. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

## Пример 8. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

PLA (R202H) (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), EDC (161 мг, 0,84 ммоль, 4,0 экв.), HOBT-H<sub>2</sub>O (65 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.) и DIPEA (0,150 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF. Смесь нагревали при 50-55°C в течение 2 дней. Раствор охладили до комнатной температуры и добавили к воде (40 мл) для осаждения полимерного продукта. Полимер оранжевого цвета растворили в 2 мл DCM и полученный раствор добавили к 40 мл простого эфира для осаждения полимера, который промыли водой/ацетоном (40 мл/2 мл) и простым эфиром (40 мл). После сушки под вакуумом при 30°C требуемый конъюгат PLA-R848 получили в виде грязно-белого пенистого твердого вещества (1,0 г, загрузка R848 на полимере составила приблизительно 45 мг/г на основе ВЭЖХ-анализа и подтверждена <sup>1</sup>H ЯМР). Таким же способом получили PLGA (75% лактида)-R848 и PLGA (50% лактида)-R848.

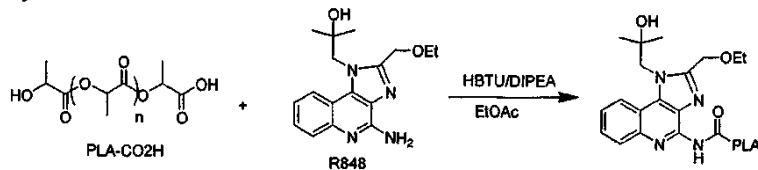
## Пример 9. Конъюгация иммуномодулирующего средства.



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 218 мг,  $6,93 \times 10^{-4}$  моль), D/L лактид (1,0 г,  $6,93 \times 10^{-3}$  моль) и безводный сульфат натрия (800 мг). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре 55°C в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (50 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной ванне, установленной на 120°C, пока весь лактид не растворился, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (19 мг, 15 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили простым эфиром (200 мл) и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением 880 мг неочищенного конъюгата полимолочная кислота-R-848. Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10% метанола в метилхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 702 мг (57,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и их сравнения с инте-

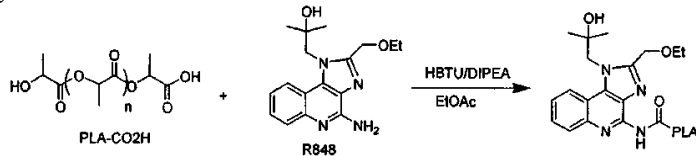
гальной интенсивностью протона CH молочной кислоты было определено, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат содержал менее 5% свободного R848.

Пример 10. Получение конъюгата PLA-R848 с низким МВ.



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

Пример 11. Получение конъюгата PLA-R848 с низким МВ.



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

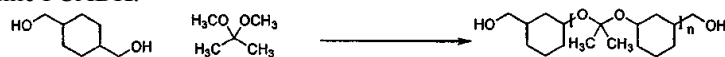
Пример 12. Конъюгирование R848 с PCADK через раскрытие имидного кольца.

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

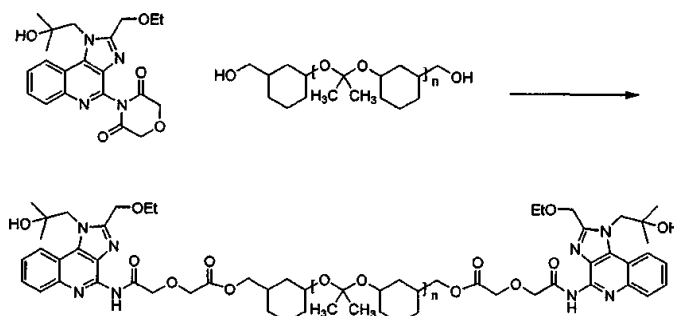
PCADK синтезируют в 50-мл колбе с двумя горлышками, соединенной с короткой дистиляционной головкой. Сначала 5,5 мг перекристаллизованной p-толуолсульфоновой кислоты (0,029 ммоль, Aldrich, Сент-Луис, Миссури) растворяют в 6,82 мл этилацетата и добавляют к 30 мл раствора бензола (поддерживая 100°C), который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

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

## Этап 1. Получение PCADK.



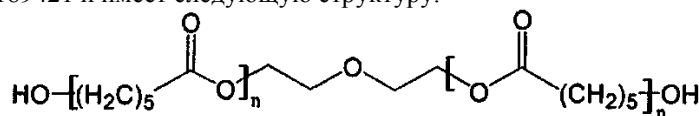
## Этап 2: Конъюгация PCADK к R848



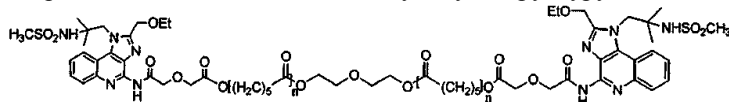
На этапе 2 полимер из этапа 1 (12 г,  $2,0 \times 10^3$  моль) растворяют в 100 мл метиленхлорида и добавляют лактам R848 (3,3 г,  $8,0 \times 10^{-3}$  моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабисцикло-[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,835 г,  $6 \times 10^{-3}$  моль) одной порцией. После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

Пример 13. Конъюгирование R848 с поликапролактондиолом через раскрытие имидного кольца.

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



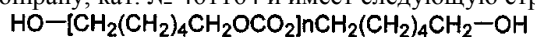
Конъюгат поликапролактондиол-R854 имеет следующую структуру:



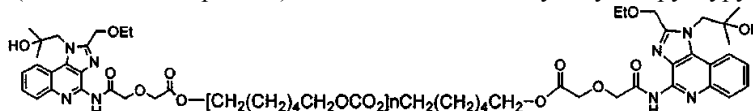
Полимер (5 г,  $2,5 \times 10^3$  моль) растворяют в 25 мл метиленхлорида и добавляют лактам R854 (2,4 г,  $5,0 \times 10^{-3}$  моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабисцикло-[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г,  $4 \times 10^{-3}$  моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной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

Пример 14. Конъюгирование R848 с поли(гексаметиленкарбонат)диолом посредством раскрытия имидного кольца.

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

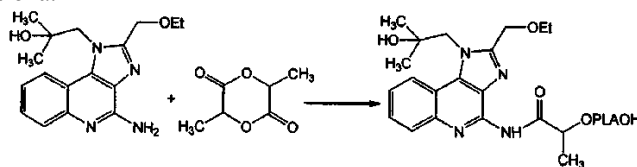


Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-R848 имеет следующую структуру:



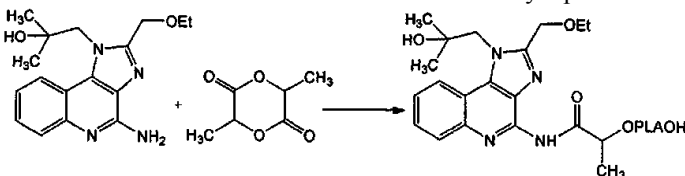
Полимер (5 г,  $2,5 \times 10^3$  моль) растворяют в 25 мл метиленхлорида и добавляют лактам R848 (2,06 г,  $5,0 \times 10^{-3}$  моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабисцикло-[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г,  $4 \times 10^{-3}$  моль) одной порцией. После перемешивания при комнатной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

Пример 15. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина при помощи катализатора на основе этилгексаноата олова.



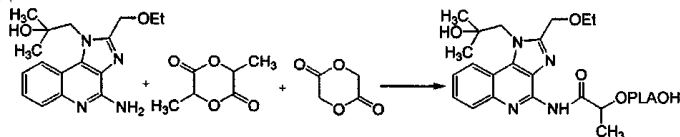
В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин резиквимод (R-848, 100 мг,  $3,18 \times 10^{-4}$  моль), D/L лактид (5,6 г,  $3,89 \times 10^{-2}$  моль) и безводный сульфат натрия (4,0 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре  $50^\circ\text{C}$  в течение 8 ч. Колбу затем продули аргоном и добавили толуол (100 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной бане, установленной на  $120^\circ\text{C}$ , пока весь лактид не растворился, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (75 мг, 60 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения добавили воду (20 мл) и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавили дополнительно толуолом (200 мл) и затем промыли водой (200 мл). Раствор толуола затем промыли по очереди 10% раствором хлорида натрия, содержащего 5% конц. соляной кислоты (200 мл), затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (200 мл). ТСХ (диоксид кремния, 10% метанол в метиленхлориде) показала, что раствор не содержит свободного R-848. Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением 3,59 г конъюгата полимолочная кислота-R-848. Часть полимера гидролизовали основанием и исследовали с помощью ВЭЖХ на предмет содержания R-848. Путем сравнения калибровочной кривой концентрации R-848 относительно ВЭЖХ-отклика установили, что полимер содержал 4,51 мг R-848 на 1 г полимера. Молекулярная масса полимера, определенная с помощью ГПХ, составила приблизительно 19000.

Пример 16. Конъюгаты полимолочной кислоты с низким молекулярным весом и имидазохинолина.



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 218 мг,  $6,93 \times 10^{-4}$  моль), D/L лактид (1,0 г,  $6,93 \times 10^{-3}$  моль) и безводный сульфат натрия (800 мг). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре  $55^\circ\text{C}$  в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (50 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной ванне, установленной на  $120^\circ\text{C}$ , пока весь лактид не растворился, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (19 мг, 15 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили простым эфиром (200 мл) и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением 880 мг неочищенного конъюгата полимолочная кислота-R-848. Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10% метанола в метиленхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 702 мг (57,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и их сравнения с интегральной интенсивностью протона СН молочной кислоты было определено, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат содержал менее 5% свободного R848.

Пример 17. Конъюгаты сополимера гликолевой кислоты и полимолочной кислоты с низким молекулярным весом и имидазохинолина.



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 436 мг,  $1,39 \times 10^{-3}$  моль), гликолид (402 мг,  $3,46 \times 10^{-3}$  моль), D/L лактид (2,0 г,  $1,39 \times 10^{-2}$  моль) и безводный сульфат натрия (1,6 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре  $55^\circ\text{C}$  в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (60 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной бане, установленной на  $120^\circ\text{C}$ , пока не растворился весь R848, гликолид и лактид, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (50 мг, 39 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили этилацетатом (200 мл) и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтро-

вали и выпарили под вакуумом с получением неочищенного конъюгата PLGA-R-848. Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10% метанола в метиленхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 1,55 г (54,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и их сравнения с интегральной интенсивностью протона СН молочной кислоты было определено, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат не содержал поддающийся обнаружению свободный R848.

Пример 18. Конъюгаты полимолочной кислоты и имидазохинолина при помощи катализа на основе диизопропиламида лития.

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

Пример 19. Прикрепление иммуномодулирующего средства к PLA с низким MB.

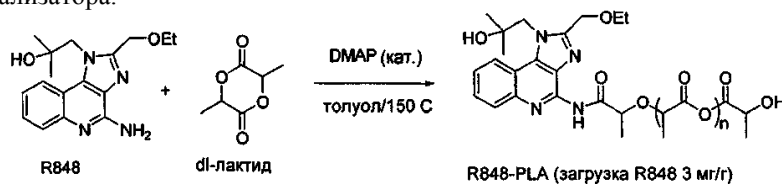
PLA (D/L-полилактид) с MB 5000 (10,5 г, 2,1 ммоль, 1,0 экв.) растворяют в дихлорметане (DCM) (35 мл). Добавляют EDC (2,0 г, 10,5 ммоль, 5 экв.) и NHS (1,2 г, 10,5 ммоль, 5 экв.). Полученный в результате раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 3 дней. Раствор концентрируют для удаления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

Альтернативно, реакцию можно осуществить в DMF, THF, диоксане или  $\text{CHCl}_3$  вместо DCM. DCC можно использовать вместо EDC (получаемую в результате DCC-мочевину отфильтровывают перед осаждением сложного эфира PLA-NHS из простого эфира). Количество EDC или DCC и NHS может варьировать в диапазоне 2-10 экв. PLA.

Пример 20. Прикрепление иммуномодулирующего средства к PLGA с низким MB.

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

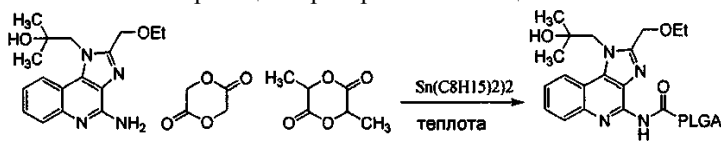
Пример 21. Проводимая в одном сосуде полимеризация с раскрытием кольца R848 с D/L-лактидом в присутствии катализатора.



Смесь из R848 (0,2 ммоль, 63 мг), D/L-лактида (40 ммоль, 5,8 г) и 4-диметиламинопиридина (DMAP) (50 мг, 0,4 ммоль) в 2 мл безводного толуола медленно нагрели до 150°C (температура масляной бани) и поддерживали при этой температуре в течение 18 ч (через 3 ч не осталось R848). Смесь охладили до окружающей температуры и в полученной смеси остановили реакцию водой (50 мл) с осаждением полученного полимера, R848-PLA. Полимер затем промыли последовательно 45 мл каждого из MeOH, iPrOH и этилового простого эфира. Полимер высушили под вакуумом при 30°C с получением грязно-

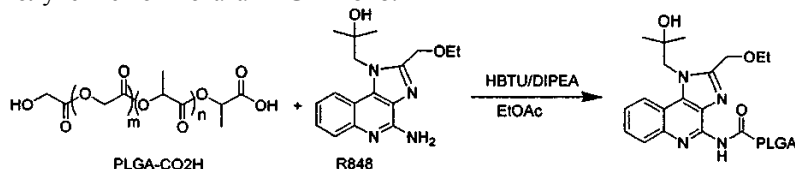
белого рыхлого твердого вещества (5,0 г). Полимерную структуру подтвердили посредством  $^1\text{H}$  ЯМР в  $\text{CDCl}_3$ . Небольшой образец полимера обработали 2Н водным  $\text{NaOH}$  в  $\text{THF}/\text{MeOH}$  для определения загрузки R848 на полимере с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Загрузка R848 составляет 3 мг на 1 г полимера (0,3% загрузка - 27,5% от теории).

Пример 22. Двухэтапная полимеризация с раскрытием кольца R848 с D/L-лактидом и гликолидом.



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

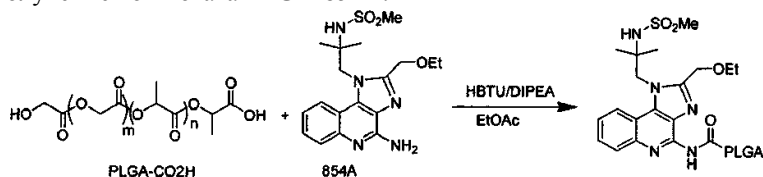
Пример 23. Получение конъюгата PLGA-R848.



Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB  $\sim 5000$ , 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 10 г, 7,0 ммоль) и HBTU (5,3 г, 14 ммоль) в безводном EtOAc (160 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 50 мин. Добавили соединение R848 (2,2 г, 7 ммоль) с последующим диизопропилэтиламино (DIPEA) (5 мл, 28 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при  $50-55^\circ\text{C}$  в течение ночи (приблизительно 16 ч).

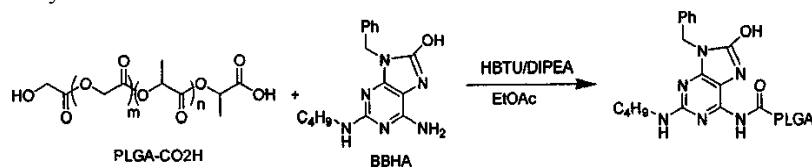
После охлаждения смесь разбавили EtOAc (200 мл) и промыли насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $2 \times 40$  мл), водой (40 мл) и концентрированным соляным раствором (40 мл). Раствор высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (20 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (300 мл) и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA ( $4 \times 50$  мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при  $35-40^\circ\text{C}$  в течение 3 дней в виде белого порошка (10,26 г, MB по ГПХ составляет 5200, загрузка R848 составляет 12% по ВЭЖХ).

Пример 24. Получение конъюгата PLGA-854A.



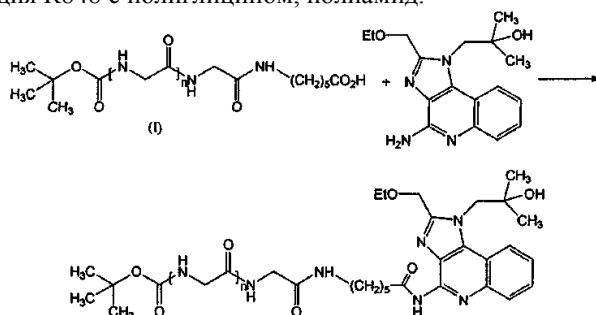
Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB  $\sim 5000$ , 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (20 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 45 мин. Добавили соединение 845A (0,29 г, 0,7 ммоль) с последующим диизопропилэтиламино (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при  $50-55^\circ\text{C}$  в течение ночи (приблизительно 15 ч). После охлаждения смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $2 \times 20$  мл), водой (20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (40 мл) и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA ( $4 \times 25$  мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при  $35-40^\circ\text{C}$  в течение 2 дней в виде белого порошка (1,21 г, MB по ГПХ составляет 4900, загрузка R854A составляет 14% по ВЭЖХ).

## Пример 25. Получение конъюгата PLGA-BBNA.



Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавили соединение BBNA (0,22 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Добавили дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль) и смесь нагревали при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2×20 мл), водой (20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (10 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (35 мл) и коричневатый конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,1 г).

## Пример 26. Конъюгация R848 с полиглицином, полиамид.



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

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

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

## Пример 27. Получение конъюгата PLGA с полимером полиглицин/R848.

## Этап 1.

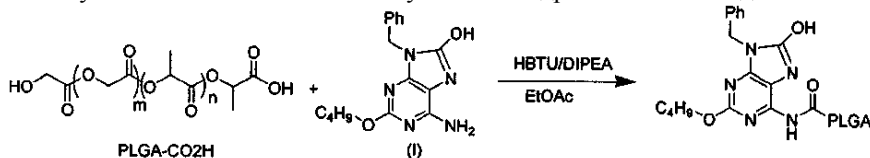
Конъюгат полиглицин/R848, защищенный t-BOC, (5 г) растворяют в трифторуксусной кислоте (25 мл) и этот раствор нагревают при 50°C в течение 1 ч. После охлаждения трифторуксусную кислоту удаляют под вакуумом и остаток растирают в порошок в этилацетате (25 мл). Полимер выделяют фильтрацией и хорошо промывают 2-пропанолом. После сушки под вакуумом получают 4,5 г полимера в виде грязно-белого твердого вещества.

## Этап 2.

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

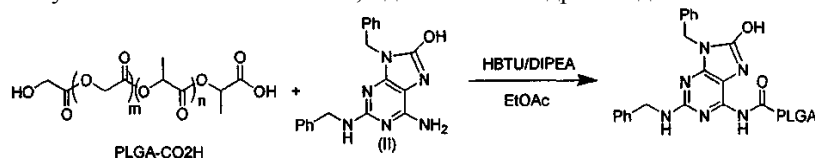
пропанолом (4×50 мл) для удаления остаточных реагентов и высушивают под вакуумом при 35-40°C в течение ночи. Получают 9,8 г (86%) блок-сополимера.

Пример 28. Получение конъюгата PLGA-2-бутокси-8-гидрокси-9-бензиладенин.



Смесь PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавляют соединение (I) (0,22 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч. Добавляют дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль) и смесь нагревают при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавляют EtOAc (100 мл) и промывают насыщенным раствором NH<sub>4</sub>Cl (20 мл), водой (2×20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушивают над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 г) и концентрируют в гелеподобный остаток. Затем добавляют изопропиловый спирт (IPA) (35 мл) и осаждают из раствора коричневатый конъюгат полимера. Затем полимер промывают IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и высушивают под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,0 г).

Пример 29. Получение конъюгата PLGA-2,9-дibenзил-8-гидроксиаденин.



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

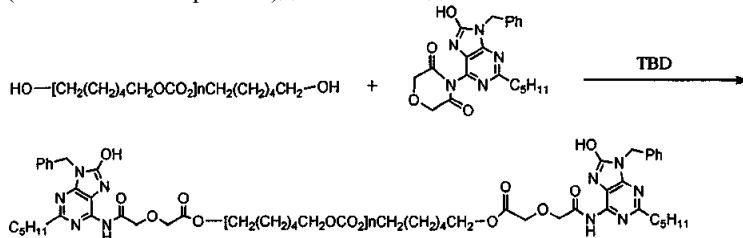
Пример 30. Раскрытие имидного кольца, применяемое для присоединения 2-пентил-8-гидрокси-9-бензиладенина к концевым спиртовым группам поли(гексаметиленкарбонат)диола с молекулярным весом 2000.

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

Поли(гексаметиленкарбонат)диол



Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-8-оксаденин.



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

Пример 31. Конъюгаты никотин-PEG-PLA.

Полимер 3-никотин-PEG-PLA синтезировали следующим образом.

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

Полимер никотин/PEG ( $0,20$  г,  $5,7 \times 10^{-5}$  моль) растворили в сухом тетрагидрофуране ( $10$  мл) в атмосфере азота и перемешивали раствор по мере добавления раствора алюмогидрида лития в тетрагидрофуране ( $1,43$  мл  $2$  М,  $2,85 \times 10^{-3}$  моль). Добавление алюмогидрида лития вызвало осаждение полимера в виде студенистой массы. Реакционную смесь нагрели до  $80^\circ\text{C}$  в медленном потоке азота, позволяя тетрагидрофурану испаряться. Остаток затем нагревали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. После охлаждения осторожно добавили воду ( $0,5$  мл). После того как выделение водорода остановилось, добавили 10% метанол в метиленхлориде ( $50$  мл) и реакционную смесь перемешивали до растворения полимера. Эту смесь отфильтровали через кизельгур (диатомовую землю) марки Celite® (доступна от EMD Inc. как Celite® 545, кат. № CX0574-3) и фильтрат выпарили досуха под вакуумом. Остаток растворили в метиленхлориде ( $4,0$  мл) и этот раствор медленно добавили к диэтиловому эфиру ( $100$  мл). Полимер, отделенный в виде белого хлопьевидного твердого вещества, выделили с помощью центрифугирования. После промывания в диэтиловом эфире твердое вещество высушили под вакуумом. Выход составил  $0,129$  г.

Затем наполнили круглодонную колбу объемом  $100$  мл, оснащенную мешалкой и обратным холодильником, полимером PEG/никотин ( $0,081$  г,  $2,2 \times 10^{-5}$  моль), D/L-лактидом ( $0,410$  г,  $2,85 \times 10^{-3}$  моль) и безводным сульфатом натрия ( $0,380$  г). Смесь сушили под вакуумом при  $55^\circ\text{C}$  в течение 8 ч. Колбу охладили и продули аргоном, а затем добавили сухой толуол ( $10$  мл). Колбу поместили на масляную баню, установленную на  $120^\circ\text{C}$ , и после растворения лактида добавили этилгексаноат олова ( $5,5$  мг,  $1,36 \times 10^{-5}$  моль). Реакцию проводили при  $120^\circ\text{C}$  в течение 16 ч.

После охлаждения до комнатной температуры добавили воду ( $15$  мл) и перемешивание продолжили в течение 30 мин. Добавили метиленхлорид ( $200$  мл) и после встряхивания в делительной воронке фазам позволили осесть. Выделили слой метиленхлорида и высушили над безводным сульфатом магния. После фильтрации для удаления высушивающего средства фильтраты выпарили под вакуумом с получением полимера в виде бесцветной пены. Полимер растворили в тетрагидрофуране ( $10$  мл) и этот раствор медленно добавили в воду ( $150$  мл) при перемешивании. Осажденный полимер выделили с помощью центрифугирования и твердое вещество растворили в метиленхлориде ( $10$  мл). Метиленхлорид удалили под вакуумом, а остаток высушили под вакуумом. Выход полимера 3-никотин-PEG-PLA составил  $0,38$  г.

Пример 32. Состав с синтетическим наноносителем.

Для инкапсулированных составов адьюванта синтезировали резиквимод (также известный как R848) в соответствии с синтезом, приведенным в примере 99 патента США № 5389640 Gerster et al. R848 конъюгировали с PLA вышеприведенным способом и структуру PLA подтвердили ЯМР.

Конъюгат PLA-PEG-никотин получили согласно примеру 31.

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

Вышеприведенные материалы применяли для получения следующих растворов:

- 1) резиквимод (R848)  $10$  мг/мл и PLA  $100$  мг/мл в метиленхлориде или конъюгат PLA-R848  $100$  мг/мл в метиленхлориде,
- 2) PLA-PEG-никотин в метиленхлориде  $100$  мг/мл,
- 3) PLA в метиленхлориде  $100$  мг/мл,
- 4) пептид овальбумина 323-339 в воде  $10$  или  $69$  мг/мл,
- 5) поливиниловый спирт в воде  $50$  мг/мл.

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

Чтобы промыть частицы, часть дисперсии наночастиц ( $7,4$  мл) перенесли в центрифужную пробирку.

ку и крутили при 5300 g 1 ч, супернатант удалили, а осадок ресуспендировали в 7,4 мл фосфатно-соляного буфера. Повторили процедуру центрифугирования и осадок ресуспендировали в 2,2 мл фосфатно-соляного буфера для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

Пример 33. Двойная эмульсия с множеством первичных эмульсий.

Материалы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Раствор 1А. Пептид овальбумина 323-339, 35 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13 N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 1В. Пептид овальбумина 323-339, 70 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13 N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 2А. 0,21-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,21-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 ч. раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 2В. 0,71-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,71-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 ч. раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

Раствор 2С. 0,19-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор приготовили путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,19-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 ч. раствора PLA на каждую часть раствора PLA-

PEG-никотин.

Раствор 3А. Олигонуклеотид (либо PS-1826, либо PO-1826), 200 мг/мл, в очищенной воде. Раствор приготовили путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 4А. Такой же, как и раствор № 2А.

Раствор 4В. Такой же, как и раствор № 2В.

Раствор 4С. Такой же, как и раствор № 2С.

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

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

Третью эмульсию добавили в стакан, содержащий 70 мМ фосфатный буферный раствор (30 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с тем, чтобы позволить испариться метиленхлориду и сформироваться наночастицам. Часть наночастиц промыли путем перенесения суспензии наночастиц в центрифужную пробирку и кручения при 13823g в течение 1 ч, удаления супернатанта и ресуспендирования осадка в фосфатно-соляном буфере. Повторили процедуру промывания и осадок ресуспендировали в фосфатно-соляном буфере для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

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

Пример 34. Стандартная двойная эмульсия.

Материалы.

Как приведено в примере 33 выше.

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

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

Раствор 1А. Пептид овальбумина 323-339, 69 мг/мл, в деионизированной воде. Раствор приготовили путем медленного добавления пептида овальбумина к воде при перемешивании при комнатной температуре.

Раствор 1В. Пептид овальбумина 323-339, 70 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина в 0,13 N растворе соляной кислоты при комнатной температуре.

Раствор 1С. Олигонуклеотид (PS-1826), 50 мг/мл, в очищенной воде. Раствор приготовили путем растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

Раствор 1D. Пептид овальбумина 323-339, 17,5 мг/мл, в разбавленном водном растворе соляной кислоты. Раствор приготовили путем растворения пептида овальбумина, 70 мг/мл, в 0,13 N растворе соляной кислоты при комнатной температуре и затем разведения раствора 3 ч. очищенной воды на 1 ч. исходного раствора.

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

комнатной температуре.

Раствор 2B. PLA-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 2C. PLGA-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 2D. PLA-PEG-R848, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 3A. PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 4A. 0,19-IV PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде приготовили при комнатной температуре.

Раствор 5A. Поливиниловый спирт, 50 мг/мл, в деионизированной воде.

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

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

Двойную эмульсию добавили в стакан с раствором фосфатного буфера (30 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с тем, чтобы позволить испариться метиленхлориду и сформироваться наноносителям. Часть наноносителей промыли путем перенесения суспензии наноносителей в центрифужную пробирку и кручения при 5000-9500 об/мин в течение 1 ч, удаления супернатанта и ресуспендирования осадка в фосфатно-соляном буфере. Повторили процедуру промывания и осадок ресуспендировали в фосфатно-соляном буфере для конечной дисперсии наночастиц приблизительно 10 мг/мл.

Пример 35. Определение количества средств.

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

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

Способ для CpG.

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

Способ для аналога никотина.

Аналог никотина измеряли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100, оснащенной XBridge C-18 Waters (5-мкм частица, 100×4,6 мм внутренний диаметр, температура колонки 400°C) с применением подвижной фазы А (МРА) 95% воды/5% ацетонитрила/0,1% TFA и подвижной фазы В (МРВ) 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA (градиент: колонку уравнивали при 5% В, повышали до 45% В за 14 мин. Затем постепенно повышали до 95% В от 14 до 20 мин. Концентрацию подвижной фазы В быстро понизили обратно до 5% и повторно уравнивали до конца способа. Скорость потока способа поддерживали при 0,5 мл/мин с общим временем цикла 25 мин. Суспензию NC центрифугировали при 14000 об/мин в течение приблизительно 15-30 мин в зависимости от размера частиц. Собранные осадки обрабатывали 200 мкл концентр.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (8 М) в течение 2 ч при покачивании до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. 200 мкл 1% TFA добавили для нейтрализации раствора смеси, что дало общий объем раствора осадка 200 мкл. Аликвоту 50 мкл раствора разбавили МРА (или водой) до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества, присутствовавшего в осадках.

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

Инкапсулированный CpG в наноносителе.

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

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

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

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

1,5 мл суспензии NC осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение приблизительно 15 мин, осадки гидролизовали с помощью 150 мкл концентрированного  $\text{NH}_4\text{OH}$  (8 М) в течение приблизительно 2-3 ч до тех пор, пока раствор не становится прозрачным. К смеси осадков добавили 150 мкл 2% TFA (водн.) для нейтрализации раствора. Аликвоту 100 мкл смеси развели 200 мкл воды и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанной выше, и определили количество на основе калибровочной кривой, построенной при помощи предшественника (PEG-никотин) PLA-PEG-никотина, применяемого в производстве.

Пример 36. Тестирование скорости высвобождения.

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

Аналитический способ.

Высвобожденное количество R848 и ova пептида измеряют при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на системе Agilent 1100 при  $\lambda=215$  нм, оснащенной колонкой Zorbax SB-C18 Agilent (3,5 мкм, 75×4,6 мм. Температура колонки=40°C (кат. номер 866953-902)) с использованием подвижной фазы А (МРА) 98% воды/2% ацетонитрила/0,1% TFA и подвижной фазы В (МРВ) 90% ацетонитрила/10% воды/0,09% TFA (с градиентом: В=5-45% за 7 мин; постепенно до 95% В до 9 мин; повторно уравнивали до конца. Время цикла - 13 мин. Поток=1 мл/мин).

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

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

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

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

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

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

Для измерений в моменты времени: 9×200 мкл каждого из образцов добавили в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированного), центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин и удалили супернатанты. Остаточные NP затем ресуспендировали в 500 мкл цитратного буфера и поместили в 37°C термостат. В следующие моменты времени: 24, 48, 96 и 144 ч (для конъюгированного R848)

или 2, 16 и 24 ч (для неконъюгированного (инкапсулированного) R848), образцы центрифугировали и проанализировали на предмет количества высвобожденных R848 и пептида ova, как описано выше для образца T0.

Для установления баланса масс из вышеуказанных измерений в PBS и цитратном буфере оставшиеся осадки (только образцы конъюгированного R848) из каждого образца обработали 200 мкл конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (8 М) в течение 3 ч с перемешиванием. После осаждения смеси добавили 200 мкл 1% TFA с доведением общего объема осадка до 400 мкл. Аликвоту 50 мкл раствора развели МРА до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества R848 и пептида ova, которые остались в осадке после высвобождения *in vitro* для сведения баланса масс. Для неконъюгированных образцов разводят образец посредством TFA в ацетонитриле и анализируют, как описано выше для R848 и пептида.

Результаты подытожены на фиг. 1-3.

Материалы и способ.

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

Колонка - Zorbax SB-C18 Agilent, 3,5 мкм. 75×4,6 мм (кат. C18 предколонка).

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

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

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

Время цикла - 13 мин. Поток=1 мл/мин.

PBS - 100 mM, pH 7,4.

Цитратный буфер - 100 mM, pH 4,5.

Термостат.

Микроцентрифуга - Galaxy 16.

Микроцентрифужные пробирки.

Ультразвуковой аппарат.

Пипетки - 20, 200, 1000 мкл, регулируемые.

Вода класса "для ВЭЖХ" - EMD - №WX0008-1.

$\text{NH}_4\text{OH}$  - ~8М. Mallinkrodt.

TFA, 0,2%. Пригот.

TFA, 1%. Пригот.

Термометр.

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

Таблица 2

Оценочные R848 и пептид ova в синтетических наноносителях

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

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

Таблица 3

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

Процедура.

1) Пригот. образца T=0.

a. PBS.

i. Взять 200 мкл аликвоту из каждого образца. Центрифугировать на микроцентрифуге при 14000 об/мин. Удалить супернатант.

ii. Развести 100>200 мкл супернатанта в МРА (DF=2).

iii. Проанализировать пептид и R848.

b. Цитрат.

i. Взять 200-мкл аликвоту из каждого образца. Центрифугировать на микроцентрифуге при 6000 об/мин в течение 20 мин. Удалить супернатант.

ii. Добавить 200 мкл цитратного буфера и тщательно ресуспендировать.

iii. Центрифугировать на микроцентрифуге при 14000 об/мин в течение 15 мин. Удалить супернатант.

iv. Развести 100>200 мкл супернатанта в МРА (DF=2).

v. Проанализировать пептид и R848.

2) PBS IVR.

a. Добавить 9×200 мкл каждого из образцов в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных).

b. К каждой аликвоте добавить 300 мкл 37°C PBS.

c. Образцы сразу поместить в 37°C термостат.

3) Цитрат IVR.

a. Добавить 9×200 мкл каждого из образцов в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных).

b. Центрифугировать 20 мин при 6000 об/мин.

c. Удалить супернатанты.

d. В каждую пробирку добавить 500 мкл цитратного буфера и тщательно ресуспендировать.

e. Образцы поместить в 37°C термостат.

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

a. Конъюгированные.

i. 24 ч.

ii. 48 ч (2 суток).

iii. 96 ч (4 суток).

iv. 144 ч (6 суток).

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

b. Неконъюгированные.

i. 2 ч.

ii. 16 ч.

iii. 24 ч.

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

a) PBS.

i. 24 ч.

ii. 48 ч (2 суток).

iii. 96 ч (4 суток).

iv. 144 ч (6 суток).

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

b. Цитрат.

i. 2 ч.

ii. 16 ч.

iii. 24 ч.

iv. 48 ч (2 суток).

v. 72 ч (3 суток).

vi. 96 ч (4 суток).

vii. 120 ч (5 суток).

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

6) Забор образца следующим образом.

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

b) Удалить супернатант.

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

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

Для сведения баланса масс выполнить следующее.

8) К оставшимся осадкам (только конъюгированным) добавить 200 мкл  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

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

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

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

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

13) Для неконъюгированных партий проанализировать пептид и R848 посредством обычного способа  $\text{AcN/TFA}$ .

Пример 37. Тестирование скорости высвобождения.

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

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

Измерение скорости высвобождения *in vitro* в PBS (pH 7,4) 1 мл суспензии NC в PBS центрифугировали при 14000 об/мин в микроцентрифужных пробирках, в основном от 15 до 30 мин, в зависимости от размера частиц. Собранный супернатант затем развели равным объемом подвижной фазы А (МРА) или водой и проанализировали на обращенно-фазовой ВЭЖХ на предмет количества R848, высвобожденного при хранении. Оставшийся осадок ресуспендировали до однородной суспензии в 1 мл PBS и поместили в термокамеру при 37°C с постоянным легким помешиванием.

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

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

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

Применили 100-мМ буфер на основе цитрата натрия (pH 4,5) для замены исходного раствора для хранения NC (например, PBS) вместо PBS-буфера, pH 7,4. Для того чтобы свести баланс масс из вышеприведенных измерений в PBS и цитратном буфере, оставшиеся осадки от каждого момента времени обработали 100 мкл  $\text{NH}_4\text{OH}$  (8 М) в течение 2 ч (или дольше) при перемешивании до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. 100 мкл 1% TFA добавили для нейтрализации смеси, что дало общий объем раствора осадка 200 мкл. Аликвоту 50 мкл смеси развели МРА (или водой) до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества невысвобожденного R848, который остался в осадке после высвобождения *in vitro* для сведения баланса масс. Для неконъюгированных образцов образец разводят TFA в ацетонитриле и анализируют, как описано выше для R848.

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

Пример 38. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих адъювант CpG.

Группы из пяти мышей иммунизировали три раза (подкожно, в задние конечности) с 2-недельными интервалами (дни 0, 14 и 28) посредством 100 мкг NC-Nic. NC-Nic представлял собой композицию наноносителей с находящимся на внешней поверхности никотином и для всех групп мышей, за исключением

группы 1, транспортирующей адъювант CpG-1826 (тиоатированный), который высвобождался из наноносителей с различными скоростями. Наноносители получали в соответствии с приведенным выше способом. Затем измерили антитела к никотину сыворотки крови на 26 и 40 дни.  $EC_{50}$  для антител к никотину, как измерено в стандартном ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 4.

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

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

Пример 39. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих две формы адъюванта CpG.

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

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

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

Пример 40. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих R848.

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

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

Результаты, показанные на фиг. 6, демонстрируют, что адъювант R848 (агонист TLR 7/8), содержащийся в NC, увеличивает гуморальный иммунный ответ на связанный с NC антиген (группы 2-5>>группа 1). Более того, ни быстрое (группа 2), ни медленное (группа 5) высвобождение R848 не по-

вышло иммунный ответ до такого же уровня, как NC, высвобождавшие R848 со средней скоростью (группа 3≈группа 4>группа 2≈группа 5).

Пример 41. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих удерживаемый PO CpG.

Группы из пяти мышей иммунизировали трижды (подкожно, в задние конечности) с 2-недельными интервалами (дни 0, 14 и 28) посредством 100 мкг NC-Nic (наночастицы с никотином на внешней поверхности) с удерживаемым PO-CpG или не содержащими удерживаемый PO-CpG, смешанные со свободным PO-CpG. Синтетические наночастицы получали в соответствии с приведенными выше способами. Затем в обеих группах измерили антитела к никотину сыворотки крови на 26 и 40 дни.  $EC_{50}$  для антител к никотину, как определено стандартным ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 7.

Мышей группы 1 иммунизировали посредством NC-Nic с инкапсулированными 1826 PO-CpG и вспомогательным пептидом МНС-II из овальбумина (Ov-II) (6,6% PO-CpG; 2,3% Ov-II). Мышей группы 2 иммунизировали посредством NC-Nic с 0,7% удерживаемого Ov-II, смешанными с 20 мкг свободного 1826 PO-CpG.

Эксперимент демонстрирует, что удержание PO-CpG в наночастице (NC) вызывает гуморальный иммунный ответ, который превосходил индуцированный ответ при смешивании 3-кратно более высокой дозы свободного PO-CpG с NC без удерживаемого PO-CpG (титр антител в группе 1>титра антител в группе 2).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа, содержащая синтетические наночастицы, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наночастицей посредством связывания внутри синтетического наночастицы; где связывание является pH-чувствительным и иммуномодулирующее средство диссоциирует от синтетического наночастицы согласно следующему соотношению:

$$IArel(4,5)_{24\%}/IArel(7,4)_{24\%}\geq 1,2;$$

где  $IArel(4,5)_{24\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наночастице при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наночастиц;

$IArel(7,4)_{24\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наночастице при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наночастиц.

2. Композиция по п.1, где иммуномодулирующее средство инкапсулировано в синтетическом наночастице и/или включает лабильное иммуномодулирующее средство, например имидазохинолин, производное аденина или олигонуклеотид, которые включают 5'-CG-3', где C метилирован и где олигонуклеотид включает остов, включающий один или несколько нестабилизированных межнуклеотидных связей; и/или является адъювантом.

3. Композиция по п.2, где имидазохинолин включает имидазохинолиновый амин, имидазопиридиновый амин, 6,7-конденсированный циклоалкилимидазопиридиновый амин, имидазохинолиновый амин, имиквимод или резиквимод.

4. Композиция по п.2, где адъювант включает универсальный T-клеточный антиген, агонист Toll-подобного рецептора (TLR), например агонист TLR 3, агонист TLR 7, агонист TLR 8, агонист TLR 7/8 или агонист TLR 9, или иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, например иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК.

5. Композиция по п.4, где иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой CpG-содержащую иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, которая включает одну или несколько стабилизирующих химических модификаций, чья функция - стабилизировать остов в физиологических условиях.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где остов олигонуклеотида (а) не включает стабилизирующие химические модификации, чья функция - стабилизировать остов в физиологических условиях; и, необязательно, (b) включает остов, который не модифицирован включением фосфоротиоатных стабилизирующих химических модификаций.

7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где синтетические наночастицы дополнительно включают (а) B-клеточный антиген и/или T-клеточный антиген; и/или (b) элемент нацеливания на

антигенпрезентирующую клетку (APC); и/или (с) один или несколько биоразлагаемых полимеров; и/или (d) наночастицы на основе липидов, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка, наночастицы, которые содержат комбинацию наноматериалов, сфероидальные наночастицы, кубические наночастицы, пирамидальные наночастицы, вытянутые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы.

8. Композиция по п.7, где биоразлагаемый полимер включает поли(лактид), поли(гликолид) или сополимер(лактида и гликолида), где, необязательно, биоразлагаемые полимеры имеют средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, который определяется с помощью гель-проникающей хроматографии.

9. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа, содержащая синтетические наночастицы, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наночастицей посредством связывания внутри синтетического наночастицы; где связывание является рН-чувствительным и иммуномодулирующее средство отделяется от синтетического наночастицы согласно следующему соотношению:

$$IA(4,5)_{24}/IA(4,5)_6 \geq 1,2;$$

где  $IA(4,5)_{24}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 24 ч, взятый как среднее среди образцов синтетических наночастиц;

$IA(4,5)_6$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 6 ч, взятый как среднее из образцов синтетических наночастиц, где, необязательно, иммуномодулирующее средство включает лабильное иммуномодулирующее средство, инкапсулированное в синтетическом наночастице, и лабильное иммуномодулирующее средство является, например, таким, как определено в любом из пп.2, 3 и 6.

10. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа, содержащая синтетические наночастицы, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наночастицей посредством связывания внутри синтетического наночастицы; где связывание является рН-чувствительным и иммуномодулирующее средство отделяется от синтетического наночастицы согласно следующему соотношению:

$$6 \leq IA(4,5)_{24}/IA(4,5)_6 \leq 1,2;$$

где  $IA(4,5)_{24}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 24 ч, взятый как среднее из образцов синтетических наночастиц;

$IA(4,5)_6$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 6 ч, взятый как среднее из образцов синтетических наночастиц, где, необязательно, иммуномодулирующее средство включает лабильное иммуномодулирующее средство, инкапсулированное в синтетическом наночастице, и лабильное иммуномодулирующее средство является, например, таким, как определено в любом из пп.2, 3 и 6.

11. Композиция по п.9 или 10, где (а) иммуномодулирующее средство является таким, как определено в любом из пп.2, 4 и 5, и/или (b) синтетический наночастица является таким, как определено в любом из пп.7, 8.

12. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый эксципиент.

13. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа, содержащая вакцину, которая включает композицию по любому из предшествующих пунктов.

14. Применение композиции по любому из предшествующих пунктов в способе лечения или профилактики рака, инфекционного заболевания, неаутоиммунного нарушения обмена веществ, дегенеративного заболевания или привыкания.

15. Применение композиции по любому из пп.1-13 в способе индукции или усиления иммунного ответа.

16. Способ индукции или усиления иммунного ответа, включающий определение, что иммуномодулирующие средства, связанные с синтетическими наночастицами, диссоциируют от синтетических наночастиц согласно следующему соотношению:

$$IArel(4,5)_{24}\% / IArel(7,4)_{24}\% \geq 1,2;$$

где  $IArel(4,5)_{24}\%$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наночастице при воздействии на синтетический наночастица водной средой *in vitro* при рН 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди

образцов синтетических наноносителей;

$I_{Arel}(7,4)_{24\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей;

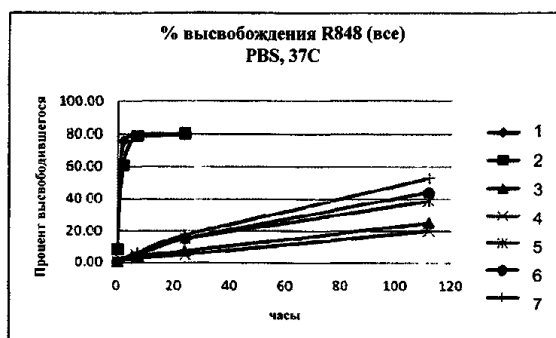
введение синтетических наноносителей субъекту.

17. Способ индукции или усиления иммунного ответа, включающий введение иммуномодулирующих средств субъекту, где иммуномодулирующие средства связаны с синтетическими наноносителями и определены как диссоциирующие от синтетических наноносителей согласно следующему соотношению:

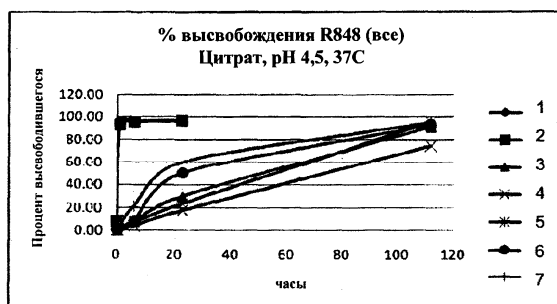
$$I_{Arel}(4,5)_{24\%} / I_{Arel}(7,4)_{24\%} \geq 1,2;$$

где  $I_{Arel}(4,5)_{24\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей;

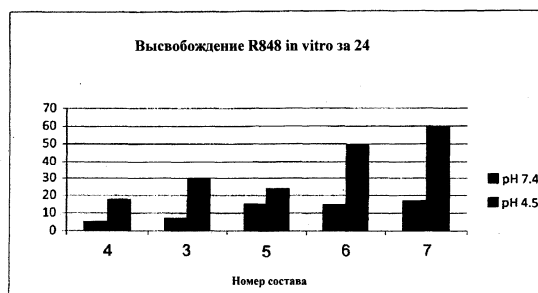
$I_{Arel}(7,4)_{24\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, деленный на сумму: вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 7,4 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей.



Фиг. 1



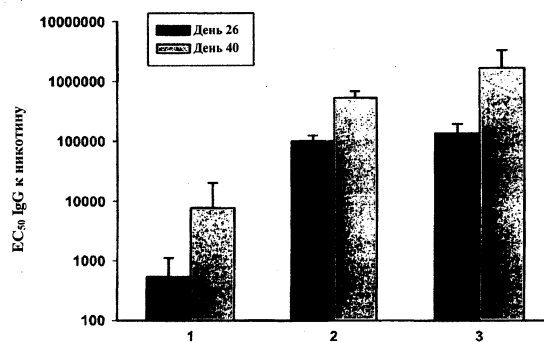
Фиг. 2



\* Высвобождение при pH 4.5 было выше для каждого из вышеприведенных составов

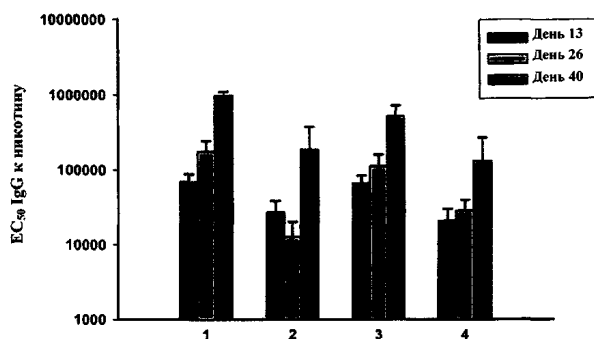
Фиг. 3

Индукция антител с помощью NC  $\pm$  CpG с различными скоростями высвобождения CpG



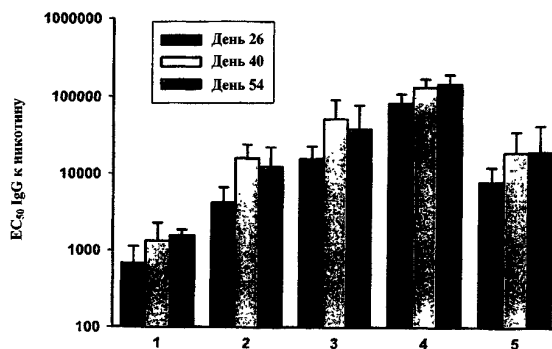
Фиг. 4

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



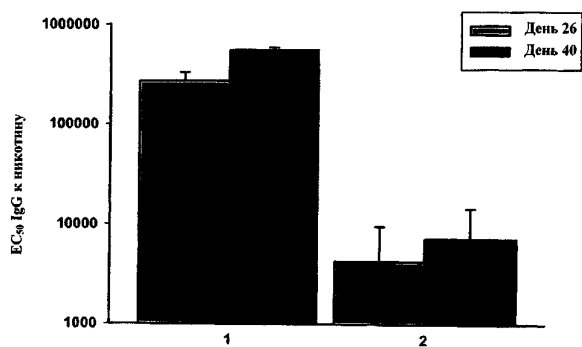
Фиг. 5

Индукция антител с помощью NC, высвобождающих R848 с различными скоростями



Фиг. 6

Антитело к никотину после иммунизации посредством NC-Nic/(PO-CpG)



Фиг. 7

высвобождение CpG

Партия	Цитрат, pH 4,5			PBS, pH 7,5	
	Время (часы)	Высв. (мкг/мг NP)	Высв. (% загрузки)	Высв. (мкг/мг NP)	Высв. (% загрузки)
PO-CpG	-1	0,54	1,21%	0,54	1,21%
	0	3,87	8,7%	0,27	0,6%
	2	6,72	15,1%	0,68	1,1%
	6	10,14	22,8%	0,90	1,5%
	24	15,14	34,1%	1,44	3,2%
	72				
	168				
	336				

Фиг. 8

