



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/385 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2015101758, 21.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.06.2013

Дата регистрации:
10.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.06.2012 US 61/662,687

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2016 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 10.10.2018 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.01.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/047079 (21.06.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/192532 (27.12.2013)

Адрес для переписки:
123242, Москва, Кудринская площадь, 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры-патентные
поверенные"

(72) Автор(ы):

ШЕЙ Лонни Д. (US),
ЯП Джонатан Вун Тек (US),
МИЛЛЕР Стивен Д. (US),
МАККАРТИ Деррик (US),
ГЕТТЗ Даниэль Р. (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОРСВЕСТЕРН ЮНИВЕРСИТИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2379028 C2, 20.01.2010. WO
2011133617 A1, 27.10.2011. US 7829113,
09.11.2009. BATTAGLIA M et al. Rapamycin
and interleukin-10 treatment induces T
regulatory type 1 cells that mediate antigen-
specific transplantation tolerance//Diabetes.
2006 Jan;55(1):40-9. CHAUHAN AS et al.
Unexpected in vivo anti-inflammatory activity
observed for simple, (см. прод.)

(54) ЧАСТИЦЫ, КОНЪЮГИРОВАННЫЕ С ПЕПТИДАМИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно иммунологии, и может быть использована для лечения иммунологических нарушений. Толерогенная композиция по изобретению содержит полистирольную несущую частицу, карбоксилированную полистирольную несущую частицу, несущую частицу сополимера молочной и гликолевой кислот или карбоксилированную несущую частицу сополимера молочной и гликолевой кислот, причем указанная частица

обладает отрицательным дзета-потенциалом и содержит инкапсулированный антиген. Способ по изобретению включает введение субъекту эффективного количества толерогенной композиции. Использование изобретений позволяет усилить антиген-специфическую толерантность у субъекта за счет ее стимуляции отрицательно заряженными частицами сополимера молочной и гликолевой кислот. 2 н. и 23 з.п. ф-лы, 39 ил., 1 табл., 22 пр.

(56) (продолжение):

surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers//Biomacromolecules. 2009 May 11;10(5):1195-202.
doi: 10.1021/bm9000298.

R U 2 6 6 9 3 4 6 C 2

R U 2 6 6 9 3 4 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/385 (2018.05)(21)(22) Application: **2015101758, 21.06.2013**(24) Effective date for property rights:
21.06.2013Registration date:
10.10.2018

Priority:

(30) Convention priority:
21.06.2012 US 61/662,687(43) Application published: **20.08.2016** Bull. № 23(45) Date of publication: **10.10.2018** Bull. № 28(85) Commencement of national phase: **21.01.2015**(86) PCT application:
US 2013/047079 (21.06.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/192532 (27.12.2013)

Mail address:

**123242, Moskva, Kudrinskaya ploshchad, 1, a/ya
35, "Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery-patentnye
poverennyye"**

(72) Inventor(s):

**SHEA, Lonnie D. (US),
YAP, Jonathan Woon Teck (US),
MILLER, Stephen D. (US),
MCCARTHY, Derrick (US),
GETTS, Daniel R. (US)**

(73) Proprietor(s):

NORTHWESTERN UNIVERSITY (US)(54) **PEPTIDE CONJUGATED PARTICLES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely immunology and can be used for treating immunological disturbances. According to the invention tolerogenic composition comprises polystyrene carrier particle, carboxylated polystyrene carrier particle, carrier particle of lactic and glycolic acids copolymer or a carboxylated carrier particle of lactic and glycolic acids copolymer, wherein this

particle has a negative zeta potential and contains an encapsulated antigen. According to the invention the method comprises administering to the subject an effective amount of a tolerogenic composition.

EFFECT: use of inventions allows strengthening the antigen-specific tolerance in a subject by its stimulation with negatively charged particles of the lactic and glycolic acids copolymer.

25 cl, 39 dwg, 1 tbl, 22 ex

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США сер. No.61/662,687, поданной 21 июня 2012 года, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ ПОДДЕРЖКА

Настоящее изобретение было выполнено при поддержке правительственного гранта R01 EB013198, присужденного Национальными институтами здравоохранения.

Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Воспалительные заболевания и нарушения - это состояния, в этиологию или тяжесть которых вносят свой вклад отклонения или в иных случаях дерегуляция воспалительного ответа. Примеры включают аутоиммунные заболевания, такие как сахарный диабет 1-го типа и целиакия.

Многие из этих заболеваний отличаются инфильтрацией мононуклеарными клетками в зоне повреждения ткани или другого поражения. Примеры мононуклеарных клеток, которые наблюдались в этих инфильтратах, включают лимфоциты, особенно Т-лимфоциты, и клетки системы мононуклеарных фагоцитов (клетки СМФ), такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, микроглиальные клетки и другие.

Предполагается, что многие из наблюдаемых клеток в инфильтратах мононуклеарных клеток играют некоторую роль в этих патологических воспалительных реакциях.

Например, при заболеваниях, таких как рассеянный склероз, CD4⁺Т-клетки, как известно, играют центральную роль в развитии патологического аутоиммунного ответа. На более ранней стадии в процессе активации Т-клеток дендритные клетки и другие клетки

СМФ могут отвечать за активацию CD4⁺Т-клеток. Клетки СМФ также могут вносить вклад в процесс воспаления посредством фагоцитоза, хотя по меньшей мере при некоторых воспалительных заболеваниях, непонятно, будут ли такие клетки способны на это в отсутствие CD4⁺Т-клеток.

Моноциты периферической крови можно отнести к одной из двух групп по экспрессии или отсутствию экспрессии определенных молекул клеточной поверхности. В частности, подразумевается, что человеческие “резидентные моноциты” или “зрелые моноциты” обладают фенотипом CD14^{lo}CD16⁺ (мышиним аналогом является CX₃CR1^{hi}CCR2⁻Gr1⁻). Подразумевается, что другая группа клеток, “воспалительные моноциты” или “незрелые моноциты”, обладают фенотипом CD14⁺CD16⁻ (мышиним аналогом является CX₃CR1^{lo}CCR2⁺Gr1⁺) (Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19: 71-82).

Важно отметить, что тогда как последние считаются “воспалительными” в том смысле, что наблюдается их миграция к очагу воспаления в ткани из пула клеток костномозгового происхождения, присутствующих в периферической крови, не было показано, что эти клетки вызывают воспаление - ни непосредственно, ни посредством действия других клеток. Дополнительно, не было показано, чтобы различные клетки СМФ, которые могут образовываться при дифференцировке этих клеток, также вызывали воспаление.

Традиционные клинические стратегии, направленные на общую длительную иммуносупрессию, при нарушениях, ассоциированных с нежелательным иммунным ответом, основаны на длительном введении иммунодепрессивных лекарственных средств широкого спектра действия, например, блокаторов сигнала 1, таких как циклоспорин А (CsA), FK506 (такролимус) и кортикостероиды. Длительное

использование высоких доз этих лекарственных средств может вызывать токсичные побочные эффекты. Более того, даже в случае тех пациентов, которые характеризуются переносимостью этих лекарственных средств, потребность в пожизненной иммуносупрессивной лекарственной терапии несет значительный риск развития побочных эффектов, включая злокачественные опухоли, тяжелые инфекции, нефротоксичность и метаболические нарушения.

Были разработаны способы индукции антиген-специфической толерантности, включающие связывание клеток с антигеном или пептидом. Например, в одном способе выработка толерантности путем введения клеток со связанным пептидом включала забор, разделение и обработку клеток периферической крови антигенами, специфическими для конкретного заболевания, и сопрягающим реагентом, этиленкарбодиимидом (ECDI), в стерильных условиях и последующую реинфузию донору/пациенту. Этот способ является затратным и должен осуществляться в тщательно контролируемых условиях квалифицированными практикующими врачами, а количество центров, в которых может проводиться данная процедура, ограничено. Использование эритроцитов в качестве клеток донорского типа расширяет спектр потенциальных источников с включением аллогенных доноров, таким образом, очень сильно увеличивая возможность заготовки клеток и потенциально расширяя возможность проведения этой терапии в любом медицинском учреждении, которое имеет лицензию на осуществление переливания крови. Эти подходы накладывают значительные ограничения в части, касающейся заготовки клеток и необходимости в определении тканевой совместимости для минимизации иммунного ответа на донорские клетки. В дополнение к местной обработке клеток связывание аутоантигенов посредством EDCI создает много проблем, связанных с контролем качества. Кроме того, эти подходы также требуют по меньшей мере некоторых знаний об антигене, который является причиной заболевания и в отношении которого проводится исследование иммунологической толерантности.

Недавно были описаны частицы, связанные с пептидом, которые исключают необходимость в заготовке клеток и позволяют избежать необходимости иммунотипирования ткани, что характерно для подходов известного уровня техники, см. WO 2010/085509, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Однако эти подходы, тем не менее, основаны на антиген-специфической иммунологической толерантности.

Антиген-специфическая толерантность, в целом, не идеальный вариант, поскольку для человеческих заболеваний, в целом, неизвестны специфические антигены/эпитопы. Кроме того, антигены могут варьировать от субъекта к субъекту, следовательно, для того чтобы подход, основанный на использовании специфического антигена, был эффективным, было бы необходимо определить, какие антигены могут распознаваться клетками каждого отдельного пациента, или это потребовало бы связывания библиотеки потенциальных пептидов с частицами до введения. Синтез и отдельное связывание этих пептидов требует многих и временных, и финансовых затрат. Следовательно, существует необходимость в терапии, которая бы позволила решить обе эти проблемы, тем самым устраняя необходимость в получении источника клеток, иммуносовместимых с тканью, и в то же самое время, устраняя необходимость в синтезе и связывании большого количества пептидов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены композиции (например, для индукции антиген-специфической толерантности),

содержащие несущую частицу (например, частицу PLG), соединенную с антигенным пептидом. В определенных вариантах реализации изобретения несущая частица представляет собой частицу сополимера лактида и гликолида (PLG).

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены композиции, содержащие: антиген, связанный с несущей частицей с отрицательным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации изобретения дзета-потенциал частицы составляет от приблизительно -100 мВ до приблизительно 0 мВ. В определенных вариантах реализации изобретения дзета-потенциал частицы составляет от приблизительно -50 мВ до приблизительно -40 мВ. В определенных вариантах реализации изобретения частица представляет собой сополимер, имеющий молярное соотношение от приблизительно 80:20 до приблизительно 100:0. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение сополимеров может составлять, но без ограничения, полистирол:поли(винилкарбоксилат)/80:20, полистирол:поли(винилкарбоксилат)/90:10, поли(винилкарбоксилат):полистирол/80:20, поли(винилкарбоксилат):полистирол/90:10, полимолочная кислота: полигликолиевая кислота/80:20 или полимолочная кислота: полигликолиевая кислота/90:10. В еще одних вариантах реализации изобретения частица представляет собой полистирольную частицу, карбоксилированную полистирольную частицу или частицу сополимера молочной и гликолевой кислот. В определенных вариантах реализации изобретения частица представляет собой частицу сополимера молочной и гликолевой кислот.

В определенных вариантах реализации изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 10 мкм. В определенных вариантах реализации изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,3 мкм до приблизительно 5 мкм. В определенных вариантах реализации изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,5 мкм до приблизительно 3 мкм. В определенных вариантах реализации изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,5 мкм до приблизительно 1 мкм. В определенных вариантах реализации изобретения частица имеет диаметр приблизительно 0,5 мкм.

В дополнительных вариантах реализации изобретения антиген содержит по меньшей мере некоторую часть аутоиммунного антигена, антигена, экспрессируемого на ткани, которая подлежит трансплантации субъекту, или аллергена. В определенных вариантах реализации изобретения антиген содержит по меньшей мере некоторую часть основного белка миелина, ацетилхолинового рецептора, эндогенного антигена, миелин-олигодендроцитарного гликопротеина, антигена бета-клеток антигена поджелудочной железы, инсулина, глутаматдекарбоксилазы (ГДК), коллагена 11-го типа, gp39 человеческого хряща, fp130-RAPS, протеолипидного белка, фибриллярина, малого ядрышкового белка, рецептора тиреотропного гормона, гистонов, гликопротеина gp70, дигидролипоацетилтрансферазы (PCD-E2) пируватдегидрогеназного комплекса, антигена волосяного фолликула, А-глиадина и изоформы 5 человеческого тропомиозина, пыльцы гречки заметной (BaGP), аллергена персика Pru p 3, аллергена молока альфа-s1-казеина, аллергена сельдерея ApiG1, аллергена бразильского ореха Bere1, аллергена В-лактоглобулина молока, бычьего сывороточного альбумина, аллергена Cor a 1.04 фундука или аллергена яичного овальбумина.

В дополнительных вариантах реализации изобретения антиген содержит аутоиммунный антиген, антиген, экспрессируемый на ткани, которая подлежит трансплантации субъекту, или аллерген. В вариантах реализации изобретения, не ограничивающих объем изобретения, антиген содержит, например, основной белок миелина, ацетилхолиновый рецептор, эндогенный антиген, миелин-олигодендроцитарный

гликопротеин, антиген бета-клеток поджелудочной железы, инсулин, глутаматдекарбоксилазу (ГДК), коллаген 11-го типа, gp39 человеческого хряща, fp130-RAPS, протеолипидный белок, фибриллярин, малый ядрышковый белок, рецептор тиреотропного гормона, гистоны, гликопротеин gp70,

5 диэдриполиаамидацетилтрансферазу (PCD-E2) пируватдегидрогеназного комплекса, антиген волосяного фолликула, А-глиадин или изоформу 5 человеческого тропомиозина, пыльцу гречки заметной (BaGP), аллерген персика Pru p 3, аллерген молока альфа-s1-казеин, аллерген сельдерея Apig1, аллерген бразильского ореха Bere1, аллерген В-лактоглобулина молока, бычий сывороточный альбумин, аллерген Cor a 1.04 фундука
10 или аллерген яичного овальбумина.

В определенных вариантах реализации изобретения антиген связан с указанной частицей посредством конъюгирующей молекулы. В определенных вариантах реализации изобретения антиген связан с указанной частицей посредством линкера. В определенных вариантах реализации изобретения конъюгирующая молекула представляет собой
15 этиленкарбодииимид (ECDI). В определенных вариантах реализации изобретения антиген связан с внешней поверхностью частицы с отрицательным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации изобретения антиген инкапсулирован в частицу, которая обладает отрицательным поверхностным дзета-потенциалом.

В определенных вариантах реализации изобретения частица является биоразлагаемой.
20 В определенных вариантах реализации изобретения частица поверхностно-функционализированной. В определенных вариантах реализации изобретения частица функционализирована путем карбоксилирования поверхности.

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы индукции у субъекта антиген-специфической толерантности, включающие: введение
25 указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей частицу, связанную с антигеном, указанному субъекту, причем указанная частица обладает отрицательным дзета-потенциалом, и причем указанная частица и антиген индуцируют толерантность к указанному антигену у указанного субъекта. В определенных вариантах реализации изобретения введение осуществляют с целью лечения или предотвращения
30 заболевания или состояния. В определенных вариантах реализации изобретения введение осуществляют до или после начала заболевания или состояния, которое вызывает указанный антиген. В определенных вариантах реализации изобретения заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, аллергии, отторжения трансплантата и гипериммунного
35 ответа. В определенных вариантах реализации изобретения заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: рассеянного склероза, сахарного диабета 1-го типа, астмы, пищевой аллергии, аллергии на антигены окружающей среды, целиакии и состояния, вызванного указанным антигеном у указанного субъекта, для уменьшения чрезмерной реакции на указанный антиген. В определенных вариантах реализации
40 изобретения способы дополнительно включают повторение указанного введения указанной композиции указанному субъекту.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят внутривенно.

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения дополнительно предложен способ получения иммуномодифицирующей частицы с отрицательным дзета-
45 потенциалом, причем указанный способ включает: осуществление контакта предшественника иммуномодифицирующей частицы с буферным раствором в условиях, обеспечивающих эффективное образование иммуномодифицирующей частицы с отрицательным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации изобретения

предшественник иммуномодифицирующей частицы получают путем сополимеризации. В определенных вариантах реализации изобретения буферный раствор имеет щелочной рН. В определенных вариантах реализации изобретения буферный раствор представляет собой раствор на основе бикарбоната натрия, бикарбоната калия, бикарбоната лития, дигидроортофосфата калия, дигидрофосфата натрия или дигидрофосфата лития.

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая антиген, инкапсулированный в ядре поверхностно-функционализированной липосомы. В дополнительном варианте реализации изобретения липосома состоит из фосфатидилхолина:фосфатидилглицерина:холестерина в соотношении 30:30:40. Еще в одном дополнительном варианте реализации изобретения указанный антиген содержит аутоиммунный антиген, антиген, экспрессируемый на ткани, которая подлежит трансплантации субъекту, или аллерген.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 показан (А) микроснимок частицы сополимера лактида и гликолида (PLG). На Фигурах В и С показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета $2,5 \times 10^5$ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида различалась на 5-15% на партию, но, в целом, имела Z-средний диаметр 567 нм, максимальный диаметр 670 нм и коэффициент полидисперсности 0,209.

На Фигуре 2 показано, что наночастицы PLG индуцируют антиген-специфическую толерантность. Иммунодоминантный эпитоп протеолипидного белка PLP₁₃₉₋₁₅₁ (PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁) был использован с целью индукции толерантности для предотвращения рецидивирующего экспериментального аутоиммунного энцефалита (Р-ЭАЭ). Мышей обрабатывали либо PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA (N=5), либо неконъюгированным PLGA (N=5) на день -7 относительно времени иммунизации (день 0). Пик заболевания, как правило, наблюдался в промежутке между днями 12-14, и мышей оценивали по балльной шкале на предмет клинического проявления заболевания. Частицы без пептида или модифицированные с помощью контрольного пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉ не предотвращали индукцию заболевания. Однако с помощью частиц PLGA, модифицированных с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁, был получен клинический показатель, равный 0 (полное отсутствие заболевания) во всех случаях за исключением низких клинических показателей меньше 1, отмеченных в промежутке между днями 20 и 30.

На Фигуре 3 показано, что тип вводимой частицы оказывает влияние на развитие ЭАЭ в модели на мышах. А) показан средний клинический показатель и В) показан средний совокупный показатель для животных, больных ЭАЭ. Мышей обрабатывали либо OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLS (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{PHOSPOREX} (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{РЕМА} (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLA (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA_{PHOSPOREX} (N=5), либо PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG_{РЕМА} (N=5) на день -7 относительно времени иммунизации (день 0). Пик заболевания, как правило, наблюдался в промежутке между днями 12-14, и мышей оценивали по балльной шкале на предмет клинического проявления заболевания. Частицы любого состава, которые были модифицированы с помощью контрольного пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉, не предотвращали индукцию заболевания. Однако гранулы PLG, связанные с PLP₁₃₉₋₁₅₁, более эффективно подавляли индукцию Р-ЭАЭ, чем коммерческие гранулы PLG

(Phosphorex), связанные с PLP₁₃₉₋₁₅₁, или полистирольные гранулы.

На Фигуре 4 показано, что у тех мышей, которые были обработаны растворимым OVA, на день 28 отмечалось снижение температуры по сравнению с теми животными, которые были обработаны частицей OVA-PLG. Никакого снижения температуры тела не наблюдалось в течение 1 часа после доставки частицы.

На Фигуре 5 показано, что введение PLP-PLG на протяжении ремиссии не приводит ни к какой смертности, ассоциированной с анафилактической реакцией. ЭАЭ был индуцирован у самок мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель путем подкожной инъекции PLP₁₃₉₋₁₅₁ в CFA, и за развитием клинических проявлений заболевания производилось наблюдение, и регистрировались данные (B). На 21-й день относительно индукции заболевания мышам производили внутривенные инъекции растворимого PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники без заливки), растворимого OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги без заливки) или этих же пептидов, связанных с наночастицами PLG (маркеры с заливкой). Температуру животных контролировали и регистрировали каждые 10 минут в течение 1 часа после инъекции (A).

На Фигуре 6 показан оптимальный режим дозирования PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, вводимого внутривенно за семь дней до индукции заболевания. Развитие клинического проявления заболевания определяли по сравнению с мышами SJL/J, обработанными OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG (A). Самкам мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель производили внутривенные инъекции наночастиц PLG, связанных либо с PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольник), либо OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круг). ЭАЭ был индуцирован путем подкожной инъекции PLP₁₃₉₋₁₅₁ в CFA через 7 дней (B), через 25 дней (C) или через 50 дней (D). Животные из панели B находились под наблюдением на предмет клинического проявления заболевания в течение 100 дней. На 8-й день относительно индукции заболевания вызывали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в подгруппе мышей, показанных на панели B (E). Выбранным репрезентативным животным, предварительно иммунизированным PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA, из групп, представленных на панели B (OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG и PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG), вводили в ухо служивший для предварительной иммунизации эпитоп PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA и контрольный пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLP₁₃₉₋₁₅₁. В качестве показателя ГЗТ через 24 часа оценивали отек уха, и вычитали данные, полученные по ответам до стимуляции. Самкам мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель производили внутривенные инъекции наночастиц PLG, связанных с PLP₁₇₈₋₁₉₁ (треугольник), OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круг) или PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольник), или несвязанных частиц в чистом виде (круг без заливки) (F). ЭАЭ был индуцирован через 7 дней путем подкожной инъекции PLP₁₇₈₋₁₉₁ в CFA, и за ходом развития заболевания наблюдали в показанные временные точки.

На Фигуре 7A-D показано, что профилактическая толерантность является наиболее эффективной, когда частицы PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ вводят либо внутривенно, либо внутрибрюшинно. У животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, вводимых внутривенно, не развивалось заболевание, и имелись средние клинические показатели на уровне 0 в случае большинства временных точек.

На Фигуре 8A-F показано, введение частиц OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG ингибировало ответы Th1 и Th17 у обработанных животных.

На Фигуре 9A-C показано снижение уровня инфильтрации иммунными клетками

внутренней области спинного мозга животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, которое было более характерным для нативной ткани, чем для ткани животных, обработанных OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. Клетки животных, обработанных OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG, позитивно окрашивались на CD45, CD4 и CD11b; тогда как клетки животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, минимально окрашивались на эти факторы.

На Фигуре 10А-С показано, что введение частиц PLP₁₃₉₋₁₅₁PLG ингибирует нарушение проницаемости гематоэнцефалитического барьера (ГЭБ) и активацию макрофагов в спинном мозге обработанных мышей. Животных обрабатывали либо полным адьювантом Фрейнда (CFA), частицами OVA₃₂₃₋₃₃₉PLG, либо частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁PLG. Были определены клинические показатели и частота возникновения ЭАЭ в процентах (В), а наблюдение за состоянием спинного мозга проводили посредством визуализации *in vivo* (А и С).

На Фигуре 11А и В показан спинной мозг обработанных мышей посредством визуализации *in vivo*. С-Д представляют собой графики, на которых показаны результаты количественной оценки данных изображений.

На Фигуре 12 показано, что введение частиц PLG, в которые был инкапсулирован PLP₁₃₉₋₁₅₁, ингибирует индукцию Р-ЭАЭ у мышей. Возможность инкапсулировать аутоантигены позволяет использовать сложные смеси белков или даже гомогенатов органов, что не представляется возможным при поверхностном связывании, позволяя охватить больший спектр антигенов и, таким образом, более эффективно решить проблемы, связанные с распространением эпитопов.

На Фигуре 13 показано, что животные, обработанные частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG и антителом к CD25, продемонстрировали временами больший средний клинический показатель, чем те животные, которые были обработаны частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁PLG и контрольным антителом IgG.

На Фигуре 14 показано, что терапевтическая толерантность была индуцирована частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG при активном и адоптивном ЭАЭ. Адоптивный ЭАЭ был индуцирован у самок мышей линии SJL/J в возрасте восьми недель путем адоптивного переноса $2,5 \times 10^6$ бластных клеток, активированных PLP₁₃₉₋₁₅₁. Мышам производили внутривенные инъекции пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники) или OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги), связанного с 500 нм наночастицами PLG, через 2 дня (А) или 14 дней (С) после индукции заболевания. Клинические показатели заболевания сравнивали с показателями, полученными после обработки с использованием спленоцитов, связанных с антигенами (А). На 42-й день выделяли головной и спинной мозг мышей, у которых вырабатывали толерантность с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁ или OVA₃₂₃₋₃₃₉ для гистологического анализа. Срезы головного мозга мышей из панели А были окрашены на белок PLP и CD45 (В). Срезы спинного мозга мышей из панели (С) были окрашены Luxol Fast Blue (D). Области демиелинизации и клеточной инфильтрации обозначены стрелками.

На Фигуре 15 показаны графики, на которых изображены средние клинические показатели для мышей с активным ЭАЭ и адоптивным ЭАЭ после обработки либо частицами SP, либо частицами PLG, конъюгированными с OVA₃₂₃₋₃₃₉ или PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Мышам производили внутривенные инъекции PLP₁₃₉₋₁₅₁-SP, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG или OVA₃₂₃₋₃₃₉-SP, или пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉ – PLG, связанного с 500 нм наночастицами, через 10 дней (А) или 2 дня (В) после индукции заболевания, и определяли средний клинический

показатель. В обоих случаях введение частиц PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG приводило к индукции толерантности у мышей.

На Фигуре 16 показано, что инфильтрация иммунными клетками центральной нервной системы также резко уменьшается у мышей, у которых вырабатывали толерантность с использованием PLP-PLG. Мышам SJL/J производили внутривенные инъекции 500 нм наночастиц PLG, связанных с PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники) или OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги), через 2 дня после индукции ЭАЭ путем адоптивного переноса. На пике заболевания (14-й день) выделяли головной и спинной мозг, и с использованием проточной цитометрии определяли количество лимфоцитов (В), АПК (С), клеток микроглии (D), периферических дендритных клеток (Е), миелоидных дендритных клеток (F) и макрофагов (G). Результаты, полученные с применением метода гейтинга, изображены на (А). Препараты клеток ЦНС обрабатывали с использованием РМА и иономицина в течение 5 часов до внутриклеточного окрашивания на ИЛ-17А и ИФН-γ (Н).

На Фигуре 17 показано, что введение пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁, инкапсулированного в частицу PLG, индуцирует толерантность, когда частицу вводят с ФСБ. Однако введение антитела к PD-1 уменьшает эту толерантность.

На Фигуре 18 показано, что введение пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁, инкапсулированного в частицу PLG, индуцирует толерантность, когда частицу вводят с ФСБ. Введение антитела к CD40 уменьшает эту толерантность, но это уменьшение толерантности восстанавливается за счет добавления антитела к ИЛ-12.

На Фигуре 19А-Г показано, что профилактическое введение OVA-PLG уменьшало секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 и снижало уровни сывороточного IgE к OVA и эозинофилов в легком.

На Фигуре 20 показано, что OVA, инкапсулированный в частицы PLG, профилактически ингибирует *in vitro* OVA-специфические ответные иммунные реакции в медиастинальных лимфатических узлах. Пролиферация лимфатических узлов, наблюдаемая после повторной стимуляции с использованием 25 мкг OVA, уменьшается у тех животных, которые были обработаны OVA-PLG (А). Более того, обработка OVA-PLG уменьшает высвобождение цитокинов после повторной стимуляции с использованием OVA. Уровни ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 уменьшаются у мышей, обработанных OVA-PLG (В).

На Фигуре 21 показано, что терапевтическое введение OVA-PLG уменьшало секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 и снижало уровни сывороточного IgE к OVA и эозинофилов в легком.

На Фигуре 22 показано, что OVA, инкапсулированный в частицы PLG, оказывает терапевтический эффект посредством большего снижения содержания OVA-специфических Th2-цитокинов в жидкости БАЛ, чем частицы PLG, связанные с OVA. Мышам вводили внутрибрюшинно OVA/Alum в дозе 10 мкг/мышь на день 0 и 14-й день. Мышам внутривенно вводили либо OVA, связанный с частицами PLG, либо OVA, инкапсулированный в частицы PLG, на 28-й и 42-й день. В промежутке между днями 56-58 мышей обрабатывали три раза с использованием OVA в форме аэрозоля. На графиках изображены результаты по секреции цитокинов, когда животные были обработаны либо OVA, связанным с частицами PLG (А), либо OVA, инкапсулированным в частицах PLG (В).

На Фигуре 23 показаны уровни глюкозы в крови животных, больных сахарным диабетом 1-го типа, после обработки частицами р31-PLG. Введение частиц PLG,

связанных с пептидом р31, приводило к снижению уровней глюкозы в крови по сравнению с уровнями, наблюдаемыми после введения частиц, связанных с пептидом MOG₃₅₋₅₅ (А и В). Процент клеток, секретирующих ИФН-γ, наблюдаемый у животных, также снижался у мышей, обработанных р31-PLG, по сравнению мышами, обработанными с использованием пептида MOG₃₅₋₅₅-PLG (С).

На Фигуре 24А-В показано, что толерантность, индуцируемая р31-PLG, требует наличия Treg-клеток. Сахарный диабет 1-го типа был индуцирован у мышей путем адоптивного переноса. Через два часа после переноса активированных клеток мышам NOD.SCID, у данных мышей вызывали толерантность либо с использованием частиц р31-PLG, либо частиц PLG MOG₃₅₋₅₅. Деплеция Treg-клеток отменяет индукцию толерантности, вызванной путем введения частиц р31-PLG.

На Фигуре 25 показано, что введение связанных с инсулином частиц PLG значительно увеличивало процентное соотношение мышей, у которых не развивался сахарный диабет в течение 300 дней (69,6% по сравнению с 22,7%; $p=0,0027$). Мышей NOD в возрасте 6, 8 и 10 недель обрабатывали с использованием частиц PLG, связанных либо с БСА (N=22), либо с инсулином (N=23), посредством внутривенного введения. Затем у мышей оценивали развитие сахарного диабета.

На Фигуре 26 показано процентное содержание донорских CD45.1 клеток, наблюдаемое у мышей-реципиентов. У самок CD45.2 мышей на день -7 вызывали толерантность с использованием либо OVA-PLG, либо Dby-PLG. На день -1 мышей облучали с использованием дозы 200 рад, затем им трансплантировали 1×10^6 , 5×10^6 или 1×10^7 клеток костного мозга, взятых у самцов CD45.1 мышей на день 0. У мышей-реципиентов затем вызывали толерантность с использованием либо OVA-PLG, Dby-SP, либо Dby-PLG на 1-й день, и производили забор крови для анализа химеризма с использованием FACS.

На Фигуре 27 показано процентное содержание донорских CD45.1 клеток у мышей-реципиентов после толеризации либо с использованием OVA-PLG, Dby-SP, либо Dby-PLG на 1-й день. У одной мыши положительного контроля не отмечалось выраженное приживление трансплантируемых клеток (~10%). У всех мышей отрицательного контроля донорские клетки не приживались. У одной мыши Dby-SP не отмечалось выраженное приживление трансплантируемых клеток (~10%). У двоих мышей донорские клетки приживались (~10%): у одной мыши произошло полное отторжение трансплантата к 1-й неделе. У одной мыши началось отторжение на 12-ю неделю и составляло 10% клеток к 16-й неделе. В группе Dby-PLG уровень приживления клеток к 16-й неделе изменялся в диапазоне 10%-56%. У мышей OVA-PLG отмечалось: 1) спонтанное приживление трансплантируемых клеток, 2) гомология между последовательностью OVA323 и Dby или 3) толерогенные свойства частиц. Dby-PLG обеспечивает более полное приживление трансплантируемых клеток, чем Dby-SP и OVA-PLG.

На Фигуре 28 показано, что толерантность, индуцированная в заданное время, оказывает влияние на процент приживления CD45.1 клеток у мышей-реципиентов. В случае положительных контролей отмечался более низкий уровень приживления клеток (~4%), чем ожидалось (~10%). У одной мыши отрицательного контроля уровень приживления трансплантируемых клеток составлял 5% из всех 3 групп, получающих OVA-PLG, у одной мыши в группе с выработкой толерантности на День -7-й День+1 отмечалось приживление трансплантируемых клеток (12%). Выработка толерантности, на день 1 имеет большее клиническое значение, чем выработка толерантности, на день

-7.

На Фигуре 29 показано, что частицы PLGA, меченые кумарином-6, которые либо были сопряжены с антигеном, либо не содержали антигена, были детектируемыми через 3 часа после введения, а не через 24 часа после введения. Частицы были детектируемыми через 3 часа после введения, а не через 24 часа после введения. Нативная мышь (верхняя строка), которой не производили инъекции, по сравнению со срезами селезенки (левый столбец), печени (средний столбец) и легкого (правый столбец) мышей, которым производили внутривенную инъекцию флуоресцентной частицы PLGA/PEMA, через 3 часа после инъекции (средняя строка) и через 24 часа (нижняя строка) после инъекции, контрастное окрашивание DAPI.

На Фигуре 30 показано, что через 6 и 15 часов частицы PLGA локализовались в F4/80⁺ клетках в печени.

На Фигуре 31 показано, что макрофаги маргинальной зоны преимущественно поглощают TAMRA-меченные PLP₁₃₉₋₁₅₁-связанные частицы через 24 часа после внутривенного введения. Наиболее высокое процентное содержание PLP₁₃₉₋₁₅₁+клеток представлено макрофагами маргинальной зоны.

На Фигуре 32 изображен среднесуточный клинический показатель против количества дней предварительной иммунизации PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. Развитие Р-ЭАЭ, вызванного введением PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA, ингибируется у мышей линии SJL/J за счет индукции иммунологической толерантности с использованием поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁.

На Фигуре 33 показано, что мыши, обработанные инкапсулированным OVA-PLG, характеризовались наибольшим снижением накопления эозинофилов.

На Фигуре 34 показано, что мыши, обработанные инкапсулированным OVA-PLG, характеризовались наибольшим снижением уровня сывороточного IgE по сравнению с необработанными животными или обработанными с использованием контроля животными.

На Фигуре 35 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁, с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 1,792 x 10⁵ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела Z-средний диаметр, равный 584 нм, максимальный диаметр, равный 679 нм, и коэффициент полидисперсности, равный 0,162. Эти результаты соответствуют 6 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 36 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁, посредством измерения ζ-потенциала. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 6,67 x 10⁴ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела пиковый ζ-потенциал, равный -48,9 мВ и ζ-отклонение, равное 5,14 мВ. Эти результаты соответствуют 6 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 37 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин, с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 1,822 x 10⁵ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела Z-средний диаметр, равный 569,7 нм, максимальный диаметр, равный 700,3 нм и коэффициент полидисперсности, равный 0,230 нм. Эти результаты соответствуют 3 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 38 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин, посредством измерения ζ-потенциала. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 2,67 x 10⁴ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела пиковый ζ-потенциал, равный -52,2 мВ, и отклонение ζ, равное 5,38 мВ. Эти результаты соответствуют 3 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 39 показан график, демонстрирующий, что поверхностно-функционализированные липосомы, в ядрах которых содержится растворимый пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁, индуцируют иммунологическую толерантность в модели рассеянного склероза на мышцах. Животных обрабатывали либо поверхностно-функционализированными липосомами, в ядрах которых содержался растворимый пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁ (круги), либо поверхностно-функционализированными липосомами, содержащими растворимый пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉ (прямоугольники). Средние клинические показатели, полученные для животных, получающих липосомы, содержащие пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁, были ниже показателей животных, получающих липосомы, содержащие пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что наночастицы, связанные с антигеном, могут индуцировать толерантность к аутоиммунному заболеванию и уменьшать иммунный ответ. Эти частицы могут индуцировать толерантность независимо от того, связаны ли они с поверхностью частицы или инкапсулированы в частицах. Эти частицы, следовательно, можно использовать при лечении любого заболевания или состояния, характеризующегося избыточным воспалительным иммунным ответом, характерным для аутоиммунных заболеваний.

“Частица” в данном контексте обозначает любой состав нетканевого происхождения, в качестве которого может выступать сфера или сферическая частица, гранула или липосома. Термин “частица”, термин “иммуномодифицирующая частица”, термин “несущая частица” и термин “гранула” могут быть использованы взаимозаменяемо в зависимости от контекста. В дополнение к этому, термин “частица” может быть использован для характеристики гранул и сфер.

“Отрицательно заряженная частица” в данном контексте обозначает частицы, которые были модифицированы таким образом, чтобы их суммарный поверхностный заряд был меньше нуля.

“Карбоксилированные частицы” или “карбоксилированные гранулы” или “карбоксилированные сферы” включает любую частицу, которую модифицировали

таким образом, чтобы она содержала карбоксильные группы на ее поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения присоединение карбоксильной группы способствует повышению поглощения частиц фагоцитами/моноцитами из кровяного русла, например, посредством взаимодействия со скэвенджер-рецепторами, такими как MARCO. Карбоксилирование частиц может быть достигнуто с использованием любого соединения, которое способствует присоединению карбоксильных групп, включая, но без ограничений, сополимер этилена и малеинового ангидрида (РЕМА).

“Антигенная группа” в данном контексте обозначает любую группу, например, пептид, который распознается иммунной системой хозяев. Примеры антигенных групп включают, но без ограничений, аутоантигены и/или бактериальные или вирусные белки, пептиды или компоненты. Не ограничиваясь теорией, тогда как карбоксилированные гранулы сами по себе могут распознаваться иммунной системой, карбоксилированные гранулы, к которым больше ничего не присоединено, не считаются “антигенной группой” в соответствии с целями изобретения.

“Голые гранулы” или “голые частицы” или “голые сферы” в данном контексте обозначают гранулы, частицы или сферы, которые не подвергались карбоксилированию.

“Провоспалительные медиаторы” или “провоспалительные полипептиды” в данном контексте обозначают полипептиды или их фрагменты, которые индуцируют, поддерживают или продлевают воспаление у субъекта. Примеры провоспалительных медиаторов включают, но без ограничений, цитокины и хемокины.

Частица может иметь любую форму или конформацию. Однако в определенных вариантах реализации предпочтительно использовать частицы, которые с меньшей вероятностью будут агрегировать *in vivo*. В качестве примеров частиц в пределах объема этих вариантов реализации изобретения выступают частицы, которые имеют сферическую форму.

Другой аспект изобретения относится к композиции, которая содержит иммуномодифицирующую частицу, имеющую отрицательный дзета-потенциал и не содержащую антигенных групп. В дополнительном варианте реализации изобретения предложены композиции, содержащие иммуномодифицирующую частицу с отрицательным дзета-потенциалом, связанную с антигеном. В дополнительном варианте реализации изобретения антиген связан с внешней поверхностью частицы. Еще в одном дополнительном варианте реализации изобретения антиген инкапсулирован в частицы.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения иммуномодифицирующей частицы с отрицательным дзета-потенциалом и не содержащей антигенных групп. Способ включает осуществление контакта предшественника иммуномодифицирующей частицы с буферным раствором в условиях, обеспечивающих эффективное образование иммуномодифицирующей частицы с отрицательным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации данного изобретения предшественник иммуномодифицирующей частицы образуется посредством сополимеризации. Микроструктура частицы может зависеть от способа сополимеризации.

В определенных вариантах реализации изобретения молекула антигенного пептида связана с несущей частицей (например, иммуномодифицирующей частицей) посредством конъюгирующей молекулы и/или линкерной группы. В определенных вариантах реализации изобретения связывание антигенного пептида и/или апоптотической сигнальной молекулы с переносчиком (например, частица PLG) включает одно или несколько ковалентных и/или нековалентных взаимодействий. В определенных вариантах реализации изобретения антигенный пептид присоединен к поверхности

несущей частицы с отрицательным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации изобретения антигенный пептид инкапсулирован в несущей частице с отрицательным дзета-потенциалом.

В одном варианте реализации буферный раствор, контактирующий с
 5 иммуномодифицирующей частицей, может иметь щелочной pH. Подходящие щелочные pH для щелочного раствора включают 7,1, 7,5, 8,0, 8,5, 9,5, 10,0 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0 и 13,5. Буферный раствор также может быть приготовлен из любого подходящего основания и сопряженной с ним кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения буферный раствор может включать, без ограничений, бикарбонат натрия,
 10 бикарбонат калия, бикарбонат лития, дигидроортофосфат калия, дигидрофосфат натрия или дигидрофосфат лития и связанные с ними кислоты.

В одном варианте реализации изобретения иммуномодифицированные частицы содержат сополимеры. Эти сополимеры могут иметь варьирующее молярное соотношение. Подходящее соотношение сополимеров иммуномодифицирующих частиц
 15 по настоящему изобретению может составлять 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1 или 100:0. В другом варианте реализации изобретения в качестве сополимеров могут выступать периодические, статистические, линейные, разветвленные (включая звездообразные, щеткообразные или гребнеобразные сополимеры) сополимеры. В некоторых вариантах
 20 реализации изобретения соотношение сополимеров может, но без ограничения, составлять полистирол:поли(винилкарбоксилат)/80:20, полистирол: поли(винилкарбоксилат)/90:10, поли(винилкарбоксилат):полистирол/80:20, поли(винилкарбоксилат):полистирол/90:10, полимолочная кислота: полигликолиевая кислота/80:20 или полимолочная кислота: полигликолиевая кислота/90:10.

В одном варианте реализации частица представляет собой липосому. В
 25 дополнительном варианте реализации изобретения частица представляет собой липосому, состоящую из следующих липидов в следующих молярных соотношениях – 30:30:40 фосфатидилхолин:фосфатидилглицерин:холестерин. Еще в одном дополнительном варианте реализации изобретения частица инкапсулирована в липосому.

Не обязательно, чтобы каждая частица имела одинаковый размер, хотя частицы, в
 30 целом, должны иметь размер, достаточный для запуска фагоцитоза в антиген-презентирующей клетке или другой клетке СМФ. Предпочтительно, чтобы частицы были микроскопическими или наноскопическими по размеру, для того, чтобы повысить растворимость, избежать возможных осложнений, обусловленных агрегацией *in vivo*,
 35 и чтобы облегчить пиноцитоз. Размер частицы может быть фактором, влияющим на поглощение из интерстициального пространства в зонах созревания лимфоцитов. Частица, имеющая диаметр от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 10 мкм способна запускать процесс фагоцитоза. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения частица имеет диаметр в этих пределах. В другом варианте реализации
 40 изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,3 мкм до приблизительно 5 мкм. В еще одном варианте реализации изобретения частица имеет диаметр от приблизительно 0,5 мкм до приблизительно 3 мкм. В дополнительном варианте реализации изобретения частица имеет размер приблизительно 0,1 мкм или приблизительно 0,2 мкм, или приблизительно 0,3 мкм, или приблизительно 0,4 мкм,
 45 или приблизительно 0,5 мкм, или приблизительно 1,0 мкм, или приблизительно 1,5 мкм, или приблизительно 2,0 мкм, или приблизительно 2,5 мкм, или приблизительно 3,0 мкм, или приблизительно 3,5 мкм, или приблизительно 4,0 мкм, или приблизительно 4,5 мкм, или приблизительно 5,0 мкм. В конкретном варианте реализации изобретения частица

имеет размер приблизительно 0,5 мкм. В определенных вариантах реализации изобретения общие массы частиц составляют менее чем приблизительно 10000 кДа, менее чем приблизительно 5000 кДа или менее чем приблизительно 1000 кДа, 500 кДа, 400 кДа, 300 кДа, 200 кДа, 100 кДа, 50 кДа, 20 кДа, 10 кДа. Частицы, содержащиеся в композиции, не обязательно должны иметь одинаковый диаметр. Как пример, фармацевтический состав может содержать множество частиц, некоторые из которых имеют размер приблизительно 0,5 мкм, тогда как другие имеют размер приблизительно 1,0 мкм. Любое сочетание размеров частиц в пределах этих заданных диапазонов является приемлемым.

Частицы по настоящему изобретению могут обладать конкретным дзета-потенциалом. В определенных вариантах реализации изобретения дзета-потенциал является отрицательным. В одном варианте реализации дзета-потенциал меньший, чем приблизительно -100 мВ. В одном варианте реализации дзета-потенциал меньший, чем приблизительно -50 мВ. В определенных вариантах реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -100 мВ до 0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -75 мВ до 0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -60 мВ до 0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -50 мВ до 0 мВ. В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -40 мВ до 0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -30 мВ и 0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -20 мВ и +0 мВ. В дополнительном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -10 мВ до -0 мВ. В конкретном варианте реализации изобретения частицы обладают дзета-потенциалом от -50 мВ до -40 мВ.

В определенных вариантах реализации изобретения заряд переносчика (например, положительный, отрицательный, нейтральный) выбран с целью придания полезных свойств, с учетом специфики конкретного применения (например, физиологическая совместимость, эффективные взаимодействия типа поверхность-пептид и т.д.). В определенных вариантах реализации изобретения переносчик имеет нейтральный суммарный заряд или отрицательный заряд (например, для уменьшения неспецифического связывания с клеточными поверхностями, которые, в целом, несут суммарный отрицательный заряд). В некоторых вариантах реализации изобретения переносчики могут быть конъюгированы либо непосредственно, либо опосредованно с антигеном, в отношении которого необходимо выработать толерантность (также в дальнейшем именуется антиген-специфическим пептидом, антигенным пептидом, аутоантигеном, индуцирующим антигеном или толерогенным антигеном). В некоторых случаях переносчик имеет множество сайтов связывания (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10... 20... 50... 100 или больше) для экспонирования множества копий антиген-специфического пептида или множества разных пептидов на поверхности (например, для увеличения вероятности получения ответа, связанного с толерантностью). В определенных вариантах реализации изобретения на поверхности переносчика экспонирован пептид одного типа. В определенных вариантах реализации изобретения на поверхности переносчика экспонировано множество разных пептидов. В определенных вариантах реализации изобретения на поверхности переносчика экспонированы функциональные группы для ковалентного присоединения выбранных групп (например, антигенных пептидов). В определенных вариантах реализации изобретения функциональные группы поверхности переносчика обеспечивают сайты

для нековалентного взаимодействия с выбранными группами (например, антигенными пептидами). В определенных вариантах реализации изобретения переносчик имеет поверхность, на которой могут адсорбироваться конъюгирующие группы без образования химической связи.

5 В определенных вариантах реализации изобретения в качестве частицы выступает частица неметаллической природы. В этих вариантах реализации изобретения частица может быть образована из полимера. В предпочтительном варианте реализации изобретения частица подвергается биологическому разложению в организме индивидуума. В этом варианте реализации частицы могут вводиться в организм
10 индивидуума в многократных дозах, причем в отсутствие накопления частиц в организме индивидуума. Примеры подходящих частиц включают полистирольные частицы, частицы PLGA и алмазные частицы.

Предпочтительно, чтобы поверхность частицы состояла из вещества, которое минимизирует неспецифические или нежелательные с биологической точки зрения
15 взаимодействия. Взаимодействия между поверхностью частицы и интерстициальной тканью может быть фактором, который играет некоторую роль в поглощении через лимфатические сосуды. Поверхность частицы можно покрыть каким-нибудь веществом с целью предотвращения или уменьшения неспецифических взаимодействий. Стерическая стабилизация за счет покрытия частиц гидрофильными оболочками, такими как поли
20 (этиленгликоль) (ПЭГ) и его сополимеры, такие как ПЛЮРОНИКИ (включая блок-сополимеры поли(этиленгликоль)-блок-поли(пропиленгликоль)-блок-поли(этиленгликоль)), может уменьшать неспецифические взаимодействия с белками интерстициального пространства, что было продемонстрировано за счет более
25 эффективного поглощения через лимфатические сосуды после осуществления подкожных инъекций. Все эти факты указывают на значимость физических свойств частиц в части, касающейся поглощения лимфоцитами. Для получения всех или некоторых из полимеров и/или частиц, и/или слоев могут быть использованы биоразлагаемые полимеры. Биоразлагаемые полимеры могут подвергаться разложению, например, в результате реакции функциональных групп с водой в растворе. Термин "разложение" в данном
30 контексте обозначает приобретение свойств растворимости либо за счет уменьшения молекулярной массы, либо за счет превращения гидрофобных групп в гидрофильные группы. Полимеры со сложноэфирными группами, в целом, подвергаются спонтанному гидролизу, например, полилактиды и полигликолиды.

Частицы по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные
35 компоненты. Например, в состав переносчиков могут быть включены визуализирующие средства, или они могут быть конъюгированы с переносчиком. Примером несущей наносферы, содержащей визуализирующее средство, которое коммерчески доступно в настоящее время, являются наносферы Kodak X-sight. Неорганические квантово-размерные люминесцентные нанокристаллы, известные как квантовые точки (КТ),
40 появились в качестве идеальных доноров энергии для применения в FRET: их высокий квантовый выход и регулируемые зависимые от размера квантовых точек Стоксовы сдвиги обеспечивают возможность излучения квантовыми точками разных размеров в области от голубого до инфракрасного спектра при возбуждении при одной длине волны ультрафиолетового излучения. (Bruchez, et al., Science, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5796; Waggoner, A. Methods Enzymol. 1995, 246, 362;
45 Brus, L. E. J. Chem. Phys. 1993, 79, 5566). Квантовые точки, такие как гибридные органические/неорганические квантовые точки на основе класса полимеров, известных как дендримеры, можно использовать для маркировки, визуализации биологических

объектов и в оптических биосенсорных системах. (Lemon, et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12886). В отличие от традиционного синтеза неорганических квантовых точек, синтез этих гибридных наночастиц со свойствами квантовых точек не требует использования высоких температур или высокотоксичных, нестабильных реагентов.

5 (Etienne, et al., Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005).

Частицы могут быть получены из широкого спектра веществ. Предпочтительно, чтобы частица состояла из вещества, подходящего для биологического применения. Например, частицы могут состоять из стекла, кремния, сложных полиэфиров гидроксикарбоновых кислот, полиангидридов дикарбоновых кислот или сополимеров

10 гидроксикарбоновых кислот и дикарбоновых кислот. В более общем смысле, несущие частицы могут состоять из сложных полиэфиров с неразветвленной или разветвленной цепью, замещенных или незамещенных, насыщенных или ненасыщенных, линейных или поперечно сшитых, алканил-, галогеналкил-, тιοалкил-, аминокалкил-, арил-, аралкил-, алкенил-, аралкенил-, гетероарил- или алкокси-замещенных гидроксикислот

15 или полиангидридов, состоящих из неразветвленных или разветвленных, замещенных или незамещенных, насыщенных или ненасыщенных, линейных или поперечно сшитых, алканил-, галогеналкил-, тιοалкил-, аминокалкил-, арил-, аралкил-, алкенил-, аралкенил-, гетероарил- или алкокси-замещенных дикарбоновых кислот. В дополнение к этому, несущие частицы могут представлять собой квантовые точки, или состоять из квантовых

20 точек, как, например, полистирольные частицы-квантовые точки (Joumaa et al. (2006) Langmuir 22: 1810-6). Также могут быть использованы несущие частицы, включающие комбинации сложноэфирных и ангидридных связей (например, сополимеры гликолевой и себадиновой кислоты. Например, несущие частицы могут содержать вещества, включающие полимеры полигликолиевой кислоты (PGA), полимеры молочной кислоты

25 (PLA), полимеры полисебадиновой кислоты (PSA), сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA или PLG; термины являются взаимозаменяемыми), сополимеры молочной и себадиновой кислот (PLSA), сополимеры гликолевой и себадиновой кислот (PGSA) и т.д. Другие биосовместимые, биоразлагаемые полимеры, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают полимеры или сополимеры капролактонов,

30 карбонатов, амидов, аминокислот, сложных ортоэфиров, ацеталей, цианоакрилатов и разлагаемых уретанов, а также сополимеры указанных соединений и неразветвленных или разветвленных, замещенных или незамещенных, алканил-, галогеналкил-, тιοалкил-, аминокалкил-, алкенил-замещенных или ароматических гидроксид- или дикарбоновых кислот. В дополнение к этому, в состав сополимеров можно включить важные с

35 биологической точки зрения аминокислоты с реакционноспособными группами боковых цепей, такие как лизин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, треонин, тирозин и цистеин или их энантиомеры с любым из вышеупомянутых веществ с получением реакционноспособных групп для конъюгирования с антигенными пептидами и белками, или конъюгирующими группами. Биоразлагаемые вещества,

40 подходящие для настоящего изобретения, включают полимеры алмаза, PLA, PGA и PLGA. В несущих частицах по изобретению также могут быть использованы биосовместимые, но не биоразлагаемые вещества. Например, могут быть использованы не биоразлагаемые полимеры акрилатов, этиленвинилацетатов, ацил-замещенных ацетатов целлюлозы, неразлагаемых уретанов, стиролов, винилхлоридов,

45 винилфторидов, винилимидазолов, хлорсульфированных олефинов, этиленоксида, виниловых спиртов, TEFLON[®] (DuPont, Wilmington, Del.) и нейлонов.

Подходящие гранулы, которые коммерчески доступны в настоящее время, включают полистирольные гранулы, такие как FluoSpheres (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены системы, содержащие: (а) каркас, обеспечивающий доставку, выполненный с возможностью доставки химических и/или биологических средств в организм субъекта; и (б) антиген-связанные частицы сополимера лактида и гликолида для индукции антиген-специфической толерантности. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере некоторая часть указанного каркаса, обеспечивающего доставку, является микропористой. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-связанные частицы сополимера лактида и гликолида инкапсулированы в указанном каркасе. В определенных вариантах реализации изобретения химические и/или биологические средства выбраны из группы, состоящей из: белка, пептида, низкомолекулярных веществ, нуклеиновых кислот, клеток и частиц. В определенных вариантах реализации изобретения химические и/или биологические средства включают клетку, а указанные клетки включают клетки островков Лангерганса.

Физические свойства также определяют полезные свойства наночастиц после поглощения и удерживания в областях, в которых имеются незрелые лимфоциты. Они включают механические свойства, такие как жесткость или эластичность. Некоторые варианты реализации изобретения основаны на эластомерном ядре, например, состоящем из поли(пропиленсульфида) (PPS), с верхним слоем, например, гидрофильным верхним слоем, как в PEG, как в системе PPS-PEG, недавно разработанной и охарактеризованной в отношении системной доставки (а не направленной доставки или доставки в клетки иммунной системы). Эластомерное ядро отличается, от жесткого, по существу, ядра, которое характерно для системы, состоящей из полистирольных или металлических наночастиц. Термин эластомерный относится к определенным веществам с упругими свойствами помимо натуральных или синтетических каучуков, причем "эластомерный" - это термин, знакомый специалистам в области полимеров. Например, для образования гидрофобного эластомерного ядра может быть использован PPS с поперечносшитой структурой. PPS представляет собой полимер, который разлагается в окислительных условиях до полисульфоксида и в конечном итоге до полисульфона, превращаясь из гидрофобной резины в гидрофильный, водорастворимый полимер. Другие сульфидные полимеры могут быть адаптированы для применения, причем термин сульфидный полимер относится к полимеру с серой в осто́ве мономерного звена полимера. В качестве других эластомерных полимеров могут быть использованы сложные полиэфиры с температурой перехода в стеклообразное состояние в условиях гидратации, которая равна меньше чем приблизительно 37°C. Преимущественно может быть использовано гидрофобное ядро с гидрофильным верхним слоем, поскольку ядро и верхний слой не будут смешиваться, так что верхний слой будет стерически отдаляться от ядра. Ядро относится к частице, которая покрыта слоем. Слой относится к веществу, покрывающему по меньшей мере некоторую часть ядра. Слой может быть адсорбирован или ковалентно связан. Частица или ядро может быть сплошным или полым. Эластомерные гидрофобные ядра обладают теми преимуществами по сравнению с жесткими гидрофобными ядрами, такими как кристаллические или стеклообразные (как и в случае полистирола) ядра, что в частицах с эластичными гидрофобными ядрами могут переноситься более высокие дозы гидрофобных лекарственных средств.

Другим физическим свойством является гидрофильность поверхности. Гидрофильное вещество может иметь растворимость в воде по меньшей мере 1 грамм на литр, в случае если оно не содержит поперечных связей. Стерическая стабилизация частиц с помощью гидрофильных полимеров может улучшать поглощение из интерстициального

пространства за счет уменьшения неспецифических взаимодействий; однако природа частиц, обеспечивающая повышение уровня малозаметности, также может уменьшать интернализацию фагоцитарными клетками в областях, в которых имеются незрелые лимфоциты. Однако задача, заключающаяся в уравнивании этих конкурирующих

5 признаков, была решена, и в данной заявке документально подтверждается создание наночастиц для эффективной доставки по лимфатическим сосудам в ДК и другие АПК, содержащиеся в лимфатических узлах. Некоторые варианты реализации изобретения включают гидрофильный компонент, например, слой из гидрофильного вещества. Примерами подходящих гидрофильных веществ являются один или несколько из

10 полиалкиленоксидов, полиэтиленоксидов, полисахаридов, полиакриловых кислот и полиэфиров. Для получения подходящей степени стерического несоответствия *in vivo* можно подобрать молекулярную массу полимеров, содержащихся в слое, например, от приблизительно 1000 до приблизительно 100000 или даже больше; специалистам в данной области техники сразу же станет понятно, что предусмотрены все диапазоны

15 и значения в пределах четко указанных диапазонов, например, от 10000 до 50000. Наночастицы могут включать функциональные группы для вступления в дополнительные реакции. Функциональные группы для вступления в дополнительные реакции включают электрофилы или нуклеофилы; они подходят для вступления в реакцию с другими молекулами. Примерами нуклеофилов являются первичные амины,

20 тиолы и гидроксилы. Примерами электрофилов являются сукцинимидильные эфиры, альдегиды, изоцианаты и малеинимиды.

Для конъюгирования антигенных пептидов и белков с переносчиками могут быть использованы самые разнообразные способы, широко известные в данной области техники. Эти методы включают любые стандартные химические реакции, которые

25 полностью не подавляют или сильно не ограничивают биологическую активность антигенных пептидов и белков, и которые обеспечивают возможность конъюгирования достаточного количества антигенных пептидов и белков с переносчиком в пространственной ориентации, которая обеспечивает возможность взаимодействия антигенного пептида и белка с родственным Т-клеточным рецептором. В целом,

30 предпочтительными являются методы, которые позволяют конъюгировать С-концевые области антигенного пептида или белка или С-концевые области антигенного пептида или слитого белка с переносчиком. Точные химические реакции будут, конечно, зависеть от природы переносчика, присутствия или отсутствия антигенного пептида или белка, слитого на С-конце и/или присутствия или отсутствия конъюгирующих групп.

35 Функциональные группы могут быть расположены на частице как требуется для обеспечения доступности. В качестве одного местоположения могут выступать боковые группы или концевые группы на полимере ядра, или полимерах, которые представляют собой слои на ядре, или полимерах, иным образом связанных с частицей. Например, в данный документ включены примеры, в которых описан ПЭГ, стабилизирующий

40 наночастицы, которые можно без труда функционализировать для специфического направленного воздействия на клетки или доставки лекарственных средств белковой или пептидной природы.

Конъюгаты, такие как этиленкарбодиимид (ECDI), гексаметилендиизоцианат, диглицидный эфир пропиленгликоля, которые содержат 2 эпоксидных остатка, и

45 эпихлоргидрин могут быть использованы для прикрепления пептидов или белков к поверхности переносчика. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что ECDI выполняет две главные функции для индукции толерантности: (а) он обеспечивает химическое связывание белка/пептидов с клеточной поверхностью посредством катализа

образования пептидной связи между свободными amino- и свободными карбоксильными группами; и (б) он приводит к имитации переносчиком апоптотической клеточной гибели, так что их собирают хозяйские антигенпрезентирующие клетки в селезенке и индуцируют толерантность. Именно эта презентация хозяйским Т-клеткам в

5 неиммуногенной форме приводит к непосредственной индукции толерантности в аутореактивных клетках. В дополнение к этому, ECDI служит в качестве мощного стимула для активации специфических регуляторных Т-клеток.

В одной серии вариантов реализации изобретения антигенные пептиды и белки связаны с переносчиком посредством ковалентной химической связи. Например,

10 реакционноспособная группа или группа, расположенная вблизи С-конца антигена (например, С-концевая карбоксильная группа или гидроксильная, тиоловая или аминогруппа из боковой цепи аминокислоты), может непосредственно быть конъюгирована с помощью непосредственной химической реакции с

15 реакционноспособной группой или группой на поверхности переносчика (например, гидроксильная или карбоксильная группа полимера PLA или PGA, концевая аминогруппа или карбоксильная группа дендримера или гидроксильная, карбоксильная или фосфатная группа фосфолипида). В альтернативном варианте может быть использована конъюгирующая группа, которая ковалентно сопрягается как с антигенными пептидами, так и белками и переносчиком, тем самым связывая их вместе.

20 Реакционноспособные карбоксильные группы, расположенные на поверхности переносчика, могут быть соединены со свободными аминогруппами (например, из остатков Lys), расположенными на антигенном пептиде или белке, путем осуществления реакции между ними и, например, гидрохлоридом 1 -этил-3-[3,9-диметиламинопропил] карбодиимида (EDC) или N-гидроксисукцинимидным эфиром (NHS). Аналогичным

25 образом, такие же химические реакции могут быть использованы для конъюгирования свободных аминогрупп, расположенных на поверхности переносчика, со свободными карбоксильными группами (например, из С-конца или из остатков Asp или Glu), расположенными на антигенном пептиде или белке. В альтернативном варианте свободные аминогруппы, расположенные на поверхности переносчика, могут быть

30 ковалентно связаны с антигенными пептидами и белками или слитыми белками на основе антигенных пептидов или белков с использованием химического вещества сульфо-SIAB, по существу, как описано Arano et al. (1991) Chem. 2:71-6.

В другом варианте реализации изобретения антиген с переносчиком может быть конъюгирован посредством нековалентной связи между лигандом, связанным с

35 антигенным пептидом или белком, и антилигандом, прикрепленным к переносчику. Например, тег с последовательностью, распознаваемой биотин-лигазой, может быть соединен с С-концом антигенного пептида или белка и этот тег может подвергаться биотинилированию биотин-лигазой. Биотин затем может служить в качестве лиганда для нековалентного конъюгирования антигенного пептида или белка с авидином или

40 стрептавидином, который адсорбируется или иным образом, связывается с поверхностью переносчика в качестве антилиганда. В альтернативном варианте, если антигенные пептиды и белки слиты с иммуноглобулиновым доменом, несущим Fc-область, как было описано выше, Fc-домен может выполнять функцию лиганда, а белок А, либо ковалентно или нековалентно связанный с поверхностью переносчика, может служить

45 в качестве антилиганда для нековалентного конъюгирования антигенного пептида или белка с переносчиком. В данной области техники широко известны другие способы, которые могут быть использованы для нековалентного конъюгирования антигенных пептидов и белков с переносчиками, включая методы хелатирования ионов металлов

(например, с использованием поли-His тега на С-конце антигенного пептида и белка или слитых белков на основе антигенных пептидов или белков и покрытого Ni^{2+} переносчика), и эти способы можно использовать вместо способов, описанных в данном случае.

Конъюгирование фрагмента нуклеиновой кислоты с несущей молекулой можно осуществить с использованием ряда способов, как правило, включающих использование одного или нескольких сшивающих агентов и функциональных групп на фрагменте нуклеиновой кислоты и несущей молекуле. Связывающие группы присоединяются к несущим молекулам с использованием стандартных химических методов синтеза.

Связывающие группы могут быть присоединены к фрагментам нуклеиновых кислот с использованием стандартных методов синтеза. У специалиста-практика имеется ряд возможностей выбора антигенов, используемых в комбинации по настоящему изобретению. Индуцирующий антиген, присутствующий в данной комбинации, вносит вклад в специфичность толерогенного ответа, который индуцируется. В качестве него может выступать тот же самый или другой антиген-мишень, то есть антиген, присутствующий в организме субъекта или вводимый субъекту, что получает лечение, у которого может развиваться нежелательный иммунологический ответ и у которого необходимо выработать толерантность.

В качестве индуцирующего антигена по настоящему изобретению может выступать полипептид, полинуклеотид, углевод, гликолипид или другая молекула, выделенная из биологического источника, или в качестве него может выступать химически синтезированная малая молекула, полимер или производное биологического материала, при условии, что оно обладает способностью индуцировать толерантность по данному описанию при объединении с компонентом, обеспечивающим связывание со слизистой оболочкой.

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложен переносчик (например, иммуномодифицирующая частица), связанный с одним или несколькими пептидами, полипептидами и/или белками. В определенных вариантах реализации изобретения переносчики (например, переносчик PLG), как, например, переносчики, описанные в данном документе, эффективно индуцируют антиген-специфическую толерантность и/или предотвращают начало иммунологического заболевания (такого как ЭАЭ в модели на мышах) и/или уменьшают тяжесть предсуществующего иммунологического заболевания. В определенных вариантах реализации изобретения композиции и способы по настоящему изобретению могут приводить к участию Т-клеток в ранних событиях, ассоциированных с активацией Т-клеток, но не обеспечивают возможность приобретения Т-клетками эффекторной функции. Например, введение композиций по настоящему изобретению может приводить к образованию Т-клеток, имеющих фенотип, характерный для квазиактивированных клеток, как, например, повышение экспрессии CD69 и/или CD44, но не проявляющих эффекторную функцию, как, например, о чем свидетельствует недостаточный синтез ИФН- γ или ИЛ-17. В определенных вариантах реализации изобретения введение композиций по настоящему изобретению приводит к образованию Т-клеток, имеющих фенотип, характерный для квазиактивированных клеток, без превращения наивных антиген-специфических Т-клеток в клетки с фенотипом регуляторных клеток, таких как клетки, имеющие фенотипы $\text{CD25}^{+}/\text{Foxp3}^{+}$.

В определенных вариантах реализации изобретения поверхность переносчика (например, частицы) содержит химические группы и/или функциональные группы, которые обеспечивают присоединение (например, ковалентное, нековалентное)

антигенных пептидов и/или других функциональных элементов к переносчику. В определенных вариантах реализации изобретения число, ориентация, пространственное расположение и т.д. химических групп и/или функциональных групп на переносчике (например, частице) изменяется в зависимости от химических свойств переносчика,

5 требуемого применения и т.д.

В определенных вариантах реализации изобретения переносчик содержит одно или несколько биологических или химических агентов, прикрепленных к, адсорбированных на, инкапсулированных в и/или содержащихся по всему объему переносчика. В определенных вариантах реализации изобретения химический или биологический агент

10 инкапсулирован в и/или содержится по всему объему частицы. Настоящее изобретение не ограничено природой химических или биологических агентов. Такие агенты включают, но без ограничений, белки, молекулы нуклеиновых кислот,

низкомолекулярные лекарственные средства, липиды, углеводы, клетки, компоненты клеток и тому подобное. В определенных вариантах реализации изобретения два или

15 больше (например, 3, 4, 5 и т.д.) разных химических или биологических агентов включены на поверхности или внутри переносчика. В определенных вариантах реализации изобретения агенты выполнены с возможностью обеспечения специальных скоростей высвобождения. В определенных вариантах реализации изобретения множество разных агентов выполнены с возможностью обеспечения разных скоростей высвобождения.

Например, первый агент может высвобождаться на протяжении часов, тогда как второй агент высвобождается на протяжении более продолжительного периода времени (например, сутки, недели, месяцы и т.д.). В определенных вариантах реализации изобретения переносчик или его часть выполнен с возможностью медленного высвобождения биологических или химических агентов. В определенных вариантах

25 реализации изобретения медленное высвобождение обеспечивает высвобождение биологически активных количеств агента на протяжении по меньшей мере 30 дней (например, 40 дней, 50 дней, 60 дней, 70 дней, 80 дней, 90 дней, 100 дней, 180 дней и т.д.). В определенных вариантах реализации изобретения переносчик или его часть выполнен с возможностью обеспечения достаточной степени пористости для вращаения клеток

30 внутрь пор. Размер пор может быть подобран для конкретных типов клеток, представляющих интерес, и/или для получения требуемой степени вращаения.

На удивление было обнаружено, что инкапсуляция антигена, биологических и/или химических агентов в частицах по данному изобретению, индуцирует иммунологическую толерантность и обладает несколькими преимуществами. Во-первых,

35 инкапсулированные частицы характеризуются более медленным цитокиновым ответом. Во-вторых, при использовании множества антигенов, биологических и/или химических агентов инкапсуляция устраняет конкуренцию между этими различными молекулами, которая может возникать, в случае если данные агенты были присоединены к поверхности частицы. В-третьих, инкапсуляция позволяет включить в состав частицы

40 большее количество антигенов, биологических и/или химических агентов. В-четвертых, инкапсуляция облегчает использование сложных белковых антигенов или гомогенатов органов (например, гомогената поджелудочной железы в случае сахарного диабета 1-го типа или экстракта арахиса при аллергии на арахис). И наконец, инкапсуляция антигенов, биологических и/или химических агентов в частицах вместо конъюгирования с поверхностью частицы поддерживает суммарный отрицательный заряд на поверхности частицы.

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены переносчики, несущие на себе (или внутри) клетки или другие биологические или

химические агенты. В случаях, когда используются клетки, переносчики не ограничиваются конкретным типом клеток. В определенных вариантах реализации изобретения переносчики несут на себе клетки островков Лангерганса. В определенных вариантах реализации изобретения микропористые переносчики дополнительно несут на себе белки ЕСМ и/или эксендин-4. Переносчики не ограничиваются конкретным типом. В определенных вариантах реализации изобретения в переносчике содержатся области с изменяющейся пористостью (например, изменяющимся размером пор, глубиной пор и/или плотностью пор). В определенных вариантах реализации изобретения переносчики несут на себе (или внутри) фармацевтические вещества, ДНК, РНК, белки внеклеточного матрикса, эксендин-4 и т.д. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы трансплантации клеток островков Лангерганса с использованием таких переносчиков. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцирующий антиген представляет собой одну выделенную или полученную с помощью технологии рекомбинантной ДНК молекулу. Для лечения состояний, при которых антиген-мишень диссеминирован в различных местоположениях в хозяйском организме, в целом, необходимо, чтобы индуцирующий антиген был идентичным или иммунологически связанным с антигеном-мишенью. Примерами таких антигенов является большинство полинуклеотидных антигенов и некоторые углеводные антигены (такие как антигены групп крови).

Любые подходящие антигены могут найти применение в пределах объема настоящего изобретения. В определенных вариантах реализации изобретения индуцирующий антиген вносит вклад в специфичность толерогенного ответа, который индуцируется. В качестве индуцирующего антигена может выступать тот же самый или другой антиген-мишень, то есть антиген, присутствующий в организме субъекта или вводимый субъекту, что получает лечение, у которого может развиваться нежелательный иммунологический ответ и у которого необходимо выработать толерантность.

В случаях, когда антиген-мишень преимущественно экспрессирован на конкретном органе, клетке или типе ткани, специалист-практик опять имеет возможность использования индуцирующего антигена, который является идентичным или иммунологически связанным с антигеном-мишенью. Однако также имеется дополнительная возможность использования антигена, который является неспецифическим антигеном по отношению к мишени. Это антиген, который может и не быть иммунологически связанным с антигеном-мишенью, но преимущественно экспрессирован в ткани, в которой экспрессирован антиген-мишень. Действующая теория, что касается эффективности подавления иммунного ответа на один антиген в результате активации иммунного ответа на другой, заключается в том, что данное подавление представляет собой активный клеточно-опосредованный процесс, который приводит к деактивации эффекторного звена иммунного ответа на клетки-мишени. Клетки-супрессоры специфически стимулируются индукторным антигеном, расположенным на поверхности слизистой оболочки, и подвергаются хомингу в участок ткани, в котором преимущественно экспрессирован неспецифический антиген. Посредством интерактивного или цитокин-опосредованного механизма локализованные клетки-супрессоры затем деактивируют эффекторные клетки (или индукторы эффекторных клеток) по соседству независимо от того, против чего они реагируют. Если эффекторные клетки являются специфическими по отношению к мишени, отличной от индуцирующего антигена, тогда результатом будет неспецифический эффект. Для дополнительного подробного изучения неспецифической реакции и перечня толерогенных пептидов, обладающих этим действием, читатель может обратиться к

Международной публикации заявки на патент WO 93/16724. Смысл теории неспецифичности антигена заключается в том, что для практического воплощения настоящего изобретения для специалиста в данной области техники нет необходимости в идентификации или выделении конкретного антигена-мишени, против которого
5 необходимо выработать толерантность. Специалисту-практику понадобится только получить по меньшей мере одну молекулу, преимущественно экспрессируемую на сайте-мишени, для использования в качестве индуцирующего антигена.

В некоторых вариантах реализации изобретения индуцирующий антиген имеет не ту же самую форму, в которой он экспрессирован в организме индивидуума, что
10 подлежит лечению, но представляет собой фрагмент или его производное.

Индуцирующие антигены по настоящему изобретению включают пептиды на основе молекулы, обладающей соответствующей специфичностью, но адаптированной путем фрагментации, замещения остатков, введения метки, конъюгирования и/или слияния с пептидами, обладающими другими функциональными свойствами. Адаптацию можно
15 осуществить для достижения любых желательных целей, включая, но без ограничений, устранение любого нежелательного свойства, такого как токсичность или иммуногенность; или для улучшения любых желательных свойств, таких как связывание со слизистой оболочкой, проникновение под слизистую оболочку или стимуляция толерогенного звена иммунного ответа. Термины, такие как инсулиновый пептид,
20 коллагеновый пептид и пептид основного белка миелина, в данном контексте относятся не только к интактной субъединице, но также к аллотипическим и синтетическим вариантам, фрагментам, слитым пептидам, конъюгатам и другим производным, которые содержат область, которая является гомологичной (предпочтительно на 70% идентичной, более предпочтительно на 80% идентичной и даже более предпочтительно на 90%
25 идентичной на уровне аминокислот) по меньшей мере 10 и предпочтительно 20 следующими друг за другом аминокислотам соответствующей молекулы, для которой он является аналогом, причем гомологичная область производного обладает общей способностью с соответствующей исходной молекулой индуцировать толерантность к антигену-мишени.

Признано, что толерогенные области индуцирующего антигена часто отличаются от иммунодоминантных эпитопов для стимуляции гуморального иммунного ответа. Толерогенные области, в целом, представляют собой области, которые могут подвергаться презентации при конкретных взаимодействиях, включающих Т-клетки. Толерогенные области могут присутствовать и быть способными индуцировать
35 толерантность после презентации интактного антигена. Некоторые антигены содержат скрытые толерогенные области, в том смысле, что процессирование и презентация нативного антигена обычно не запускает толерантность. Подробное изучение скрытых антигенов и их идентификация находится в Международной публикации заявки на патент WO 94/27634.

В некоторых вариантах реализации изобретения использовано два, три или более высокое количество индуцирующих антигенов. Было бы желательно осуществить эти варианты реализации изобретения, в тех случаях, когда имеется множество антигенов-мишеней или для обеспечения множества неспецифических антигенов по отношению к мишени. Например, при лечении сахарного диабета можно смешать как инсулин, так
40 и глюкагон с компонентом, обеспечивающим связывание со слизистой оболочкой. Также было бы желательно обеспечить коктейль антигенов для охвата нескольких возможных альтернативных мишеней. Например, для вызова толерантности у субъекта можно использовать коктейль фрагментов антигенов гистосовместимости в ожидании

будущей трансплантации с использованием аллотрансплантата с неизвестным фенотипом. В данной области техники известны аллотипические варианты областей антигенов лейкоцитов человека: например, Immunogenetics 29:231, 1989. В другом примере смесь аллергенов может служить в качестве индуцирующего антигена для

лечения атопии.

Индуцирующие антигены могут быть получены с использованием ряда методов, известных в данной области техники, в зависимости от природы молекулы.

Полинуклеотидные, полипептидные и углеводные антигены могут быть выделены из клеток, принадлежащих биологическому виду, который подлежит лечению, в которых они содержатся в большом количестве. Короткие пептиды без труда получают путем аминокислотного синтеза. Более длинные белки с известной последовательностью могут быть получены путем синтеза кодирующей последовательности или путем ПЦР-амплификации кодирующей последовательности, исходя из природного источника или вектора, и затем путем экспрессии кодирующей последовательности в подходящей бактериальной или эукариотической хозяйской клетке.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинация содержит сложную смесь антигенов, полученных из клетки или ткани, один или несколько из которых играют роль индуцирующего антигена. Антигены могут быть представлены в форме целой клетки либо интактной, либо обработанной фиксирующим раствором, таким как формальдегид, глутаральдегид или спирт. Антигены могут быть представлены в форме клеточного лизата, полученного путем солюбилизации с использованием поверхностно-активного вещества или механического разрушения клеток или ткани, с последующим просветлением. Антигены также могут быть получены путем субклеточного фракционирования, в частности, образцов, обогащенных белками плазматической мембраны, с использованием методов, таких как дифференциальное центрифугирование, необязательно с последующей солюбилизацией с использованием поверхностно-активного вещества и диализом. Другие методы разделения также являются подходящими, такие как аффинная или ионообменная хроматография солюбилизированных мембранных белков.

В одном варианте реализации антигенный пептид или белок представляет собой аутоантиген, аллоантиген или трансплантационный антиген. В еще одном конкретном варианте реализации изобретения аутоантиген выбран из группы, состоящей из основного белка миелина, коллагена или их фрагментов, ДНК, ядерных и ядрышковых белков, митохондриальных белков и белков β -клеток поджелудочной железы.

В настоящем изобретении предусмотрена индукция толерантности к аутоантигену для лечения аутоиммунных заболеваний путем введения антигена, в отношении которого необходимо выработать толерантность. Например, аутоантитела, направленные против основного белка миелина (МВР), наблюдаются у пациентов с рассеянным склерозом и, соответственно, антигенные пептиды или белки МВР могут быть использованы в настоящем изобретении для доставки с использованием композиций по настоящему изобретению для лечения и предотвращения рассеянного склероза.

В качестве другого примера, не ограничивающего объем изобретения, индивидуум, который является кандидатом на получение трансплантата от неоднойцевоего близнеца, может страдать от отторжения трансплантируемых клеток, тканей или органов, поскольку трансплантируемые антигены являются чужеродными для реципиента. Предварительная толерантность индивидуума-реципиента к предполагаемому трансплантату отменяет или уменьшает степень последующего отторжения. Уменьшение интенсивности или исключение длительной терапии, направленной против отторжения

трансплантата, может быть достигнуто за счет практического воплощения настоящего изобретения. В другом примере многие аутоиммунные заболевания отличаются клеточным иммунным ответом на эндогенный или собственный антиген. Выработка толерантности иммунной системы к эндогенному антигену является желательной для

5 контроля данного заболевания.

В дополнительном примере сенсibilизация индивидуума к промышленному загрязняющему веществу или химическому веществу, такому, которое может встречаться на работе, представляет опасность развития иммунного ответа. Предварительная выработка толерантности иммунной системы индивидуума к химическому веществу,

10 в частности, в форме химического вещества, вступающего в реакцию с эндогенными белками индивидуума, может быть желательной для предотвращения последующего развития иммунного ответа, связанного с профессиональной деятельностью.

Аллергены представляют собой другие антигены, в отношении которых также желательно выработать толерантность иммунного ответа. В одном варианте реализации антиген представляет собой глиадин. В дополнительном варианте реализации изобретения антиген представляет собой А-глиадин.

15 Примечательно, что, даже при заболеваниях, для которых неизвестен аутоантиген, что является причиной заболевания, подавление иммунного ответа на один антиген в результате активации иммунного ответа на другой может быть индуцировано с

20 использованием антигенов, присутствующих анатомически близко. Например, аутоантитела к коллагену наблюдаются при ревматоидном артрите и, соответственно, ген, кодирующий коллаген, может быть использован в качестве генного модуля, экспрессирующего антиген, для лечения ревматоидного артрита (см., например, Choy (2000) Curr Opin Investig Drugs 1: 58-62). Кроме того, толерантность к аутоантигенам

25 бета-клеток аутоантигенам может быть использована для предотвращения развития сахарного диабета 1-го типа (см., например, Bach and Chatenoud (2001) Ann Rev Immunol 19: 131-161).

В качестве другого примера аутоантитела, направленные против миелин-олигодендроцитарного гликопротеина (MOG), наблюдаются при аутоиммунном

30 энцефаломиелите и при многих других заболеваниях ЦНС, а также при рассеянном склерозе (см., например, Iglesias et al. (2001) Glia 36: 22-34). Соответственно, использование конструкций, экспрессирующих антиген MOG, в настоящем изобретении обеспечивает возможность лечения рассеянного склероза, а также родственных аутоиммунных нарушений центральной нервной системы.

35 Еще одни примеры потенциальных аутоантигенов для использования при лечении аутоиммунного заболевания включают: антигены бета-клеток поджелудочной железы, инсулин и GAD для лечения инсулинозависимого сахарного диабета; коллаген 11-го типа, gp39 человеческого хряща (HCgp39) и gp130-RAPS для использования при лечении ревматоидного артрита; основной белок миелина (MBP), протеолипидный белок (PLP)

40 и миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (MOG, см. выше) для лечения рассеянного склероза; фибриллярин и малый ядрышковый белок (snRNP) для лечения склеродермии; рецептор тиреотропного гормона (TSH-R) для использования при лечении болезни Грейвса; ядерные антигены, гистоны, гликопротеин gp70 и рибосомные белки для использования при лечении системной красной волчанки;

45 дигидролипоацетилацетилтрансферазу (PCD-E2) пируватдегидрогеназного комплекса для использования при лечении первичного билиарного цирроза печени; антигенов волосяного фолликула для использования при лечении гнездной алопеции; и изоформу 5 человеческого тропомиозина (hTM5) для использования при лечении язвенного колита.

Могут быть исследованы комбинации антигенов на предмет их способности содействовать выработке толерантности путем проведения экспериментов с выделенными клетками или в моделях на животных.

В определенных вариантах реализации изобретения композиции, индуцирующие толерантность, по настоящему изобретению содержат апоптотическую сигнальную молекулу (например, в дополнение к антигенному пептиду или другой антигенной молекуле). В определенных вариантах реализации изобретения апоптотическая сигнальная молекула сопряжена и/или ассоциирована с поверхностью переносчика. В некоторых вариантах реализации изобретения апоптотическая сигнальная молекула приводит к тому, что антиген-презентирующие клетки хозяина, такие как клетки ретикулоэндотелиальной системы хозяина, воспринимают переносчик как апоптотическое тельце; это обеспечивает презентацию ассоциированных пептидных эпитопов таким образом, что происходит индукция толерантности. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что это предотвращает повышение экспрессии молекул, вовлеченных в стимуляцию иммунокомпетентных клеток, таких как МНС класса I/II и костимулирующие молекулы. Эти апоптотические сигнальные молекулы также могут служить в качестве фагоцитарных маркеров. Например, апоптотические сигнальные молекулы, подходящие для настоящего изобретения, были описаны в заявке на патент США No. 20050113297, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Молекулы, подходящие для настоящего изобретения, включают молекулы, которые направлены воздействуют на фагоциты, которые включают макрофаги, дендритные клетки, моноциты и нейтрофилы.

В определенных вариантах реализации изобретения молекулы, подходящие в качестве апоптотических сигнальных молекул, функционируют для повышения толерантности к ассоциированным пептидам. В дополнение к этому, переносчик, связанный с апоптотической сигнальной молекулой, может быть связан Clq при распознавании апоптотических клеток (Paidassi et al., (2008) J. Immunol. 180:2329-2338; включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Например, молекулы, которые могут быть использованы в качестве апоптотических сигнальных молекул, включают фосфатидилсерин, аннексин-1, аннексин-5, EGF-фактор 8 жировых глобул молока (MFG-E8) или семейство тромбоспондинов (например, тромбоспондин-1 (TSP-1)). Различные молекулы, подходящие для использования в качестве апоптотических сигнальных молекул с настоящим изобретением, рассмотрены, например, в заявке на патент США. 2012/0076831; она включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

В определенных вариантах реализации изобретения апоптотическая сигнальная молекула может быть конъюгирована с антиген-специфическим пептидом. В некоторых случаях апоптотическая сигнальная молекула и антиген-специфический пептид конъюгированы с получением слитого белка. Например, слитый белок может содержать по меньшей мере один антиген-специфический пептид (или его фрагмент, или вариант), связанный по меньшей мере с одной апоптотической сигнальной молекулой (или ее фрагментом, или вариантом). В отношении создания слитых белков, термины "слитый белок", "слитый пептид", "слитый полипептид" и "химерный пептид" использованы взаимозаменяемо. Подходящие фрагменты антиген-специфического пептида включают любой фрагмент полноразмерного пептида, который сохраняет функцию выработки требуемой антиген-специфической толерантности по настоящему изобретению. Слитый белок может быть создан с использованием различных способов, принятых в данной области техники (например, генетическое слияние, химическое конъюгирование и т.д.).

Два белка могут быть слиты либо непосредственно, либо посредством аминокислотного линкера. Полипептиды, образующие слитый белок, как правило, связаны в направлении от С-конца к N-концу, хотя они также могут быть связаны в направлении от С-конца к С-концу, от N-конца к N-концу или от N-конца к С-концу. Полипептиды слитого белка могут быть расположены в любом порядке. Последовательность пептидного линкера может быть использована для разделения первого и второго полипептидных компонентов расстоянием, достаточным для обеспечения возможности укладки каждого полипептида с образованием вторичной и третичной структур. Аминокислотные последовательности, которые могут успешно использоваться в качестве линкеров, включают последовательности, описанные в Maratea et. al., *Gene* 40:39-46 (1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262 (1986); патент США No. 4935233 и патент США No. 4751180; включены в данный документ в их полном объеме посредством ссылки. Длина линкерной последовательности, в целом, может составлять от 1 до приблизительно 50 аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения линкерные последовательности не требуются и/или используются, например, в случаях, когда в первом и втором полипептидах имеются несущественные N-концевые аминокислотные области, которые могут быть использованы для разделения функциональных доменов и предотвращения стерического влияния.

Показателем толерогенной активности является способность интактного антигена или фрагмента стимулировать продукцию соответствующего цитокина в области сайта-мишени. Предполагается, что иммунорегуляторным цитокином, высвобождаемым Т клетками-супрессорами в области сайта-мишени, является TGF- β (Miller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:421, 1992). Другими факторами, которые могут продуцироваться в процессе выработки толерантности, являются цитокины ИЛ-4 и ИЛ-10, и медиатор PGE. В отличие от этого, лимфоциты, содержащиеся в тканях, подвергающихся активному иммунному повреждению, секретируют цитокины, такие как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и γ -ИФН. Таким образом, эффективность потенциального индуцирующего антигена можно оценить путем определения его способности стимулировать продукцию соответствующего типа цитокинов.

Имея это в виду, может быть проведен быстрый скрининг-тест на толерогенные эпитопы индуцирующего антигена, эффективные компоненты, обеспечивающие связывание со слизистой оболочкой, эффективные комбинации или эффективные способы и схемы введения под слизистую оболочку с использованием сингенных животных в качестве доноров клеток для анализов клеток *in vitro*. Животных обрабатывают в области поверхности слизистой оболочки с использованием исследуемой композиции и через некоторое время стимулируют с использованием парентерального введения антигена-мишени в полном адьюванте Фрейнда. Клетки селезенки выделяют и культивируют *in vitro* в присутствии антигена-мишени в концентрации приблизительно 50 мкг/мл. Антиген-мишень можно заменить потенциальными белками или субфрагментами для картирования местоположения толерогенных эпитопов. Секрецию цитокинов в среду можно количественно определить с помощью стандартного иммунологического анализа.

Способность клеток подавлять активность других клеток можно определить с использованием выделенных клеток животного, иммунизированного с использованием антигена-мишени, или путем создания клеточной линии, чувствительной к антигену-мишени (Ben-Nun et al., *Eur. J. Immunol.* 11:195, 1981, включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В одном варианте этого эксперимента популяцию клеток-супрессоров умеренно облучают (от приблизительно 1000 до 1250 рад) для

предотвращения пролиферации, супрессоры кокультивируют с иммунореактивными клетками и затем используют включение меченого тритием тимидина (или МТТ) для количественного определения пролиферативную активность иммунореактивных клеток. В другом варианте популяцию клеток-супрессоров и популяцию иммунореактивных клеток культивируют на верхнем и нижнем уровнях двухкамерной культуральной системы Трансвелл (Costar, Cambridge Mass.), которая позволяет коинкубировать данные популяции в пределах 1 мм друг от друга, разделенные поликарбонатной мембраной (WO 93/16724). При использовании этого подхода облучение популяции клеток-супрессоров не является необходимым, поскольку пролиферативную активность иммунореактивных клеток можно измерить отдельно.

В вариантах реализации изобретения, в случае, когда антиген-мишень уже присутствует в организме индивидуума, нет необходимости в выделении антигена или предварительном объединении его с компонентом, обеспечивающим связывание со слизистой оболочкой. Например, антиген может быть экспрессирован в организме индивидуума определенным образом в результате патологического состояния (такого как воспалительное заболевания кишечника или целиакия) или посредством переваривания пищевого аллергена. Испытание осуществляют путем предоставления компонента, обеспечивающего связывание со слизистой оболочкой, в одной или нескольких дозах или составах и путем определения его способности содействовать толеризации против антигена *in situ*.

Эффективность композиций и способов введения для лечения конкретного заболевания также может быть подробно изучена в соответствующей модели заболевания на животных. Возможность снижения интенсивности или задержки развития симптомов заболевания с помощью лечения контролируется на уровне биохимических и иммунологических показателей крови, характерных для заболевания, иммуногистологии пораженной ткани и макроскопических клинических признаков в зависимости от используемой модели. Примеры моделей на животных, не ограничивающие объем изобретения, которые могут быть использованы для испытания, включены в следующий раздел.

В изобретении предполагается модуляция толерантности путем модуляции ответа ТН1, ответа ТН2, ответа ТН17 или комбинации этих ответов. Модуляция ответа ТН1 охватывает изменение экспрессии, например, интерферона-гамма. Модуляция ответа ТН2 охватывает изменение экспрессии, например, любой комбинации ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13. Характерно, что увеличение (уменьшение) степени ответа ТН2 будет включать увеличение (уменьшение) экспрессии по меньшей мере одного из ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 или ИЛ-13; более характерно, что увеличение (уменьшение) степени ответа ТН2 будет включать увеличение экспрессии по меньшей мере двух из ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 или ИЛ-13, наиболее характерно, что увеличение (уменьшение) степени ответа ТН2 будет включать увеличение экспрессии по меньшей мере троих из ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 или ИЛ-13, тогда как в идеальном случае увеличение (уменьшение) степени ответа ТН2 будет включать увеличение (уменьшение) экспрессии всех из ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13. Модуляция ТН 17 охватывает изменение экспрессии, например, TGF-бета, ИЛ-6, ИЛ-21 и ИЛ-23 и влияет на уровни ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-22.

В данной области техники подразумеваются другие подходящие способы оценки эффективности композиций и способов по настоящему изобретению, которые рассмотрены, например, в заявке на патент США. 2012/0076831 (включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

Определенные варианты реализации изобретения относятся к выработке

иммунологической толерантности у индивидуума, у которого ранее не вызывали толерантность посредством терапевтического воздействия. Эти варианты реализации изобретения, в целом, включают множество введений комбинации антигена и компонента, обеспечивающего связывание со слизистой оболочкой. Как правило, осуществляется по меньшей мере три введения, часто по меньшей мере четыре введения и иногда по меньшей мере шесть введений на протяжении предварительной иммунизации для достижения продолжительного результата, хотя у субъекта могут отмечаться признаки толерантности на ранних этапах в ходе лечения. Чаще всего, каждая доза предоставляется в виде болюсного введения, но составы с замедленным высвобождением, способные высвобождаться в слизистую оболочку, также являются подходящими. В случаях, когда осуществляются многократные введения интервал между введениями, в целом, составляет от 1 дней до 3 недель и, как правило, от приблизительно 3 дней до 2 недель. В целом, используется один и тот же антиген и компонент, обеспечивающий связывание со слизистой оболочкой, в той же самой концентрации, и введение осуществляется в ту же самую поверхность слизистой оболочки, но в ходе курса лечения можно изменять любые из этих переменных.

Другие варианты реализации изобретения относятся к бустингу или увеличению продолжительности ранее установившейся иммунологической толерантности. Эти варианты реализации изобретения, в целом, включают одно введение или краткий курс лечения на момент времени, когда установившаяся толерантность уменьшается или находится под угрозой уменьшения. Бустинг, в целом, осуществляется от 1 месяца до 1 года и, как правило, от 2 до 6 месяцев после предварительной иммунизации или предыдущей бустер-инъекции. Данное изобретение также включает варианты реализации, которые включают регулярное поддержание толерантности по схеме введений, которые происходят два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели или по любой другой регулярной схеме.

Частицы настоящего изобретения могут предоставляться в любой дозе, эффективной для ослабления воспалительного иммунного ответа у субъекта, который в этом нуждается, или для лечения бактериальной или вирусной инфекции у субъекта, который в этом нуждается. В определенных вариантах реализации изобретения индивидууму предоставляется от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^{20} частиц. В дополнительном варианте реализации изобретения предоставляется от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^{15} частиц. В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения предоставляется от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^{12} частиц. В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения предоставляется от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{10} частиц. В предпочтительном варианте реализации изобретения предпочтительная доза составляет 0,1% твердых частиц/мл. Следовательно, для 0,5 мкм гранул предпочтительная доза составляет приблизительно 4×10^9 гранул, для 0,05 мкм гранул предпочтительная доза составляет приблизительно 4×10^{12} гранул, для 3 мкм гранул предпочтительная доза составляет 2×10^7 гранул. Однако любая доза, которая является эффективной при лечении конкретного состояния, которое подлежит лечению, охвачена настоящим изобретением.

Изобретение является пригодным для лечения иммунологических нарушений, таких как аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантата и аллергические реакции. Замена на систему, состоящую из синтетических, биосовместимых частиц, для индукции иммунологической толерантности может привести к облегчению производства,

увеличению доступности терапевтических средств, увеличению однородности между образцами, расширению потенциальной зоны воздействия препарата и очень сильному уменьшению потенциала для аллергических реакций на клетку-переносчик.

В данном контексте термин "иммунный ответ" включает иммунные ответы, опосредованные Т-клетками и/или В-клетками. Иллюстративные иммунные ответы включают Т-клеточные ответы, например, продукцию цитокинов и клеточно-опосредованную цитотоксичность. В дополнение к этому, термин иммунный ответ включает иммунные ответы, на которые косвенно влияет активация Т-клеток, например, продукция антител (гуморальные ответы) и активация клеток, чувствительных к цитокинам, например, макрофагов. Иммунокомпетентные клетки, вовлеченные в развитие иммунного ответа, включают лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки ($CD4^+$, $CD8^+$, Th1- и Th2-клетки); антиген-презентирующие клетки (например, профессиональные антиген-презентирующие клетки, такие как дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты, клетки Лангерганса, и непрофессиональные антиген-презентирующие клетки, такие как кератиноциты, эндотелиальные клетки, астроциты, фибробласты, олигодендроциты); натуральные киллеры; миелоидные клетки, такие как макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные частицы по настоящему изобретению эффективно уменьшают миграцию воспалительных клеток к очагу воспаления.

В данном контексте термин "анергия", "толерантность" или "антиген-специфическая толерантность" относится к нечувствительности Т-клеток к стимуляции, опосредованной Т-клеточным рецептором. Такая нечувствительность, в целом, является антиген-специфической и сохраняется после прекращения воздействия антигенного пептида. Например, анергия в Т-клетках характеризуется отсутствием продукции цитокинов, например, ИЛ-2. Т-клеточная анергия возникает в случаях, когда Т-клетки подвергаются воздействию антигена и получают первый сигнал (сигнал, опосредованный Т-клеточным рецептором или CD-3) в отсутствие второго сигнала (костимулирующего сигнала). В этих условиях повторное воздействие того же самого антигена на клетки (даже, если повторное воздействие происходит в присутствии костимулирующей молекулы) приводит к неспособности продуцировать цитокины и впоследствии к неспособности пролиферировать. Таким образом, неспособность продуцировать цитокины препятствует пролиферации. Анергические Т-клетки однако могут пролиферировать при культивировании с цитокинами (например, ИЛ-2). Например, Т-клеточная анергия также может наблюдаться по отсутствию продукции ИЛ-2 Т-лимфоцитами согласно измерениям с помощью ИФА или с помощью теста на пролиферацию с использованием индикаторной клеточной линии. В альтернативном варианте может быть использована репортерная генетическая конструкция. Например, в анергических Т-клетках невозможна инициация транскрипции гена DL-2, индуцированной гетерологичным промотором под контролем энхансера, расположенного на 5'-конце гена ИЛ-2, или последовательностью, с которой связывается мультимерный API, которая может находиться в пределах энхансера (Kang et al. 1992 Science. 257:1134).

В данном контексте термин "иммунологическая толерантность" относится к способам, применяемым в отношении определенной доли субъектов, получающих лечение, по сравнению с субъектами, не получающими лечение, причем: а) снижается уровень специфического иммунологического ответа (который, как предполагается, опосредован по меньшей мере частично антиген-специфическими эффекторными Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, антителами или их эквивалентами); б) происходит задержка начала

или развития специфического иммунологического ответа; или в) снижается риск начала или развития специфического иммунологического ответа. "Специфическая" иммунологическая толерантность возникает в случаях, когда иммунологическая толерантность преимущественно вырабатывается к определенным антигенам по сравнению с другими. Иммунологическая толерантность является "неспецифической", если она неизбирательно направлена против антигенов, вызывающих воспалительный иммунный ответ. Иммунологическая толерантность является "квазиспецифической", если она полуизбирательно направлена против антигенов, вызывающих иммунопатологический ответ, но не против остальных антигенов, обуславливающих защитную иммунный ответ организма.

Толерантность к аутоантигенам и аутоиммунному заболеванию достигается посредством целого ряда механизмов, включая отрицательную селекцию аутореактивных Т-клеток в тимусе и механизмы периферической толерантности в отношении тех аутореактивных Т-клеток, которые избегают деплеции в тимусе и находятся в периферических органах. Примеры механизмов, которые обеспечивают периферическую Т-клеточную толерантность, включают "игнорирование" собственных антигенов, анергию или неотвечаемость на аутоантиген, цитокин-индуцированную девиацию иммунного ответа и клеточную гибель, индуцированную активацией аутореактивных Т-клеток. В дополнение к этому, было показано, что регуляторные Т-клетки вовлечены в процесс, опосредующий периферическую толерантность. См., например, Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11-19; Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182:58-67. В некоторых ситуациях периферическая толерантность к аутоантигену исчезает (или нарушается), и в результате этого возникает аутоиммунный ответ. Например, в модели ЭАЭ на животных было показано, что активация антиген-презентирующих клеток (АПК) через рецепторы врожденного иммунитета TLR нарушает ауто толерантность и приводит к индукции ЭАЭ (Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:990-997).

Соответственно, в определенных вариантах реализации изобретения предложены способы повышения степени презентации антигенов с подавлением или уменьшением стимуляции клеток, зависимой от TLR7/8, TLR9 и/или TLR 7/8/9. Как описано в данном документе, введение конкретных модифицированных частиц приводит к презентации антигенов ДК или АПК с подавлением клеточных ответов, зависимых от TLR 7/8, TLR9 и/или TLR7/8/9, ассоциированных с иммуностимулирующими полинуклеотидами. Такая супрессия может включать снижение уровней одного или нескольких TLR-ассоциированных цитокинов.

Как обсуждалось выше, в этом изобретении предложены новые соединения, которые обладают биологическими свойствами, полезными для лечения нарушений, опосредованных Mac-1 и LFA-1.

Соответственно, в другом аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, которые содержат иммуномодифицирующие частицы и необязательно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В определенных вариантах реализации изобретения эти композиции необязательно дополнительно содержат одно или несколько дополнительных терапевтических средств. В альтернативном варианте модифицированные частицы настоящего изобретения можно вводить пациенту, который в этом нуждается, в комбинации с введением одного или нескольких других терапевтических средств. Например, в качестве дополнительных терапевтических средств для совместного введения или включения в фармацевтическую композицию с соединением по настоящему изобретению может выступать одобренное для применения противовоспалительное средство или в качестве него может выступать

любое средство из целого ряда средств, находящихся в процессе одобрения в Управлении по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, которые в конечном итоге получают одобрение для лечения любого нарушения, характеризующегося неконтролируемым воспалительным иммунным ответом или бактериальной или вирусной инфекцией. Также будет понятно, что некоторые из модифицированных частиц по настоящему изобретению могут встречаться в свободной форме для лечения или в требуемых случаях в виде их фармацевтически приемлемых производных.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, который в данном контексте включает все или часть растворителей, разбавителей или другой жидкий носитель, вспомогательные вещества для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные вещества, изотонические вещества, загустители или эмульгирующие вещества, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и тому подобное, что подходит для получения конкретной желаемой лекарственной формы. В Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) описаны различные носители, используемые для составления фармацевтических композиций, и известные методы их получения. За исключением случаев, когда любая общепринятая несущая среда является несовместимой с соединениями по настоящему изобретению, как, например, за счет оказания любого нежелательного биологического эффекта или в иных случаях за счет нежелательного взаимодействия с любым другим компонентом (компонентами) фармацевтической композиции, ее использование предусмотрено в пределах объема настоящего изобретения. Некоторые примеры веществ, которые могут выступать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но без ограничений, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски, используемые для приготовления суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло; сафлоровое масло, кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатно-буферные растворы, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разрыхлители, покрывающие вещества, подсластители, усилители вкуса и запаха, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композиции по усмотрению специалиста, составляющего рецептуру.

Жидкие лекарственные формы для перорального применения включают, но без ограничений, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерол, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры

жирных кислот и сорбитана и их смеси. Помимо инертных разбавителей композиции для перорального применения также могут включать адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, усилители вкуса и запаха.

Частицы по настоящему изобретению можно вводить перорально, назально, внутривенно, внутримышечно, в ткани глаза, трансдермально, внутрибрюшинно или подкожно. В одном варианте реализации частицы по настоящему изобретению вводят внутривенно.

Эффективные количества и способ введения по настоящему изобретению для модуляции иммунного ответа может варьировать в зависимости от индивидуума, какое состояние подлежит лечению и других факторов, очевидных для специалиста в данной области техники. Факторы, которые должны учитываться, включают путь введения и число доз, которые должны быть введены. Такие факторы известны в данной области техники и могут быть установлены специалистами в данной области техники для проведения таких определений без проведения дополнительных экспериментов.

Подходящий диапазон доз - это диапазон, который обеспечивает требуемую регуляцию иммунного ответа. Подходящие диапазоны доз переносчика, назначаемых исходя из количества доставляемого переносчика, могут находиться, например, приблизительно в следующих пределах: от 0,5 до 10 мг/кг, от 1 до 9 мг/кг, от 2 до 8 мг/кг, от 3 до 7 мг/кг, от 4 до 6 мг/кг, 5 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 5 до 10 мг/кг. В альтернативном варианте доза может вводиться исходя из числа частиц. Например, подходящие дозы переносчика, назначаемые исходя из количества доставляемого переносчика, могут составлять, например, приблизительно 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или большее число частиц на дозу.

Абсолютное количество, назначаемое каждому пациенту, зависит от фармакологических свойств, таких как биодоступность, скорость клиренса и путь введения. Детальная информация по фармацевтически приемлемым носителям, разбавителям и вспомогательным веществам и способам приготовления фармацевтических композиций и составов приводится в Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Edition, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Эффективное количество и способ введения переносчика с конкретным составом может варьировать в зависимости от отдельного пациента, искомого результата и/или типа нарушения, стадии заболевания и других факторов, очевидных для специалиста в данной области техники. Путь(и) введения, подходящие для конкретного применения, понятны специалисту в данной области техники. Пути введения включают, но без ограничений, местный, дермальный, трансдермальный, трансмукозальный, эпидермальный, парентеральный, гастроинтестинальный и назофарингеальный и пульмональный, включая трансбронхиальный и трансальвеолярный. Подходящий диапазон доз - это диапазон, который обеспечивает достаточное количество IRP-содержащей композиции для достижения концентрации в ткани приблизительно 1-50 мкМ, которая измеряется по уровням в крови. Абсолютное количество, назначаемое каждому пациенту, зависит от фармакологических свойств, таких как биодоступность, скорость клиренса и путь введения.

В настоящем изобретении предложены составы переносчиков, подходящие для местного применения, включая, но без ограничений, физиологически приемлемые имплантаты, мази, кремы, растворы для промываний и гели. Иллюстративные пути дермального введения - это пути, которые являются наименее инвазивными, такие как трансдермальный перенос, эпидермальное введение и подкожная инъекция.

5

20

30

35

45

изотонический раствор хлорида натрия. В дополнение к этому, обычно используются стерильные, нелетучие масла в качестве растворителя или суспендирующей среды. С этой целью может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. В дополнение к этому, в ходе приготовления инъекционных препаратов используются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Инъекционные лекарственные формы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через фильтр, задерживающий бактерии, или путем включения стерилизующих веществ в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворить или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде до применения.

Для пролонгации эффекта лекарственного средства часто бывает желательно снизить скорость абсорбции лекарственного средства после подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществить путем использования жидкой суспензии или кристаллического, или аморфного вещества со слабой растворимостью в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства, таким образом, зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. В альтернативном варианте задержка абсорбции лекарственной формы, вводимой парентерально, достигается за счет растворения или суспендирования лекарственного средства в масле. Инъекционные формы пролонгированного действия получают путем формирования матриц микрокапсул, содержащих лекарственное средство, из биоразлагаемых полимеров, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера и природы конкретного используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают сложные (поли(ортоэфир) и поли(ангидриды)). Инъекционные формы пролонгированного действия также получают путем включения лекарственного средства в состав липосом или микроэмульсий, которые являются совместимыми с тканями организма.

В определенных вариантах реализации изобретения применение синтетических, биоразлагаемых частиц по настоящему изобретению обеспечивает облегчение производства, увеличение доступности терапевтических средств и расширение зоны воздействия препарата. В конкретных вариантах реализации изобретения поверхностно-функционализированные биоразлагаемые частицы сополимера лактида и гликолида с карбоксильными группами, расположенными на поверхности с высокой плотностью, синтезированные с использованием поверхностно-активного сополимера этилена и малеинового ангидрида, обеспечивают получение переносчика, который дает многочисленные преимущества по сравнению с другими частицами-переносчиками и/или поверхностями. В экспериментах, проведенных в ходе разработки вариантов реализации изобретения, было продемонстрировано конъюгирование пептидов (например, пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁) с этими частицами. Было показано, что такие частицы, связанные с пептидом, являются эффективно предотвращающими развитие заболевания и индуцируют иммунологическую толерантность (например, в модели рассеянного склероза на мышцах линии SJL/J с Р-ЭАЭ, вызванным введением PLP₁₃₉₋₁₅₁ /CFA).

Переносчики, связанные с пептидами, по настоящему изобретению предоставляют многочисленные преимущества по сравнению с другими структурами, применяемыми для индукции толерантности. В определенных вариантах реализации изобретения частицы являются биоразлагаемыми и, следовательно, не будут сохраняться в организме в течение длительного времени. Время, необходимое для полного разложения, можно

контролировать. В определенных вариантах реализации изобретения частицы функционализированы с целью облегчения интернализации в отсутствие активации клеток (например, за счет загрузки фосфатидилсерина в микросферы, состоящие PLG). В определенных вариантах реализации изобретения в состав частиц включены лиганды для направленного воздействия на конкретную популяцию клеток. В определенных вариантах реализации изобретения противовоспалительные цитокины, такие как ИЛ-10 и TGF- β , содержатся на поверхности или в частицах для ограничения активация типа клеток, которые поглощают данные частицы, и для облегчения индукции толерантности за счет анергии и/или деплеции и/или активации регуляторных Т-клеток.

Твердые лекарственные формы для перорального применения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. При изготовлении таких твердых лекарственных форм модифицированные частицы смешивают по меньшей мере с одним инертным, фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, таким как цитрат натрия или гидроортофосфат кальция и/или а) наполнителями или увеличителями объема, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и камедь, в) увлажнителями, такими как глицерол, г) дезинтегрантами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия, д) веществами, замедляющими растворение, такими как парафин, е) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония, ж) смачивающими средствами, такими как, например, цетиловый спирт и глицеролмоностеарат, з) абсорбирующими веществами, такими как каолин и бентонитовая глина и и) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма также может содержать буферные вещества.

Твердые формы композиций аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в желатиновых капсулах, заполняемых в мягком или жестком состоянии, с использованием таких вспомогательных веществ как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное. Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с использованием покрытий и оболочек, таких как энтеросолнубильные покрытия и другие покрытия, широко известные в области составления фармацевтических рецептур. Они могут необязательно содержать вещества, обеспечивающие непрозрачность, и также могут иметь такой состав, который обеспечивает высвобождение активного ингредиента(ов) исключительно или преимущественно в определенной части кишечника необязательно с замедленным высвобождением. Примеры вспомогательных веществ, которые могут быть использованы, включают полимерные вещества и воски. Твердые формы композиций аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в желатиновых капсулах, заполняемых в мягком или жестком состоянии, с использованием таких вспомогательных веществ как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное.

Модифицированные частицы также могут быть получены в форме микрокапсул с одним или несколькими вспомогательными веществами, которые отмечались выше. Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с использованием покрытий и оболочек, таких как

энтеросолюбильные покрытия, покрытия для контролируемого высвобождения и другие покрытия, широко известные в области составления фармацевтических рецептов. В таких твердых лекарственных формах активное соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, такие как сахароза, лактоза и крахмал.

5 Такие лекарственные формы также могут содержать согласно установившейся практике дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например, смазывающие вещества, используемые для приготовления таблеток, и другие вспомогательные вещества, используемые для приготовления таблеток, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные
10 формы также могут содержать буферные вещества. Они могут необязательно содержать вещества, обеспечивающие непрозрачность, и также могут иметь такой состав, который обеспечивает высвобождение модифицированных частиц исключительно или преимущественно в определенной части кишечника необязательно с замедленным высвобождением. Примеры вспомогательных веществ, которые могут быть
15 использованы, включают полимерные вещества и воски.

Настоящее изобретение охватывает фармацевтически приемлемые составы для наружного применения модифицированных частиц по настоящему изобретению. Термин "фармацевтически приемлемый состав для наружного применения" в данном контексте означает любой состав, который является фармацевтически приемлемым для
20 внутридермального введения модифицированных микрочастиц по настоящему изобретению путем нанесения состава на эпидермис. В некоторых вариантах реализации изобретения состав для наружного применения содержит несущую систему. Фармацевтически эффективные носители включают, но без ограничений, растворители (например, спирты, полиспирты, вода), кремы, лосьоны, мази, масла, пластыри,
25 липосомы, порошки, эмульсии, микроэмульсии и буферные растворы (например, гипотонический или буферный солевой раствор) или любой другой носитель, известный в данной области техники в отношении местного применения фармацевтических препаратов. Более полный перечень известных в данной области техники носителей приведен в источниках литературы, которые стандартно используются в данной области
30 техники, например, Remington's Pharmaceutical Sciencess, 16th Edition, 1980 and 17th Edition, 1985, причем оба из них опубликованы Mack Publishing Company, Easton, Pa., описания которых включены в данный документ в полном их объеме посредством ссылки. В некоторых других вариантах реализации изобретения составы для наружного применения по настоящему изобретению могут содержать вспомогательные вещества.
35 Любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, известное в данной области техники, может быть использовано для приготовления фармацевтически приемлемых составов для наружного применения по настоящему изобретению. Примеры вспомогательных веществ, которые могут быть включены в составы для наружного применения по настоящему изобретению включают, но без ограничений, консерванты,
40 антиоксиданты, увлажнители, смягчающие средства, буферные вещества, солибилизирующие агенты, другие средства, усиливающие проникновение через кожу, защитные средства для кожи, поверхностно-активные вещества и пропелленты и/или дополнительные терапевтические средства, используемые в комбинации с модифицированными частицами. Подходящие консерванты включают, но без
45 ограничений, спирты, четвертичные амины, органические кислоты, парабены и фенолы. Подходящие антиоксиданты включают, но без ограничений, аскорбиновую кислоту и ее сложные эфиры, бисульфит натрия, бутилированный гидрокситолуол, бутилированный гидроксанизол, токоферолы и хелатирующие агенты наподобие

ЭДТК и лимонной кислоты. Подходящие увлажнители включают, но без ограничений, глицерин, сорбит, полиэтиленгликоли, мочевины и пропиленгликоль. Подходящие буферные вещества для использования с изобретением включают, но без ограничений, буферы на основе лимонной, соляной и молочной кислоты. Подходящие

5 солюбилизующие агенты включают, но без ограничений, четвертичные хлориды аммония, циклодекстрины, бензилбензоат, лецитин и полисорбаты. Подходящие защитные средства для кожи, которые могут быть использованы в составах для наружного применения по настоящему изобретению включают, но без ограничений, масло с витамином Е, аллантоин, диметикон, глицерин, вазелин и оксид цинка.

10 В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемые составы для наружного применения изобретения содержат по меньшей мере модифицированные частицы по настоящему изобретению и агент, усиливающий проникновение. Выбор состава для наружного применения будет зависеть от нескольких факторов, включая состояние, которое подлежит лечению, физико-химические свойства

15 соединения по настоящему изобретению и других присутствующих вспомогательных веществ, их стабильность в составе, доступное производственное оборудование и ограничения на затраты. В данном контексте термин "агент, усиливающий проникновение" означает агент, способный транспортировать фармакологически активное соединение через роговой слой и в эпидермис или дерму, предпочтительно с

20 незначительным или без системного впитывания. Большое число соединений было оценено на предмет их эффективности в отношении повышения скорости проникновения лекарственных средств через кожу. См., например, Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach H. I. and Smith H. E. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995), в котором исследуется использование и испытание различных агентов, усиливающих

25 проникновение через кожу, и Buyuktimkin et al., Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems, Gosh T. K., Pfister W. R., Yum S. I. (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, Ill. (1997). В определенных иллюстративных вариантах реализации изобретения средства, усиливающие

30 проникновение через кожу, для использования с изобретением включают, но без ограничений, триглицериды (например, соевое масло), композиции на основе алоэ (например, гель Алоэ Вера), этиловый спирт, изопропиловый спирт, октилфенилполиэтиленгликоль, олеиновую кислоту, полиэтиленгликоль 400, пропиленгликоль, N-децилметилсульфоксид, сложные эфиры жирных кислот (например, изопропилмиристит, метиллаурат, глицеролмоноолеат и пропиленгликольмоноолеат)

35 и N-метилпирролидон.

В определенных вариантах реализации изобретения композиции могут быть изготовлены в форме мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, порошков, растворов, спреев, средств для ингаляции или пластырей. В определенных иллюстративных вариантах реализации изобретения лекарственными формами композиций по изобретению являются

40 кремы, которые могут дополнительно содержать насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, такие как стеариновая кислота, пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, пальмитолеиновая кислота, цетиловые или олеиловые спирты, причем предпочтительной, в частности, является стеариновая кислота. Кремы по настоящему изобретению также могут содержать неионогенные поверхностно-активные вещества,

45 например, полиоксил-40-стеарат. В определенных вариантах реализации изобретения активный компонент смешивается в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и при необходимости с любыми необходимыми консервантами или буферами. В пределах объема настоящего изобретения также предполагается

использование глазной лекарственной формы, ушных капель и глазных капель. В дополнение к этому, в настоящем изобретении предполагается использование трансдермальных аппликаторов, которые обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в обеспечении контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы получают путем растворения или распределения соединения в соответствующей среде. Как обсуждалось выше, также могут быть использованы средства, усиливающие проникновение, для увеличения скорости поступления соединения изобретения через кожу. Скорость проникновения можно контролировать либо путем обеспечения мембраны, контролирующей скорость, либо диспергированием соединения изобретения в полимерной матрице или геле.

Модифицированные частицы могут вводиться в составе аэрозоля. Это достигается за счет приготовления водного аэрозоля, липосомного препарата или твердых частиц, содержащих модифицированные частицы. Можно использовать неводную суспензию (например, фторуглеродный пропеллент).

Обычно водный аэрозоль получают путем приготовления водного раствора или суспензии агента вместе с общепринятыми фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы изменяются в зависимости от требований для получения конкретного соединения, но как правило, включают неионогенные поверхностно-активные вещества (твины, плуроники или полиэтиленгликоль), нетоксичные белки как сывороточный альбумин, сложные эфиры сорбитана, олеиновую кислоту, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахарные спирты. Аэрозоли, в целом, готовятся на основе изотонических растворов.

Также будет понятно, что лекарственные формы модифицированных частиц и фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут быть приготовлены и использованы в методах комбинированной терапии, то есть, лекарственные формы соединений и фармацевтических композиций могут быть приготовлены с или могут быть введены одновременно с, до или после введения одного или нескольких других терапевтических средств или медицинских процедур. В конкретной комбинации методов терапии (терапевтические средства или процедуры), которая может быть использована в комбинированном режиме, будут учитываться совместимость желаемых терапевтических средств и/или процедур и достижение желаемого терапевтического эффекта. Также будет понятно, что за счет используемых методов терапии можно достичь желаемого эффекта в отношении одного и того же нарушения (например, соединение по настоящему изобретению можно вводить одновременно с другим противовоспалительным средством), или за счет них можно достичь разных эффектов (например, контроль любых неблагоприятных эффектов).

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие модифицированные частицы по настоящему изобретению, дополнительно содержат один или несколько дополнительных терапевтически активных ингредиентов (например, противовоспалительные и/или паллиативные). Для целей изобретения термин "паллиативный" относится к лечению, которое направлено на ослабление симптомов заболевания и/или побочных эффектов терапевтического режима, но не направлено на излечение. Например, паллиативное лечение охватывает обезболивающие средства, противорвотные препараты и лекарственные средства против тошноты.

В изобретении предложены способы регуляции иммунного ответа у индивидуума, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, включающие введение индивидууму модифицированных частиц, описанных в данном документе. Способы иммунорегуляции, предусмотренные изобретением, включают способы,

которые способствуют подавлению и/или ингибированию врожденного иммунного ответа или адаптивного иммунного ответа, включая, но без ограничений, иммунный ответ, вызываемый иммуностимулирующими полипептидами или вирусными или бактериальными компонентами.

5 Модифицированные частицы вводят в количестве, достаточном для регуляции иммунного ответа. Как описано в данном документе, регуляция иммунного ответа, может быть гуморальной и/или клеточно-опосредованной, и определяется с использованием стандартных методов, известных в данной области техники, и которые описаны в данном документе.

10 В определенных вариантах реализации изобретения композиции, описанные в данном документе, вводят наряду с (например, одновременно с, до или после) имплантатом (например, устройством) и/или трансплантатом (например, ткань, клетки, орган) для опосредования, устранения, регуляции и/или уменьшения иммунного ответа, ассоциированного с этим.

15 В определенных вариантах реализации изобретения индивидуум страдает от нарушения, ассоциированного с нежелательной активацией иммунной системы, как, например, в случае аллергического заболевания или состояния, аллергии и астмы. Индивидуум, страдающий аллергическим заболеванием или астмой - это индивидуум с узнаваемыми симптомами имеющегося аллергического заболевания или астмы.

20 Толерантность может быть индуцирована у такого индивидуума, например, за счет использования частиц, образующих комплекс со специфическими пищевыми аллергенами (например, белки арахиса и т.д.), вводимыми веществами (например, белки пчелиного яда и т.д.) или вдыхаемыми веществами (например, белки пыльцы амброзии, белки, содержащиеся в перхоти домашних животных и т.д.), которые вызывают
25 аллергическую реакцию.

В определенных вариантах реализации изобретения индивидуум страдает от нарушения, ассоциированного с нежелательной активацией иммунной системы, как, например, в случае аутоиммунного заболевания и воспалительного заболевания. Индивидуум, страдающий аутоиммунным заболеванием или воспалительным
30 заболеванием - это индивидуум с узнаваемыми симптомами имеющегося аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. Толерантность может быть индуцирована у такого индивидуума, например, за счет использования частиц, образующих комплекс с соответствующими аутоантигенами, ассоциированными с конкретным аутоиммунным заболеванием.

35 В определенных вариантах реализации изобретения индивидуум страдает от нарушения, ассоциированного с заместительной терапией ферментами. У такого индивидуума толерантность может быть индуцирована, например, за счет использования частиц, образующих комплекс с ферментами, которые не могут вырабатываться в организме пациентов с генетически обусловленной недостаточностью, для
40 предотвращения выработки в их организме нейтрализующих антител к ферментам, полученным с помощью технологии рекомбинантной ДНК, вводимых для лечения, направленного конкретно на восполнение их недостатка, например, толерантность к фактору VIII у пациентов с гемофилией вследствие генетически обусловленной неспособности вырабатывать фактор VIII.

45 В определенных вариантах реализации изобретения индивидуум страдает от нарушения, ассоциированного с терапией заболевания. В случае рекомбинантных антител толерантность индуцируется, например, к гуманизированным антителам, используемым в контексте терапии, чтобы предотвратить выработку в организме

пациента нейтрализующих антител к антителам, содержащемуся в лекарственном препарате, например, толерантность к гуманизированному антителу, ассоциированному с уменьшением количества иммунных клеток определенной субпопуляции, или антителам к цитокинам, используемым для лечения аутоиммунного заболевания.

5 Аутоиммунные заболевания можно разделить на две обширные категории: органоспецифические и системные. Аутоиммунные заболевания включают, без ограничения, ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), сахарный диабет I-го типа, сахарный диабет II-го типа, рассеянный склероз (MS), иммуно-
 10 опосредованное бесплодие, как, например, преждевременная недостаточность яичников, склеродермию, болезнь Шегрена, витилиго, алопецию (облысение), полигландулярную недостаточность, болезнь Грейвса, гипотиреоз, полимиозит, вульгарный пемфигус, листовидный пемфигус, воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, аутоиммунный гепатит, включая, гепатит, ассоциированный с вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита С (HCV), гипопитуитаризм, болезнь
 15 "трансплантат против хозяина" (GvHD), миокардит, болезнь Аддисона, аутоиммунные заболевания кожи, увеит, пернициозную анемию, целиакию и гипопаратиреоз.

Аутоиммунные заболевания также могут включать, без ограничения, тиреоидит Хашимото, аутоиммунные полигландулярные синдромы типа I и типа II, паранеопластический пемфигOID, буллезный пемфигOID, герпетический дерматит,
 20 линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловатую эритему, пемфигOID беременных, рубцующийся пемфигOID, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, детский хронический буллезный дерматоз, гемолитическую анемию, тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Гудпасчера, аутоиммунную нейтропению, миастению, миастенический синдром Ламберта-Итона,
 25 синдром скованного человека, острый рассеянный энцефаломиелит, синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию, мультифокальную двигательную нейропатию с блоком проведения, хроническую нейропатию с моноклональной гаммапатией, синдром опсоклонус-миоклонус, мозжечковую дегенерацию, энцефаломиелит, ретинопатию, первичный билиарный
 30 склероз, склерозирующий холангит, глютензависимую энтеропатию, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, полимиозит/дерматомиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Бехчета, псориаз, узелковый полиартериит, аллергический васкулит и гранулематоз (заболевание Чарга-Стросса), полиангиитный перекрестный синдром, лейкоцитокластический васкулит, гранулематоз Вегенера,
 35 темпоральный артериит, артериит Такаясу, заболевание Кавасаки, изолированный васкулит центральной нервной системы, облитерирующий тромбоангиит, саркоидоз, гломерулонефрит и криопатии. Эти состояния хорошо известны в области медицины и описаны, например, в Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed., Fauci A S et al., eds., New York: McGraw-Hill, 1998.

40 Модели на животных для исследования аутоиммунного заболевания известны в данной области техники. Например, модели на животных, которые обладают наибольшим сходством с аутоиммунным заболеванием человека, включают линии животных, у которых спонтанно развивается конкретное заболевание с высокой частотой возникновения. Примеры таких моделей включают, но без ограничений, не
 45 страдающих ожирением мышей с сахарным диабетом (NOD), у которых развивается заболевание, аналогичное сахарному диабету 1-го типа, и животных, склонных к развитию волчаночно-подобного заболевания, таких как гибридные новозеландские мыши линии MRL-Fas^{lpr} и BXSB. Модели на животных, в которых было индуцировано

аутоиммунное заболевание, включают, но без ограничений, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), который является моделью рассеянного склероза, коллаген-индуцированный артрит (CIA), который является моделью ревматоидного артрита и экспериментальный аутоиммунный увеит (EAU), который является моделью

5 увеита. Также были разработаны модели аутоиммунного заболевания на животных путем манипуляции с генами, и они включают, например, использование мышей с нокаутом ИЛ-2/ИЛ-10 в случае воспалительного заболевания кишечника, мышей с нокаутом Fas или лиганда Fas в случае SLE и мышей с нокаутом антагониста рецептора ИЛ-1 в случае ревматоидного артрита.

10 В определенных вариантах реализации изобретения индивидуум страдает от бактериальной или вирусной инфекции. Индивидуум, имеющий бактериальную или вирусную инфекцию - это индивидуум с узнаваемыми симптомами имеющейся бактериальной или вирусной инфекции.

Не ограничивающий объем изобретения перечень вирусных инфекций, поддающихся

15 лечению с использованием модифицированных частиц настоящего изобретения, включает герпесвирусные инфекции, инфекции, вызванные вирусом гепатита, инфекции, вызванные вирусом Западного Нила, флавивирусные инфекции, инфекции, вызванные вирусом гриппа, риновирусные инфекции, папилломовирусные инфекции, парамиксовирусные инфекции, вызванные вирусом парагриппа и ретровирусные

20 инфекции. Предпочтительными вирусами являются те вирусы, которые инфицируют центральную нервную систему субъекта. Наиболее предпочтительными вирусами являются вирусы, которые вызывают энцефалит или менингит.

Не ограничивающий объем изобретения перечень бактериальных инфекций, поддающихся лечению с использованием модифицированных частиц настоящего

25 изобретения, включает стафилококковые инфекции, стрептококковые инфекции, микобактериальные инфекции, инфекции, вызванные bacillus, инфекции, вызванные Salmonella, инфекции, вызванные Vibrio, инфекции, вызванные спирохетой и инфекции, вызванные Neisseria. Предпочтительными являются бактерии, которые инфицируют центральную нервную систему субъекта. Наиболее предпочтительными являются

30 бактерии, которые вызывают энцефалит или менингит.

В определенных вариантах реализации изобретение относится к применениям композиций по настоящему изобретению до начала заболевания. В других вариантах реализации изобретение относится к применениям композиций по настоящему изобретению для подавления развития текущего заболевания. В определенных вариантах

35 реализации изобретение относится к улучшению состояния больного субъекта. Подразумевается, что улучшения состояния больного субъекта включает лечение, профилактику или подавление развития заболевания у субъекта.

В определенных вариантах реализации изобретение относится к предотвращению рецидива заболевания. Например, может возникать нежелательный иммунный ответ

40 на одну область пептида (такую как антигенная детерминанта). Рецидив заболевания, ассоциированный с нежелательным иммунным ответом, может возникать в виде иммунной атаки на разные области пептида. Поскольку иммуномодифицирующие частицы настоящего изобретения не содержат присоединенных пептидов или антигенных групп, частицы будут эффективными против множества эпитопов. Т-клеточные ответы

45 при некоторых нарушениях иммунного ответа, включая MS и другие Th1 /17-опосредованные аутоиммунные заболевания, могут быть динамическими и развиваться на протяжении курса рецидивирующего-ремиттирующего и/или хронического-прогрессирующего заболевания. Динамическая природа Т-клеточного репертуара

оказывает влияние на лечение определенных заболеваний, поскольку мишень может изменяться по мере прогрессирования заболевания. Ранее для прогнозирования прогрессирования заболевания было необходимо заранее знать характер ответов. В настоящем изобретении предложены композиции, которые могут предотвращать

5 последствие динамически изменяемого заболевания в зависимости от "распространения эпитопа". Известной моделью рецидива является иммунная реакция на протеолипидный белок (PLP), как модель рассеянного склероза (MS). Первоначальный иммунный ответ может возникать из-за ответа на PLP139-15. Последующее появление заболевания может возникать из-за рецидива иммунного ответа на PLP[pi]s-i i.

10 Другие варианты реализации изобретения относятся к трансплантации. Она относится к переносу образца ткани или трансплантата от индивидуума-донора индивидууму-реципиенту и часто осуществляется на людях-реципиентах, которым необходима данная ткань для восстановления физиологической функции, обеспечиваемой данной тканью. Ткани, которые трансплантируют, включают (но без ограничений) целые органы, такие

15 как почка, печень, сердце, легкое; компоненты органов, такие как кожные трансплантаты и роговая оболочка глаза; и суспензии клеток, таких как клетки костного мозга и культуры выделенных и размноженных клеток костного мозга или циркулирующей крови, и клеток цельной крови для переливания.

Серьезное потенциальное осложнение при любой трансплантации происходит от

20 антигенных различий между тканью хозяина-реципиента и трансплантируемой тканью. В зависимости от природы и степени различия может возникнуть риск иммунологической атаки трансплантата против хозяина или хозяина против трансплантата, или могут произойти обе атаки. Степень риска определяется путем наблюдения за характером ответа в популяции субъектов, получивших аналогичное лечение, с аналогичным

25 фенотипом, и путем корреляции различных возможных сопутствующих факторов согласно общепринятым клиническим процедурам. Иммунологическая атака может происходить в результате предсуществующего иммунологического ответа (как, например, опосредованного антителами) или ответа, который начинается

приблизительно во время трансплантации (как, например, образование клеток ТН).

30 Антитело, клетки ТН или клетки Тс могут быть включены в любой комбинации друг с другом и с различными эффекторными молекулами и клетками. Однако антигены, которые вовлечены в развитие иммунного ответа, в целом, не известны, что, следовательно, представляет трудности для разработки антиген-специфических терапевтических средств или индукции антиген-специфической толерантности.

35 Определенные варианты реализации изобретения относятся к снижению риска развития заболевания "хозяин против трансплантата", которое приводит к отторжению тканевого трансплантата реципиентом. Лечение можно проводить для предотвращения или уменьшения последствия сверхострого, острого или хронического отторжения. Лечение преимущественно начинают проводить достаточно заблаговременно до

40 трансплантации, так чтобы на момент введения трансплантата толерантность была выработана; но в случаях, когда это невозможно, лечение можно начать одновременно с или после трансплантации. Независимо от времени начала лечения, в целом, будет продолжаться через равные промежутки времени по меньшей мере в течение первого месяца после трансплантации. Последующие дозы могут не потребоваться, если

45 наблюдается достаточная приживаемость трансплантата, но введение можно возобновить, если имеется любое доказательство отторжения или воспаления, вызванного трансплантацией. Конечно, процедуры толеризации по настоящему изобретению можно объединить с другими формами иммуносупрессии для достижения

равноценного более низкого уровня риска.

В определенных вариантах реализации изобретения композиции по настоящему изобретению (например, переносчик PLG, связанный с антигенной молекулой) находят применение с одним или несколькими каркасами, матрицами и/или системами доставки (см., например, заявку на патент США 2009/0238879; патент США No. 7846466; патент США No. 7427602; патент США No. 7029697; патент США No. 6890556; патент США No. 6797738; патент США No. 6281256; включены в данный документ в их полном объеме посредством ссылки). В определенных вариантах реализации изобретения частицы (например, антиген-связанные частицы PLG) ассоциированы с, адсорбированы на, заключенные внутри, конъюгированные с и т.д. каркасом, матрицей и/или системой доставки (например, для доставки химического/биологического материала, клеток, ткани и/или органа субъекту). В определенных вариантах реализации изобретения каркас, матрица и/или система доставки (например, для доставки химического/биологического материала, клеток, ткани и/или органа субъекту) содержит и/или выполнен из веществ, описанных в данном документе (например, PLG, конъюгированного с одним или несколькими антигенными пептидами).

В определенных вариантах реализации изобретения предложены микропористые каркасы (например, для трансплантации биологического материала (например, клетки, ткань и т.д.) субъекту). В определенных вариантах реализации изобретения предложены микропористые каркасы, несущие на себе агенты (например, белки внеклеточного матрикса, эксендин-4), и биологический материал (например, клетки островков Лангерганса). В определенных вариантах реализации изобретения при лечении заболеваний (например, сахарный диабет 1-го типа) использованы каркасы и родственные методы (например, диагностические методы, исследовательские методы, лекарственный скрининг). В определенных вариантах реализации изобретения предложены каркасы с антиген-конъюгированными переносчиками, описанными в данном документе, содержащимися на и/или внутри каркаса. В определенных вариантах реализации изобретения каркасы получают из веществ, конъюгированных с антигеном (например, PLG, конъюгированный с антигеном).

В определенных вариантах реализации изобретения каркас и/или система доставки содержит один или несколько слоев и/или имеет один или несколько химических и/или биологических соединений/агентов (например, белки, частицы, конъюгированные с пептидом, малые молекулы, клетки, ткань и т.д.), см., например, заявку на патент США 2009/0238879; включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-связанные частицы вводят совместно с каркасной системой доставки для вызова индукции иммунологической толерантности к каркасу и ассоциированным веществам. В определенных вариантах реализации изобретения микропористый каркас вводят субъекту с частицами, описанными в данном документе, содержащимися на или внутри каркаса. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-связанные частицы сопряжены с каркасной системой доставки. В определенных вариантах реализации изобретения каркасная система доставки содержит антиген-связанные частицы.

Различные модификации, рекомбинации и изменения описанных признаков и вариантов реализации изобретения будут понятны специалистам в данной области техники в пределах объема и сущности изобретения. Хотя были описаны конкретные варианты реализации изобретения, надо понимать, что изобретение, которое заявляется, не должно ограничиваться ненадлежащим образом такими конкретными вариантами реализации изобретения. В действительности, подразумевается, что различные

модификации описанных технических выполнений и вариантов реализации изобретения, которые понятны специалистам в соответствующих областях техники, находятся в пределах объема следующей формулы изобретения. Например, в заявках на патент США 2012/0076831, 2002/0045672, 2005/0090008, 2006/0002978 и 2009/0238879 (каждая из которых включена в данный документ в их полном объеме посредством ссылки) и патентах США No. 7846466; 7427602; 7029697; 6890556; 6797738; и 6281256 (каждый из которых включен в данный документ в их полном объеме посредством ссылки) приводятся подробности, модификации и изменения, которые находят применение в различных вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке и/или перечисленные ниже, включены в данный документ в их полном объеме посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приводятся с целью дополнительной иллюстрации преимуществ и признаков изобретения, но не предназначены для ограничения объема настоящего описания.

Материалы и методы

Получение химерных мышей

Мышей B6.SJL-Ptprc^aPeр3^b/BoyJ (CD45.1) в возрасте шести-восьми недель облучали одной дозой, равной 950 рад. Двенадцать часов спустя мышей восстанавливали с использованием 10⁷ клеток костного мозга от доноров C57BL/6-7.2fms-EGFP. Мышам давали сульфаметоксазол (Sigma Aldrich) и триметоприм (Sigma Aldrich) в питьевой воде в течение 10 дней после облучения. Мышей инфицировали WNV через шесть недель после облучения, как было описано выше. Уровень химеризма проверяли с использованием проточной цитометрии, и было обнаружено, что неизменно 96-99% клеток имеют донорское происхождение, как было ранее продемонстрировано (Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007).

Иммуногистология

Мышей анестезировали и перфузировали с использованием 50 мл стерильного ФСБ. За исключением сердца, срезы которого заключали в парафиновые блоки (Getts et al., J. Neurochem 103:10919-1030, 2007), изолировали все органы и подвергали быстрому замораживанию в Optimum Cutting Temperature Compound (ОСТ; Tissue-Tek, Tokyo, Japan). Изготавливали срезы ткани толщиной восемь микрон на криостате-микротоме, подвергали воздушной сушке в течение ночи и затем хранили при -80°C до использования. Замороженные срезы размораживали, и осуществляли гистологические (стандартное окрашивание гематоксилином-эозином) или иммуногистохимические анализы (Getts et al., J. Exp Med 205:2319-2337, 2008). Использовали антитела к MARCO, SIGN-R1 и SIGLEC-1 (R&D Systems, MN, USA), CD68 (Abcam, MA, USA) и Ki67 (Abcam), как было указано выше. Изображения получали на микроскопе Olympus BX-51 с использованием камеры DP-70 и программного обеспечения DP manager 2.2.1 (Olympus, Tokyo, Japan).

Микроскопия и получение изображений

Изображения получали на микроскопе Olympus BX-51 (Olympus, Japan) с использованием камеры DP-70 и программного обеспечения DP manager 2.2.1 (Olympus).

Выделение лейкоцитов из головного мозга и печени

Как было описано ранее (Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007) лейкоциты получали из головного мозга мышей, перфузированных с использованием ФСБ, путем ферментативной обработки тканей мозга в течение 60 минут при 37°C в ФСБ с помощью дезоксирибонуклеазы (0,005 г/мл; Sigma Aldrich) и коллагеназы IV (0,05 г/мл; Sigma

Aldrich). Ферментативную обработку блокировали с помощью 10% ФТС, и гомогенат пропускали через 70 мкм нейлоновый клеточный фильтр (Becton Dickinson, NJ, USA). Осадок, полученный через 10 минут после центрифугирования при 340xg, ресуспендировали в 30%-м перколле (Amersham, Norway) и наслаивали на градиент 80%-го перколла. Лейкоциты получали из 30%/80% интерфазы после центрифугирования при 1140xg в течение 25 минут при комнатной температуре. Такой же протокол также используется для выделения лейкоцитов из печени, причем до обработки ткань взвешивается.

Выделение лейкоцитов из селезенки, крови и костного мозга

Для анализа с использованием проточной цитометрии правую вырезали бедренную кость, и клетки костного мозга вымывали с использованием ФСБ, запятого в шприцы. Для выделения клеток-предшественников костного мозга использовали по меньшей мере бедренные кости и большие берцовые кости 4 мышей. Суспензию клеток, полученную после промывания, фильтровали через 70 мкм клеточный фильтр и центрифугировали в течение 5 минут при 340g. Эритроциты, содержащиеся в полученном в результате осадке, лизировали в лизирующем буфере на основе NH_4Cl (BD Pharm LyseTM; BD Pharmingen) до центрифугирования в течение 5 минут при 340xg. В случае периферической крови кровь забирали посредством пункции сердца и тотчас же переносили в цитратный буфер (mMol, Sigma Alrich). Полученную в результате суспензию наслаивали на градиент 70% перколла и центрифугировали при 1140xg в течение 20 минут при комнатной температуре с отключенным тормозом. Интерфазу собирали и клетки промывали один раз в ФСБ, центрифугировали при 340xg. Для выделения селезеночных лейкоцитов ткани селезенки пропускали через 7070 мкм клеточный фильтр и центрифугировали в течение 5 минут при 340g. Эритроциты, содержащиеся в полученном в результате осадке, лизировали в лизирующем буфере на основе NH_4Cl (BD Pharm LyseTM; BD Pharmingen) до центрифугирования в течение 5 минут при 340xg.

Проточная цитометрия

Клетки, выделенные (как было описано выше) из головного мозга, печени, крови и костного мозга, промывали в ФСБ и блокировали с использованием антитела к CD16/CD32 (Biolegend). Подсчет жизнеспособных клеток проводили по вытеснению трипанового синего, при этом регулярно отмечалась >95% жизнеспособность клеток.

Определяли экспрессию молекул клеточной поверхности, и клеточную сортировку проводили на FACS ARIA (Becton Dickinson), оснащенном аргоново-ионным лазером и гелий-неоновым лазером (HeNe). Для анализа данных по популяциям жизнеспособных клеток проводили гейтинг по параметрам малоуглового и бокового светорассеяния, и после этого идентифицированные популяции клеток, дающие флуоресцентный сигнал, определяли по параметрам малоуглового светорассеяния. Сортировку проводили с использованием специфических параметров флуоресценции и светорассеяния, позволяющих идентифицировать интересующую популяцию. Параметр точности сортировки задавали для достижения чистоты >98% для популяций клеток костного мозга.

Полученные файлы данных по FACS анализировали с использованием программы Flow Jo для проточной цитометрии (FlowJo, Ashland, OR, USA). Количество интересующих популяций клеток рассчитывали на основе процентного содержания, полученного в анализе с использованием проточной цитометрии, и абсолютных количеств клеток для каждого органа.

Адоптивный перенос

В ходе разработки вариантов реализации изобретения проводили эксперименты для изучения второй модели активного заболевания, называемой адоптивным переносом. Вместо того, чтобы иммунизировать животных пептидом, лимфоциты селезенки мышей с активной фазой заболевания пересаживали реципиенту, у которого впоследствии развивалось заболевание. В ходе разработки вариантов реализации изобретения проводили эксперименты для характеристики способности наночастиц PLG дезактивировать адоптивно перенесенные активированные эффекторные клетки. У мышей, обработанных частицами или спленоцитами, сопряженными с контрольным пептидом, увеличивался клинический показатель начиная с 4-х суток. У мышей, обработанных частицами PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁, на 2-й день средний клинический показатель был равен 0 во всех случаях, кроме двух временных точек включительно до 40-х суток, а средний клинический показатель для других временных точек составлял 0,25.

Мультиплексный ИФА

Мультиплексный ИФА осуществляли согласно инструкциям производителя (Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA). Вкратце, ткань головного мозга, селезенки и печени гомогенизировали в ФСБ, осветляли путем осаждения при 1000xg, и хранили при -20°C до проведения анализа. Также использовали образцы сыворотки крови. Размороженные образцы и стандарты разбавляли в предоставленном буфере, и 30 мкл каждого образца вносили в каждую лунку, которая содержала 16 пятен, причем каждое пятно содержит иммобилизованное антитело для конкретного растворимого белка. Планшеты затем инкубировали в течение 1 часа орбитальном встряхивателе при 120 об/мин. Планшеты промывали 3 раза и в каждую лунку добавляли 30 мкл детекторного антитела, и инкубировали еще один час. После 3 промывок добавляли стрептавидин-HRP и инкубировали еще в течение 15 минут. Планшеты затем промывали 6 раз, и добавляли субстратную смесь. Планшеты тотчас же сканировали на CCD устройстве для визуализации (Kodak, Rochester NY, USA). Изображения планшетов анализировали с использованием программного обеспечения Quansys Q-view (Quansys Biosciences).

Индукция и оценка экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ)

Мышам подкожно вводили эмульсию, содержащую 0,1 мг пептида MOG (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO:1); Auspep, Parkville, Victoria, Australia; >95% очищенный с помощью ВЭЖХ) и полный адъювант Фрейнда, содержащий 2 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma Aldrich). Через двое дней мышам внутрибрюшинно вводили 500 мкл коклюшного токсина (Sigma Aldrich). Мыши находились под наблюдением на предмет прогрессирования заболевания, которое оценивали по следующей шкале: 1 - вялый хвост и/или слабость в 1 задней конечности; 2 - слабость в нескольких конечностях, нарушение походки; 3 - паралич 1 конечности; 4 - паралич нескольких конечностей, недержание; 5 - гибель.

Статистика

Графики были построены в GraphPad Prism, а компьютерный статистический анализ осуществляли в InStat, соответственно (обе программы относятся к программному обеспечению GraphPad, San Diego, CA, USA). В зависимости от полученных данных осуществляли анализ с применением непарного двухстороннего t-критерия Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ с применением апостериорного критерия Тьюки-Крамера, при этом за уровень достоверности принимали $P < 0,05$.

В случае корреляционного анализа параметров, таких как потеря веса, инфильтрация и титр вируса, была использована нелинейная регрессия (подбор кривой) с полиномом второго порядка ($Y = A + B \cdot X + C \cdot X^2$).

Пример 1

Получение отрицательно заряженных иммуномодифицирующих частиц (IMP)

К раствору сополимера этилена и малеинового ангидрида (PEMA) в D₂O (4 мл, 1% масса/объем) добавляли по каплям раствор сополимера лактида и гликолида (PLG) в дихлорметане (DCM) (2 мл, 20% масса/объем). Смесь подвергали разрушению
 5 ультразвуком на льду при 16 ватт в течение 30 секунд с использованием ультразвукового процессора VC 30. Полученный в результате гомогенизированный неочищенный препарат затем добавляли в раствор D₂O (200 мл, содержащие 0,5% масса/объем PEMA). Гомогенизированную взвесь оставляли перемешиваться на протяжении ночи с
 10 установкой скорости на 3,5 с использованием магнитного перемешивающего устройства Bellco Glass, Inc., Bellstir Multi-stir 9 (10 Вт в течение 10 секунд, 16 Вт в течение 10 секунд, 16 Вт в течение 30 секунд).

Результаты

Через три часа после перемешивания осуществляли анализы размера частиц с использованием динамического рассеяния света в одноразовых полистирольных
 15 кюветах.

а. 10 Вт, 10 секунд – Z-средний диаметр=499,9 нм – Индекс полидисперсности=0,23, Пик=634,5 нм

б. 16 Вт, 10 секунд – Z-средний диаметр=528,9 нм – Индекс полидисперсности=0,227, Пик=657,5 нм

в. 16 Вт, 30 секунд – средний диаметр=471,6 нм – Индекс полидисперсности=0,228, Пик=580,5 нм

г. 16 Вт, 60 секунд – средний диаметр=491,1 нм – Индекс полидисперсности=0,2,5, пик=600,8 нм

По завершению реакции полученную в результате неочищенную суспензию затем
 25 подвергали очистке.

Очистка

Свежеприготовленные D₂O и 10х натрий-бикарбонатный буфер оставляли охлаждать на протяжении ночи до 4°C. С использованием 40 мкм клеточного фильтра 36 мл
 30 суспензии частиц из каждой партии фильтровали в соответствующим образом маркированную 50 мл центрифужную пробирку, содержащую 4 мл охлажденного 10х натрий-бикарбонатного буфера. Из содержимого каждого химического стакана получили приблизительно 6 таких пробирок. Все пробирки центрифугировали в течение приблизительно 15 минут при 7000g при 4°C, и удаляли супернатант. Процедуру
 35 получения суспензии повторяли с использованием вышеупомянутой методики, и большую часть осадков частиц суспендировали по возможности в 1 мл охлажденной D₂O.

Ресуспендированные частицы переносили в новую пробирку с 4 мл охлажденного 10х натрий-бикарбонатного буфера. (Этап 1)

Ресуспендирование частиц повторяли до тех пор, пока все осадки частиц не были полностью ресуспендированы. (Этап 2)

Содержимое 6 центрифужных пробирок затем объединяли в одну центрифужную пробирку (50 мл пробирку), и данную пробирку наполняли оставшимся объемом охлажденной D₂O до 40 мл (Промывка 1).

Пробирку центрифугировали в течение 20 минут при 7000g при 4°C, и удаляли супернатант.

Этап 1 и 2 и промывку 1 полученных в результате частиц повторяли каждый раз по меньшей мере еще два раза. В конечном итоге полученные в результате осадки частиц

затем подвергали сверхбыстрой заморозке в жидком азоте и лиофилизировали до достижения сухого состояния в коллекторе для получения отрицательно заряженных IMP.

На Фигуре 1 показана характеристика поверхностно-функционализированной частицы сополимера лактида и гликолида с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета $2,5 \times 10^5$ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела Z-средний диаметр 567 нм, максимальный диаметр 670 нм и коэффициент полидисперсности 0,209.

В Таблице 1 показаны результаты измерений для поверхностно-функционализированных частиц PLG-PEMA. Данные в таблице являются репрезентативными, поскольку каждая партия несколько отличается друг от друга. Хотя числа в таблице соответствовали результатам объединения нескольких партий частиц. Результаты измерений для частиц, полученных методом двойной эмульсии, аналогичны результатам в Таблице 1.

Таблица 1 – Результаты измерений для поверхностно-функционализированных частиц PLG-PEMA

Частица	Z-средний размер по интенсивности (нм)	ζ-потенциал (мВ)
PLG (Phosphorex)	624,3	-32,7±4,71
PLG-PEMA	429,9	-67,4±10,9

Пример 2

Введение антиген-связанных гранул PLGA предотвращает рецидивирующий экспериментальный аутоиммунный энцефалит

Наночастицы PLG были исследованы с иммунодоминантным эпитопом протеолипидного белка PLP₁₃₉₋₁₅₁ (PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁) на предмет индукции толерантности для предотвращения рецидивирующего экспериментального аутоиммунного энцефалита (Р-ЭАЭ). Р-ЭАЭ у мышей вызывали, как было описано выше.

Пептиды, вводимые животным, были сопряжены с частицами со средним диаметром 500 нм. Мышей обрабатывали с использованием либо PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA (N=5), либо неконъюгированного PLGA (N=5) на день -7 относительно времени иммунизации (день 0). Пик заболевания, как правило, наблюдался в промежутке между днями 12-14, и мышей оценивали по балльной шкале на предмет клинического проявления заболевания. Частицы без пептида или модифицированные с помощью контрольного пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉ не предотвращали индукцию заболевания. Однако с помощью частиц PLGA, модифицированных с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁, был получен клинический показатель, равный 0 (отсутствие заболевания) во всех случаях за исключением низких клинических показателей меньше 1, отмеченных в промежутке между днями 20 и 30 (Фигура 2). В предыдущих исследованиях с немодифицированными частицами PLG или с использованием полистирольных частиц не было достигнуто такое эффективное снижение частоты заболеваемости, причем частицы, связанные с полистиролом, обычно запускали анафилактическую реакцию.

Кроме того, была продемонстрирована специфическая инактивация миелин-специфических CD4⁺T-клеток по отсутствию реакции гиперчувствительности

замедленного типа (ГЗТ) на оба иммунизирующих эпитопа PLP₁₃₉₋₁₅₁. В целом, профилактическое лечение с использованием PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ на день -7 специфически предотвращает развитие ЭАЭ и отражает увеличение возможностей предотвращения заболеваний с применением данных частиц. Клинические показатели, полученные с использованием данных частиц, являются такими же, а возможно даже лучше клинических показателей, полученных с использованием антиген-связанных спленоцитов.

Тип вводимой частицы также оказывает влияние на развитие ЭАЭ в модели на мышях. Мышей обрабатывали либо OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLS (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{PHOSPOREX} (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{РЕМА} (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLA (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA_{PHOSPOREX} (N=5), либо PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG_{РЕМА} (N=5) на день -7 относительно времени иммунизации (день 0). Пик заболевания, как правило, наблюдался в промежутке между днями 12-14, и мышей оценивали по балльной шкале на предмет клинического проявления заболевания. Частицы любого состава, которые были модифицированы с помощью контрольного пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉, не предотвращали индукцию заболевания. Однако гранулы PLG, связанные с PLP₁₃₉₋₁₅₁, более эффективно подавляли индукцию Р-ЭАЭ, чем коммерческие рLG (Phosphorex), связанные с PLP₁₃₉₋₁₅₁, или полистирольные (Фигуры 3А и 3В).

Пример 3

Внутривенная инфузия антиген-связанных частиц PLG не индуцировала снижение температуры, вызываемое вследствие анафилактической реакции у животных, предварительно сенсибилизированных OVA/Alum

Вследствие наличия активной фазы заболевания анафилактическая реакция на антигены представляет опасность, которая может привести к мгновенной смерти, и это было описано в случае частиц, связанных с полистиролом. Анафилактическая реакция ассоциирована со значительным снижением температуры тела. Для исследования того, индуцирует ли внутривенное введение OVA-PLG снижение температуры, вызываемое вследствие анафилактической реакции у предварительно сенсибилизированных животных, мышей иммунизировали на день 0 с использованием 10 мкг OVA/Alum посредством внутрибрюшинной инъекции. На 14-й день мышей снова иммунизировали с использованием 10 мкг OVA/Alum посредством внутрибрюшинной инъекции, и затем у них вызывали толерантность с использованием OVA-PLG, вводимого внутривенно на 21-й день. На день 28 затем у мышей вызывали толерантность либо с использованием частиц OVA-PLG, либо OVA посредством внутривенного введения.

Как показано на Фигуре 4, у тех мышей, которые были обработаны растворимым OVA на день 28, отмечалось снижение температуры по сравнению с теми животными, которые были обработаны частицей OVA-PLG. Никакого снижения температуры тела не наблюдалось в течение 1 часа после доставки частицы.

На Фигуре 5 показано, что введение PLP-PLG на протяжении ремиссии не приводит ни к какой смертности, ассоциированной с анафилактической реакцией. ЭАЭ был индуцирован у самок мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель путем подкожной инъекции PLP₁₃₉₋₁₅₁ в CFA, и за развитием клинических проявлений заболевания производилось наблюдение, и регистрировались данные (Фигура 5В). На 21-й день относительно индукции заболевания мышам производили внутривенные инъекции растворимого PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники без заливки), растворимого OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги

без заливки) или этих же пептидов, связанных с наночастицами PLG (маркеры с заливкой). Температуру животных контролировали и регистрировали каждые 10 минут в течение 1 часа после инъекции (На Фигуре 5А).

Пример 4

5 Профилактическое лечение с использованием частиц PLP-PLG индуцирует длительную, антиген-специфическую толерантность.

Оптимальную дозировку определяли путем внутривенного введения повышающихся концентраций PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG за семь дней до индукции заболевания, и производили наблюдение за развитием клинических проявлений заболевания по сравнению с мышами SJL/J, обработанными OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG (Фигура 6А). Самкам мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель производили внутривенные инъекции наночастиц PLG, связанных либо с PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольник), либо OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круг). ЭАЭ был индуцирован путем подкожной инъекции PLP₁₃₉₋₁₅₁ в CFA 7 дней (Фигура 6В), 25 дней (Фигура 6С) или 50 15 дней (Фигура 6D) спустя. Животные из панели В находились под наблюдением на предмет клинического проявления заболевания в течение 100 дней. На Фигуре 6Е показано, что На 8-й день относительно индукции заболевания вызывали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в подгруппе мышей, показанных на панели В. Выбранным репрезентативным животным из групп, представленных на 20 панели В, предварительно иммунизированных PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA (OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG и PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG), вводили в ухо служивший для предварительной иммунизации пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA с эпитопом и контрольный пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLP₁₃₉₋₁₅₁. В качестве показателя ГЗТ через 24 часа оценивали отек уха, и вычитали данные, полученные по ответам до 25 стимуляции. На Фигуре 6F показано, что самкам мышей SJL/J в возрасте шести-восьми недель производили внутривенные инъекции наночастиц PLG, связанных с PLP₁₇₈₋₁₉₁ (треугольник), OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круг), или PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольник), или несвязанных частиц в чистом виде (круг без заливки). ЭАЭ был индуцирован через 7 дней путем подкожной инъекции PLP₁₇₈₋₁₉₁ в CFA, и за ходом развития заболевания наблюдали в показанные 30 временные точки.

Пример 5

Лечение рецидивирующего экспериментального аутоиммунного энцефалита с помощью антиген-связанных частиц.

В ходе разработки вариантов реализации изобретения проводили эксперименты для 35 исследования возможности лечения, а не предотвращения заболевания с помощью частиц PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁, и для определения того, влияет ли путь введения на развитие заболевания. Мышей иммунизировали на день 0 с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁ и адъюванта. Обычно мыши характеризуются максимальными клиническими 40 показателями на 12-14-й день. В этой модели мышей обрабатывали на 1 день 0 с использованием частиц PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ или с использованием контрольных частиц PLG-OVA₃₂₃₋₃₃₉ либо посредством внутривенного (iv) введения, внутрибрюшинного (ip) введения, подкожного (sc) введения, либо перорально. Как показано на Фигуре 7, профилактическая толерантность является наиболее с эффективной, когда частицы 45 PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ вводят либо внутривенно, либо внутрибрюшинно. У животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, вводимых внутривенно, не развивалось заболевание, и имелись средние клинические показатели на уровне 0 в случае большинства временных точек. Эти данные отличаются от данных по животным, обработанным

полистирольными частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁, в соответствии с чем, наблюдалась гибель >70% животных от анафилактического шока.

Пример 6

Толерантность, вызванная антиген-сопряженными частицами, ингибирует индукцию антиген-специфических ответов Th1 и Th17 в ходе активной фазы рецидивирующего экспериментального аутоиммунного энцефалита.

Чтобы определить, ингибирует ли введение антиген-связанных частиц индукцию Т-хелперных клеток, на день -7 мышам линии BALB/с внутривенно вводили либо частицы MOG₃₅₋₅₅-PLG, либо частицы OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. На день 0 мышам вводили подкожно частицы OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG и полный адъювант Фрейнда (CFA). Животных на 1 день 0 повторно стимулировали с использованием либо частиц MOG₃₅₋₅₅-PLG, либо частиц OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG, и выделяли клетки дренирующих лимфатических узлов. СРМ и уровни ИЛ-17, ГМ-КСФ, ИФН- γ , ИЛ-10 и ИЛ-4 измеряли на 1 день 0. Как показано на Фигуре 8, введение частиц OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG приводило к ингибированию ответов Th1 и Th17 у обработанных животных.

Пример 7

Толерантность индуцирована частицами PLGA, сопряженными с PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Была использована дополнительная терапевтическая стратегия выработки толерантности путем доставки в организм мышей PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG или OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. Гистологический анализ показал, что введение частиц PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG ингибирует воспаление и демиелинизацию в спинном мозге шейного отдела позвоночника. Мышей обрабатывали PLP-PLG или OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG, и ткань выделяли на 4 день 0. Выделяли спинной мозг из шейного отдела позвоночника и получали из него срезы для исследования иммунного ответа в пределах ЦНС, который лежит в основе патологии Р-ЭАЭ и рассеянного склероза. На Фигуре 9 показано снижение уровня инфильтрации иммунными клетками внутренней области спинного мозга животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, которое было более характерным для нативной ткани, чем для ткани животных, обработанных OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. Клетки животных, обработанных OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG, позитивно окрашивались на CD45, CD4 и CD11b; тогда как клетки животных, обработанных PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG, минимально окрашивались на эти факторы.

Введение частиц PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG также ингибирует нарушение проницаемости гематоэнцефалитического барьера (ГЭБ) и активацию макрофагов в спинном мозге обработанных мышей. Животных обрабатывали либо полным адъювантом Фрейнда (CFA), частицами OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG, либо частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG. Определяли клинические показатели и частоту возникновения ЭАЭ в процентах (Фигура 10B), и осуществляли наблюдение за образцами спинного мозга посредством визуализации *in vivo* (Фигуры 10A и 11). Angiosense измеряет сосудистое просачивание в ЦНС и предоставляет данные по активации макрофагов (активация катепсинов приводит к расщеплению репортера, выявляя флуоресцентный сигнал). На гистограмме представлены числовые значения для силы сигнала, отмеченной в головном мозге и на сканограммах SC.

Толерантность также может быть индуцирована частицами, в которые был инкапсулирован антиген. На Фигуре 12 показано, что введение частиц PLG, в которые был инкапсулирован PLP₁₃₉₋₁₅₁, ингибирует индукцию Р-ЭАЭ у мышей. Возможность

инкапсулировать аутоантигены позволяет использовать сложные смеси белков или даже гомогенатов органов для достижения большего охвата антигенов и, таким образом, более эффективно решать проблемы, связанные с распространением эпитопов.

Пример 8

Толерантность, индуцированная частицами PLGA, сопряженными с PLP₁₃₉₋₁₅₁, частично зависит от экспансии/активации регуляторных Т-клеток

Мышей линии SJL/J обрабатывали антителом к CD25, стандартным маркером для регуляторных Т-клеток (Treg-клеток) на день -9, и затем на день -7 обрабатывали либо частицами OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLG и антителом к CD25, частицами OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLG и

контрольным антителом IgG, частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG и антителом к CD25 или частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG и контрольным антителом IgG. Как показано на Фигуре 13, животные, обработанные частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG и антителом к CD25,

продемонстрировали, временами, больший средний клинический показатель, чем те животные, которые были обработаны частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG и контрольным антителом IgG. Это подтверждает, что Treg-клетки или по меньшей мере Т-клетки, экспрессирующие CD25, играют некоторую роль в инициации толерантности.

Пример 9

Терапевтическая толерантность индуцирована частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG при активном и адоптивном ЭАЭ

Терапевтическую толерантность, индуцированную частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG, сравнивали при активном и адоптивном ЭАЭ. Адоптивный ЭАЭ был индуцирован у самок мышей линии SJL/J в возрасте восьми недель путем адоптивного переноса $2,5 \times 10^6$ бластных клеток, активированных PLP₁₃₉₋₁₅₁. Мышам производили внутривенные инъекции пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники) или OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги), связанного с 500 нм наночастицами PLG через 2 дня (Фигура 14А) или 14 дней (Фигура 14С) после индукции заболевания. Клинические показатели заболевания сравнивали с показателями, полученными после обработки с использованием спленоцитов, связанных с антигенами (Фигура 14А). На 42-й день получали головной и спинной мозг мышей с толерантностью, вызванной PLP₁₃₉₋₁₅₁ или OVA₃₂₃₋₃₃₉, для гистологического анализа. Срезы мозга мышей из панели А были окрашены на белок PLP и CD45 (Фигура 14В). Срезы спинного мозга мышей из панели С были окрашены Luxol Fast Blue (Фигура 14D). Области демиелинизации и клеточной инфильтрации обозначены стрелками. Результаты показывают, что толерантность индуцирована частицами PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG у мышей с адоптивным ЭАЭ.

На Фигуре 15 показаны графики, на которых изображены средние клинические показатели для мышей с активным ЭАЭ и адоптивным ЭАЭ после обработки либо частицами SP, либо частицами PLG, конъюгированными с OVA₃₂₃₋₃₃₉ или PLP₁₃₉₋₁₅₁. Мышам производили внутривенные инъекции пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁-SP, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG или OVA₃₂₃₋₃₃₉-SP, или OVA₃₂₃₋₃₃₉ – PLG, связанного с 500 нм наночастицами, через 10 дней (Фигура 15А) или 2 дня (Фигура 15В) после индукции заболевания, и определяли средний клинический показатель. В обоих случаях введение частиц PLP₁₃₉₋₁₅₁ PLG уменьшало тяжесть заболевания, что свидетельствовало об индукции толерантности.

Инфильтрация иммунными клетками центральной нервной системы также резко уменьшается у мышей с толерантностью, вызванной PLP-PLG. Мышам SJL/J

производили внутривенные инъекции 500 нм наночастиц PLG, связанных с PLP₁₃₉₋₁₅₁ (прямоугольники) или OVA₃₂₃₋₃₃₉ (круги), через 2 дня после индукции ЭАЭ путем адоптивного переноса. В пик заболевания (14-й день) выделяли головной и спинной мозг и с использованием проточной цитометрии определяли количество лимфоцитов (Фигура 16В), АПК (Фигура 16С), клеток микроглии (Фигура 16D), периферических дендритных клеток (Фигура 16Е), миелоидных дендритных клеток (Фигура 16F) и макрофагов (Фигура 16G). Результаты, полученные с применением метода гейтинга для этих популяций клеток, изображены на (Фигуре 16А). Препараты клеток ЦНС стимулировали с использованием РМА и иономицина в течение 5 часов до внутриклеточного окрашивания на ИЛ-17А и ИФН-γ (Фигура 16Н).

Пример 10

Обработка с использованием моноклонального антитела к PD-1 отменяет индукцию толерантности с использованием наночастиц PLG, инкапсулирующих PLP₁₃₉₋₁₅₁, при адоптивным переносе ЭАЭ

Для изучения эффекта лечения с использованием антитела к PD-1 на толерантность, индуцированную PLP₁₃₉₋₁₅₁, мыши с адоптивным ЭАЭ на день 0 получали 3×10^6 blastов Т-клеточного происхождения, активированных PLP₁₃₉₋₁₅₁, посредством внутривенного введения. На 2-й день они получали PLP₁₃₉₋₁₅₁ или OVA₃₂₃₋₃₃₉, инкапсулированный в частицы PLG, посредством внутривенного введения либо с ФСБ, либо с антителом к PD-1. На 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й день все животные получали либо 250 мкг антитела к PD-1, либо ФСБ.

Как показано на Фигуре 17, введение пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁, инкапсулированного в частицу PLG, индуцирует толерантность, когда частицу вводят с ФСБ. Однако введение антитела к PD-1 уменьшает эту толерантность.

Пример 11

Обработка с использованием агонистического моноклонального антитела к CD40 отменяет индукцию толерантности с использованием наночастиц PLG, инкапсулирующих PLP₁₃₉₋₁₅₁, при адоптивном переносе ЭАЭ с зависимостью от ИЛ-12.

Для изучения эффекта лечения с использованием агонистического антитела к CD40 на толерантность, индуцированную PLP₁₃₉₋₁₅₁ у мышей с адоптивным ЭАЭ, на день 0 мыши получали 3×10^6 blastов Т-клеточного происхождения, активированных PLP₁₃₉₋₁₅₁, посредством внутривенного введения. На 2-й день мыши получали PLP₁₃₉₋₁₅₁ или OVA₃₂₃₋₃₃₉, инкапсулированный в частицы PLG, посредством внутривенного введения. На 3-й день животные получали либо контрольное антитело IgG2a, антитело к CD40, либо антитело к CD40 и антитело к ИЛ-12.

Как показано на Фигуре 18, введение пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁, инкапсулированного в частицу PLG, индуцирует толерантность, когда частицу вводят с ФСБ. Введение агонистического антитела к CD40 приводит к уменьшению этой толерантности, но это уменьшение толерантности восстанавливается за счет добавления антитела к ИЛ-12.

Пример 12

OVA, инкапсулированный в частицы PLG, профилактически ингибирует аллергическое воспаление дыхательных путей и OVA-специфические Th2-ответы in vivo

Для изучения профилактического эффекта OVA, инкапсулированного в частицы PLG, на воспаление дыхательных путей, мышей обрабатывали с использованием внутривенной инъекции OVA-PLG на день -7. На день 0 мыши получали

внутрибрюшинные инъекции OVA/Alum в дозе 10 мкг/мышь. На 7-й день мышей снова обрабатывали с использованием внутривенной инъекции OVA-PLG, и они получали другую внутрибрюшинную инъекцию OVA/Alum 10 мкг/мышь на 14-й день. В промежутке между 28-30 днями мышей обрабатывали три раза с использованием OVA в форме аэрозоля.

Как показано на Фигуре 19, профилактическое введение OVA-PLG приводило к уменьшению секреции ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 и снижению уровней сывороточного OVA IgE и эозинофилов в легком.

OVA, инкапсулированный в частицы PLG, профилактически ингибирует OVA-специфические ответные иммунные реакции *in vitro* от медиастинальных лимфатических узлов. Как показано на Фигуре 20А, пролиферация лимфатических узлов, наблюдаемая после повторной стимуляции 25 мкг OVA, уменьшается у тех животных, которые были обработаны OVA-PLG. Более того, обработка OVA-PLG приводит к уменьшению высвобождения цитокинов после повторной стимуляции OVA. На Фигуре 20В показано, что уровни ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 уменьшаются у мышей, обработанных OVA-PLG.

Пример 13

OVA, инкапсулированный в частицы PLG, терапевтически ингибирует аллергическое воспаление дыхательных путей и OVA-специфические Th2-ответы *in vivo*

Для изучения терапевтического эффекта OVA, инкапсулированного в частицы PLG, на воспаление дыхательных путей, мышей обрабатывали с использованием внутрибрюшинной инъекции OVA/Alum в дозе 10 мкг/мышь на день 0 и 14-й день. Мышам внутривенно вводили OVA-PLG на 28-е и 42-й день. В промежутке между 56-58 днями мышей обрабатывали три раза с использованием OVA в форме аэрозоля.

Как показано на Фигуре 21, терапевтическое введение OVA-PLG приводило к уменьшению секреции ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 и снижению уровней сывороточного OVA IgE и эозинофилов в легком.

На Фигуре 22 показано, что OVA, инкапсулированный в частицы PLG, оказывает больший терапевтический эффект посредством снижения содержания OVA-специфических Th2-цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа, чем частицы PLG, связанные с OVA. Животных обрабатывали, как было описано выше, за исключением того, что 28-е и 42-й день, мышей обрабатывали с использованием либо OVA, инкапсулированного в частицы PLG, либо OVA, связанного с частицами PLG. На удивление инкапсулированный OVA сильнее ингибировал секрецию Th2-цитокинов, чем пептид OVA, связанный с поверхностью частицы PLG.

Пример 14

Толерантность, индуцированная путем введения частиц PLG, содержащих пептид хромогранин A p31, ингибирует сахарный диабет 1-го типа

У мышей линии BDC2.5 был индуцирован сахарный диабет 1-го типа и были выделены клетки селезеночных, подмышечных, плечевых, паховых и панкреатических лимфатических узлов мышей через 3 недели. Выделенные клетки культивировали и активировали *in vitro* путем инкубации 2×10^6 клеток/мл с 0,5 мкМ пептида p31 в течение 96 часов. 5×10^6 клеток пересаживали посредством внутривенного введения мышам NOD.SCID (6-8 недель) в случае временной точки 0. У мышей вызывали толерантность посредством внутривенного введения пептида p31 или MOG₃₅₋₅₅, связанного с SP или PLG 2 через 3 суток.

На Фигурах 23А и 23В показаны уровни глюкозы в крови у животных после

обработки. Введение PLG, связанных с пептидом р31, приводило к более низким уровням глюкозы в крови по сравнению с уровнями, наблюдаемыми после введения частиц, связанных с пептидом MOG₃₅₋₅₅. На Фигуре 23С показано, что процентное содержание клеток, секретирующих ИФН- γ , наблюдаемое у животных, также снижалось у мышей, обработанных р31-PLG, по сравнению мышами, обработанными PLG с пептидом MOG₃₅₋₅₅.

Индукция толерантности с помощью р31-PLG требует присутствия Treg-клеток. Сахарный диабет 1-го типа был индуцирован у мышей, как было описано выше, и через 2 часа после пересадки активированных клеток мышам линии NOD.SCID у данных мышей вызывали толерантность либо с использованием частиц р31-PLG, либо частиц PLG MOG₃₅₋₅₅. Как показано на Фигуре 24, деплеция Treg-клеток отменяет индукцию толерантности путем введения частиц р31PLG.

Пример 15

Толерантность, индуцированная путем введения связанных с инсулином частиц PLG, ингибирует развитие спонтанного сахарного диабета 1-го типа у мышей линии NOD

Мышей NOD в возрасте 6, 8 и 10 недель обрабатывали с использованием частиц PLG, сопряженными либо с BSA (N=22), либо с инсулином (N=23) посредством внутривенного введения. У мышей затем оценивали развитие сахарного диабета, которое определяли по уровню глюкозы в крови >250 мг/дл. Как показано на Фигуре 25, введение частиц PLG, связанных с инсулином, приводило к значительному увеличению процентного соотношения мышей, у которых не развивался сахарный диабет в течение 300 дней (69,6% по сравнению с 22,7%; $p=0,0027$).

Пример 16

Кинетика приживление трансплантируемых клеток

У самок мышей CD45.2 вызывали толерантность либо с использованием OVA-PLG, либо контрольного пептида Dby-PLG (главный антиген H-Y, экспрессируемый у самцов мышей линии C57BL/6) на день -7. На -1-й день мышам облучали с использованием дозы 200 рад, затем им трансплантировали 1×10^6 , 5×10^6 или 1×10^7 клеток костного мозга, взятых у самцов мышей CD45.1 на день 0. У мышам-реципиентов затем вызывали толерантность либо с использованием OVA-PLG, Dby-SP, либо Dby-PLG на 1-й день, и производили забор крови для анализа химеризма с использованием FACS. На Фигуре 26 показано процентное содержание донорских CD45.1-положительных клеток, наблюдаемое у мышам-реципиентов.

На Фигуре 27 показано процентное содержание донорских CD45.1-положительных клеток у мышам-реципиентов после толеризации либо с использованием OVA-PLG, Dby-SP, либо Dby-PLG на 1-й день. У одной мышам положительного контроля не отмечалось выраженное приживление трансплантируемых клеток (~10%). У всех мышам отрицательного контроля донорские клетки не приживались. У одной мышам Dby-SP не отмечалось выраженное приживление трансплантируемых клеток (~10%). У двоих мышам донорские клетки приживались (~10%): у одной мышам произошло полное отторжение трансплантата к 1-й неделе. У одной мышам началось отторжение на 12-ю неделю и составляло 10% клеток к 16-й неделе. В группе Dby-PLG уровень приживления клеток к 16-й неделе изменялся в диапазоне 10%-56%. У мышам OVA-PLG отмечалось: 1) спонтанное приживление трансплантируемых клеток, 2) гомология между последовательностью OVA323 и Dby или 3) толерогенные свойства частиц. Dby-PLG обеспечивает более полное приживление трансплантируемых клеток, чем Dby-SP и OVA-PLG.

На Фигуре 28 показано, что толерантность с течением времени оказывает влияние на процент приживления CD45.1-положительных клеток у мышей-реципиентов. В случае положительных контролей отмечался более низкий уровень приживления клеток (~4%), чем ожидалось (~10%). У одной мыши отрицательного контроля уровень приживления трансплантируемых клеток составлял 5% из всех 3 групп, получающих OVA-PLG, у одной мыши в группе -7-х+1-х дней отмечалось приживление трансплантируемых клеток (12%). Толерантность, проявившаяся на 1-й день, является более клинически значимой, чем толерантность, проявившаяся на день -7.

Пример 17

Частицы PLGA, меченые кумарином-6, не поддаются детекции через 24 часа после введения.

Мышей обрабатывали с использованием частиц PLGA, меченых кумарином-6, которые либо были сопряжены с антигеном, либо не содержали антигена. Как показано на Фигуре 29, частицы были детектируемыми через 3 часа после введения, а не через 24 часа после введения. Срезы органов интактных мышей (верхняя строка), которым не производили инъекции, по сравнению со срезами селезенки (левый столбец), печени (средний столбец) и легкого (правый столбец) мышей, которым производили внутривенную инъекцию флуоресцентной частицы PLGA/PEMA, через 3 часа после инъекции (средняя строка) и через 24 часа (нижняя строка) после инъекции, контрастное окрашивание DAPI.

Пример 18

Наночастицы ассоциированы с макрофагами *in vivo*

Анализ печени через 6 часов и 15 часов после введения показывает, что частицы PLGA локализовались в F4/80⁺ клетках печени (Фигура 30).

Макрофаги маргинальной зоны преимущественно поглощают TAMRA-меченные PLP₁₃₉₋₁₅₁-связанные частицы через 24 часа после внутривенного введения. Как показано на Фигуре 31, наиболее высокое процентное содержание PLP₁₃₉₋₁₅₁+клеток представлено макрофагами маргинальной зоны.

Пример 19

Ингибирование Р-ЭАЭ у мышей линии SJL/J с использованием поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Группам мышей линии SJL/J производили внутривенные инъекции 2,5 мг 500 нм – 700 нм поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁, на день -7 и -1-й день до предварительной иммунизации с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA на день 0. Контрольных мышей предварительно иммунизировали на день 0, но они не подвергались обработке с использованием частиц на день -7 или -1-й день. Мыши находились под наблюдением на предмет клинических признаков Р-ЭАЭ в течение дополнительных 20 суток.

Результаты, изображенные на Фигуре 32, отражают среднесуточный клинический показатель против количества дней предварительной иммунизации PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. Развитие Р-ЭАЭ, вызванного введением PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA, ингибируется у мышей линии SJL/J за счет индукции иммунологической толерантности с использованием поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Пример 20

Ингибирование аллергического воспаления дыхательных путей путем введения поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, содержащих растворимый овальбумин

У мышей было индуцировано аллергическое воспаление дыхательных путей (AIA). Группам мышей линии Balb/c производили внутривенные инъекции 2,5 мг 500 нм – 700 нм поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится овальбумин или растворимый бычий сывороточный альбумин (контроль), на День -7 и День+7 до предварительной иммунизации с использованием овальбумина/гидроксида алюминия на Дни 0 и+14. Мышей стимулировали на Дни+28-30 с использованием овальбумина в форме аэрозоля. Затем мышей выводили из эксперимента, и получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость. Также измеряли уровни овальбумин-специфического IgE в сыворотке крови.

Относительное содержание эозинофилов в составе бронхоальвеолярной лаважной жидкости свидетельствовало о тяжести ААИ – более высокое относительное содержание свидетельствовало об ухудшении прогноза заболевания. Уровни IgE в сыворотке крови свидетельствуют о тяжести ААИ – более высокие уровни свидетельствовали об ухудшении прогноза заболевания.

На Фигуре 33 показано, что мыши, обработанные инкапсулированным OVA-PLG, характеризовались наибольшим снижением скопления эозинофилов. На Фигуре 34 показано, что мыши, обработанные инкапсулированным OVA-PLG, характеризовались наибольшим снижением уровня сывороточного IgE по сравнению с животными, необработанными или обработанными контрольными частицами.

Аллергическое воспаление дыхательных путей, индуцированное с использованием овальбумина/гидроксида алюминия у мышей линии Balb/c, было ингибировано за счет индукции иммунологической толерантности с использованием поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин.

Пример 21

Синтез поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, инкапсулирующих антиген

В данном примере подробно изложен состав и частичная характеристика биоразлагаемых частиц сополимера лактида и гликолида, поверхность которых была функционализирована путем карбоксилирования с высокой плотностью, и в ядре которых содержится растворимый антиген, который

окружен оболочкой из сополимера лактида и гликолида для индукции толерантности при аутоиммунном заболевании и для лечения аллергий.

Карбоксилирование с высокой плотностью было достигнуто путем использования сополимера этилена и малеинового ангидрида (РЕМА), полимера, в остоле которого содержатся карбоксилатные группы, в качестве поверхностно-активного вещества для процесса эмульгации.

Как было описано выше биоразлагаемые частицы сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP139-151, а поверхность функционализирована путем карбоксилирования с высокой плотностью, эффективно индуцируют иммунологическую толерантность в модели рассеянного склероза на мышах линии SJL/J с Р-ЭАЭ, вызванным введением PLP139-151/CFA. Кроме того, биоразлагаемые частицы сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин, а поверхность функционализирована путем карбоксилирования с высокой плотностью, эффективно индуцируют иммунологическую

толерантность в модели аллергической астмы на мышах линии Balb/c с ААI, вызванным введением овальбумина/гидроксида алюминия.

Частицы сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин или бычий сывороточный альбумин, а поверхность функционализирована путем карбоксилирования с высокой плотностью, были синтезированы с использованием метода двойной эмульсии-испарения растворителя, как описано ниже:

1. 150 мкл 200 мг/мл овальбумина или бычьего сывороточного альбумина в воде, не содержащей эндотоксинов, добавляли по каплям к 2 мл 20% масса/объем сополимера лактида и гликолида в дихлорметане в 20 мл сцинтилляционный флакон.

2. Полученную в результате смесь помещали на лед и подвергали воздействию ультразвука в течение 30 секунд при мощности 10 ватт с использованием ультразвукового зонда.

3. Добавляли 10 мл 1% масса/объем сополимера этилена и малеинового ангидрида в воде.

4. Полученную в результате смесь помещали на лед и подвергали воздействию ультразвука в течение 30 секунд при мощности 16 ватт с использованием ультразвукового зонда.

5. Полученную в результате эмульсию вливали в 200 мл 0,5% масса/объем сополимера этилена и малеинового ангидрида) в химический стакан на 600 мл и оставляли перемешиваться на протяжении ночи для обеспечения отверждения частиц.

6. Затвердевшие частицы затем подвергали очистке путем центрифугирования и промывали 3 раза с использованием бикарбонатного буфера с рН, равном 9,6.

7. Очищенные частицы ресуспендировали в 4%-й масса/объем сахарозе и 3%-м масса/объем D-манните в воде, подвергали сверхбыстрой заморозке в жидком азоте и лиофилизировали до достижения сухого состояния.

На Фигуре 35 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP139-151, с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 1,792 x 10⁵ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела Z-средний диаметр, равный 584 нм, максимальный диаметр, равный 679 нм, и коэффициент полидисперсности, равный 0,162. Эти результаты соответствуют 6 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 36 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый PLP139-151, посредством измерения ζ-потенциала. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 6,67 x 10⁴ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела пиковый ζ-потенциал, равный -48,9 мВ и отклонение ζ, равное 5,14 мВ. Эти результаты соответствуют 6 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 37 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин, с помощью анализа динамического рассеяния света. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на

Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 1,822 x 10⁵ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела Z-средний диаметр, равный 569,7 нм, максимальный диаметр, равный 700,3 нм и коэффициент полидисперсности, равный 0,230 нм. Эти результаты соответствуют 3 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

На Фигуре 38 показана характеристика поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядре которых содержится растворимый овальбумин, посредством измерения ζ-потенциала. Поверхностно-функционализированные частицы сополимера лактида и гликолида анализировали на Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) со скоростью счета 2,67 x 10⁴ импульсов в секунду в воде класса 18,2 МΩ. Популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида имела пиковый ζ-потенциал, равный -52,2 мВ, и отклонение ζ, равное 5,38 мВ. Эти результаты соответствуют 3 партиям синтезов по описанному выше протоколу.

Пример 22

Поверхностно-функционализированные липосомы, в ядрах которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁, индуцируют иммунологическую толерантность в модели Р-ЭАЭ на мышах, являющейся моделью рассеянного склероза.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что биоразлагаемые липосомные средства доставки, поверхность которых функционализирована за счет высокой плотности отрицательно заряженных групп и в ядре которых содержится растворимый антиген, индуцируют иммунологическую толерантность в модели Р-ЭАЭ на мышах, являющейся моделью рассеянного склероза.

Липосомы, используемые в данном исследовании, состояли из следующих липидов в следующих молярных соотношениях – 30:30:40 фосфатидилхолин:фосфатидилглицерин:холестерин. Группам мышей линии SJL/J производили внутривенные инъекции с использованием 200 нм поверхностно-функционализированных липосом (10 мкмоль общих липидов на мышь) с использованием растворимого пептида PLP₁₃₉₋₁₅₁, содержащегося в их ядрах, на день -7 относительно предварительной иммунизации с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA на день 0. Контрольные мыши были предварительно иммунизированы на день 0 и получали 500 нм – 700 нм поверхностно-функционализированных липосом (10 мкмоль общих липидов на мышь) с использованием растворимого пептида OVA₃₂₃₋₃₃₉, содержащегося в их ядрах, на день -7. Мыши находились под наблюдением на предмет клинических признаков Р-ЭАЭ в течение дополнительных 17 суток.

Результаты отражают среднесуточный клинический показатель против количества дней предварительной иммунизации с использованием PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. Как показано на Фигуре 39, животные, обработанные с использованием поверхностно-функционализированных липосом, в ядре которых содержится растворимый пептид PLP₁₃₉₋₁₅₁, характеризовались более низким клиническим показателем, чем животные, обработанные с использованием поверхностно-функционализированных липосом, содержащих растворимый пептид OVA₃₂₃₋₃₃₉.

Результаты данного исследования демонстрируют, что биоразлагаемые липосомы, в ядрах которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁, а поверхность которых функционализирована за счет высокой плотности отрицательно заряженных групп,

эффективно индуцируют иммунологическую толерантность в модели рассеянного склероза на мышах линии SJL/J с Р-ЭАЭ, вызванным введением PLP₁₃₉₋₁₅₁ /CFA.

Толерантность, индуцированная путем введения частиц связанных с антигеном, или инкапсулирующих антиген, является антиген-специфической, дозозависимой и продолжительной (>150 суток). Наиболее эффективно толерантность индуцируется за счет внутривенного введения сопряженной частицы, диаметр которой составляет от 500 нм и до 1 мкм с дзета-потенциалом ≤ -5 мВ. Индукция толерантности зависит от поглощения частиц с полианионными поверхностями через скэвенджер-рецептор MARCO (например, карбоксилированные частицы PS/PLG). Толерантность индуцируется и поддерживается за счет комбинации энергии (частично обратима за счет антитела к PD-1 и агонистического антитела к CD40) и iTreg-клеток (частично обратима за счет антитела к CD25). Частицы по настоящему изобретению накапливаются преимущественно в печеночных и селезеночных макрофагах маргинальной зоны (CD11b^{hi} CD11c^{lo} MARCO⁺Sign-R1⁺Siglec-1⁻).

Имеются многочисленные преимущества для использования антиген-связанных частиц для лечения аутоиммунных заболеваний по сравнению с использованием примированных антигеном или направленных антигеном незрелых толерогенных дендритных клеток или конструированием антиген-специфических Treg-клеток. Скорость и простота получения толерогенов и индукция с использованием изготавливаемого по стандартам GMP, доступного универсального толерогенного переносчика; нет необходимости в выделении и экспансии незрелых дендритных клеток или Treg-клеток *ex vivo*; нет необходимости работать с незрелыми дендритными клетками, активируемыми при манипуляции *ex vivo*, и которые становятся стимулирующими, а не толерогенными, или Treg-клеток, которые превращаются в Th1/17 после переноса; поскольку хозяйские незрелые АПК маргинальной зоны процессируют и представляют антиген в форме толерогена, хозяйские АПК могут выбирать соответствующие иммунодоминантные аутоэпитопы из частиц PLG, инкапсулирующих интактные аутоантигены или тканевые экстракты (например, частицы PLG с инкапсулированным OVA предотвращают AAD, индуцированный OVA/Alum); и протокол является антиген-специфическим без подавления иммунного ответа на один антиген в результате активации иммунного ответа на другой, является безопасным, высокоэффективным, и с его помощью можно индуцировать неответаемость как в эффекторных Т-клетках (Th1, Th2, Th17, и CD8), так и наивных Т-клетках, вовлеченных в распространение эпитопа.

Применение синтетических, биоразлагаемых частиц и липосом может привести к облегчению производства, увеличению доступности терапевтических средств и расширению потенциальной зоны воздействия препарата. Для достижения этой цели были специально сконструированы поверхностно-функционализированные биоразлагаемые частицы сополимера лактида и гликолида, поверхность которых функционализирована путем карбоксилирования с высокой плотностью, с использованием поверхностно-активного сополимера этилена и малеинового ангидрида.

Также были разработаны поверхностно-функционализированные липосомы с использованием соотношения 30:30:40 фосфатидилхолин:фосфатидилглицерин:холестерин.

Дополнительно эти частицы были сконструированы таким образом, чтобы в их ядрах содержался растворимый овальбумин во избежание химической контаминации и проблем с обеспечением чистоты, связанных с конъюгированием пептида или белка с поверхностью. Эти поверхностно-функционализированные частицы сополимера

лактида и гликолида, в ядрах которых содержится растворимый овальбумин, эффективно предотвращают развитие заболевания и, таким образом, индуцируют иммунологическую толерантность в модели аллергической астмы на мышах линии Balb/c с ААИ, индуцированным путем введения овальбумина/гидроксида алюминия. Присоединение пептида или белка, конъюгированного с карбоксилат-функционализированными частицами сополимера лактида и гликолида с использованием EDC, происходит неизбежно, что приводит к образованию агрегатов антигенов и агрегатов частица-антиген-частица, которые трудно охарактеризовать и подвергнуть очистке для получения гомогенных популяций.

Была получена гомогенная популяция поверхностно-функционализированных частиц сополимера лактида и гликолида, в ядрах которых содержится растворимый овальбумин, которые не требуют конъюгирования антигена с поверхностью.

Дополнительно было продемонстрировано, что биоразлагаемые липосомы, в ядре которых содержится растворимый PLP₁₃₉₋₁₅₁, а поверхность которых

функционализирована за счет высокой плотности отрицательно заряженных групп, эффективно индуцируют иммунологическую толерантность в модели рассеянного склероза на мышах линии SJL/J с Р-ЭАЭ, вызванным введением PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA.

Липосомы и частицы сополимера лактида и гликолида по настоящему изобретению дают многочисленные преимущества. Данные преимущества включают:

1) Биоразлагаемые частицы не будут сохраняться в организме в течение длительного времени, и время, необходимое для полного разложения можно контролировать.

2) Частицы и липосомы могут быть функционализированы для облегчения интернализации в отсутствие активации клеток. Для достижения этой цели микросферы PLG были нагружены фосфатидилсеринем.

3) Также могут быть сконструированы частицы и липосомы с целью включения лигандов для направленного воздействия на конкретную популяцию клеток.

4) Также могут быть включены противовоспалительные цитокины, такие как ИЛ-10 и TGF- β , для ограничения активации типа клеток, которые поглощают данные частицы, и для облегчения индукции толерантности за счет анергии и/или деплеции и активации регуляторных Т-клеток.

С применением этой комбинаторной функции частицы или липосомы можно направленно индуцировать толерантность во многих отношениях, таким образом, получение сконструированных частиц по изобретению стало значительным успехом по сравнению с полистирольными частицами. Области потенциального клинического применения этой технологии, индуцирующей толерантность, включают:

(1) аутоиммунные заболевания, опосредованные Т-клетками и антителами (такие как рассеянный склероз, сахарный диабет 1-го типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и т.д.) – толерантность будет индуцирована с использованием частиц, образующих комплекс с соответствующими аутоантигенами, ассоциированными с конкретным аутоиммунным заболеванием

(2) пищевые аллергии и аллергические заболевания легких, кожные аллергии и астма – толерантность будет индуцирована с помощью частиц, образующих комплекс со специфическими пищевыми аллергенами (например, белками арахиса и т.д.), вводимыми веществами (белки пчелиного яда и т.д.) или вдыхаемыми веществами (например, белки пыльцы амброзии, белки, содержащиеся в перхоти домашних животных и т.д.), которые вызывают аллергическую реакцию

(3) отторжение трансплантата – будет индуцирована толерантность к трансплантационным антигенам на донорских органах или клетках до органной

трансплантации для предотвращения отторжения реципиентом

(4) заместительная терапия ферментами – будет индуцирована толерантность к ферментам, которые не могут вырабатываться в организме пациентов с генетически обусловленной недостаточностью, для предотвращения выработки в их организме 5 нейтрализующих антител к ферментам, полученным с помощью технологии рекомбинантной ДНК, вводимых для лечения, направленного конкретно на восполнение их недостатка.

Несмотря на то, что конкретные варианты реализации изобретения были описаны и проиллюстрированы, такие варианты реализации изобретения должны 10 рассматриваться только как иллюстрирующие настоящее изобретения, а не как ограничивающие объем изобретения, который следует толковать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения.

Все патенты, заявки и другие источники, цитированные в данном документе, включены в данный документ в полном их объеме посредством ссылки.

(57) Формула изобретения

1. Толерогенная композиция, содержащая: полистирольную несущую частицу, карбоксилированную полистирольную несущую частицу, несущую частицу сополимера 20 молочной и гликолевой кислот или карбоксилированную несущую частицу сополимера молочной и гликолевой кислот, причем указанная частица обладает отрицательным дзета-потенциалом и содержит инкапсулированный антиген.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что дзета-потенциал частицы составляет от -100 мВ до 0 мВ.

3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что дзета-потенциал частицы составляет 25 от -50 мВ до -40 мВ.

4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что дзета-потенциал частицы составляет от -100 мВ до -30 мВ.

5. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что частица представляет собой сополимер, имеющий молярное соотношение полимолочной кислоты к полигликолиевой кислоте 30 от 80:20 до 99:1.

6. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что частица представляет собой карбоксилированную частицу сополимера молочной и гликолевой кислот.

7. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр от 0,1 мкм до 10 мкм.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр от 0,3 мкм до 5 мкм. 35

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр от 0,5 мкм до 3 мкм.

10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр от 0,5 мкм 40 до 1 мкм.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр 0,5 мкм.

12. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит антиген, связанный с поверхностью несущей частицы.

13. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный антиген содержит 45 аутоиммунный антиген, антиген, экспрессируемый на ткани, которая подлежит трансплантации субъекту, или аллерген.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что указанный антиген содержит по меньшей мере часть белка, выбранного из группы, состоящей из: основного белка

миелина, ацетилхолинового рецептора, эндогенного антигена, миелин-олигодендроцитарного гликопротеина, антигена бета-клеток поджелудочной железы, инсулина, глутаматдекарбоксилазы (GAD), коллагена 11 типа, gp39 человеческого хряща, fp130-RAPS, протеолипидного белка, фибриллярина, малого ядрышкового белка, рецептора тиреотропного гормона, гистонов, гликопротеина gp70, ди гидролипоамидацетилтрансферазы (PCD-E2) пируватдегидрогеназного комплекса, антигена волосного фолликула, А-глиадин и изоформы 5 человеческого тропомиозина, пыльцы гречки заметной (BaGP), аллергена персика Pru p 3, аллергена молока альфа-s1-казеина, аллергена сельдерея Api g1, аллергена бразильского ореха Bere1, аллергена В-лактоглобулина молока, бычьего сывороточного альбумина, аллергена Cor a 1.04 фундука или аллергена яичного овальбумина.

15. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что антиген содержит основной белок миелина, ацетилхолиновый рецептор, эндогенный антиген, миелин-олигодендроцитарный гликопротеин, антиген бета-клеток поджелудочной железы, инсулин, глутаматдекарбоксилазу (GAD), коллаген 11 типа, gp39 человеческого хряща, fp130-RAPS, протеолипидный белок, фибриллярин, малый ядрышковый белок, рецептор тиреотропного гормона, гистоны, гликопротеин gp70, ди гидролипоамидацетилтрансферазу (PCD-E2) пируватдегидрогеназного комплекса, антиген волосного фолликула, А-глиадин или изоформу 5 человеческого тропомиозина, пыльцу гречки заметной (BaGP), аллерген персика Pru p 3, аллерген молока альфа-s1-казеин, аллерген сельдерея Api g1, аллерген бразильского ореха Bere1, аллерген В-лактоглобулина молока, бычий сывороточный альбумин, аллерген Cor a 1.04 фундука или аллерген яичного овальбумина.

16. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что указанный антиген связан с указанной частицей посредством конъюгирующей молекулы.

17. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанная конъюгирующая молекула представляет собой этиленкарбодиимид (ECDI).

18. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанная частица является биоразлагаемой.

19. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанная частица поверхностно функционализирована.

20. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что указанная частица поверхностно функционализирована путем карбоксилирования поверхности.

21. Композиция по любому из пп. 1-20, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

22. Способ индукции антиген-специфической толерантности у субъекта, включающий: введение указанному субъекту эффективного количества толерогенной композиции по любому из пп. 1-21.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанное введение осуществляют с целью лечения или предотвращения заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из: аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, аллергии, отторжения трансплантата и гипериммунного ответа.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: рассеянного склероза, сахарного диабета 1-го типа, астмы, пищевой аллергии, аллергии на антигены окружающей среды, целиакии и состояния, вызванного указанным антигеном у указанного субъекта, с целью уменьшения чрезмерной реакции на указанный антиген.

25. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанную композицию вводят

внутривенно.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

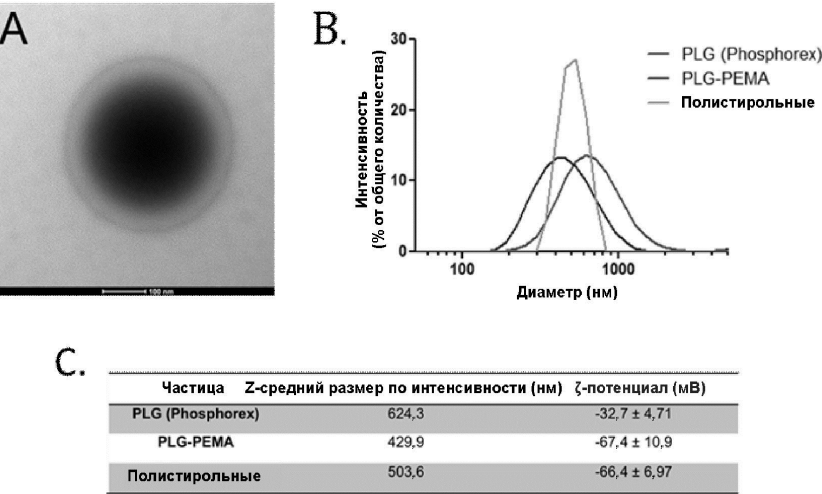
WO 2013/192532

PCT/US2013/047079

1/41

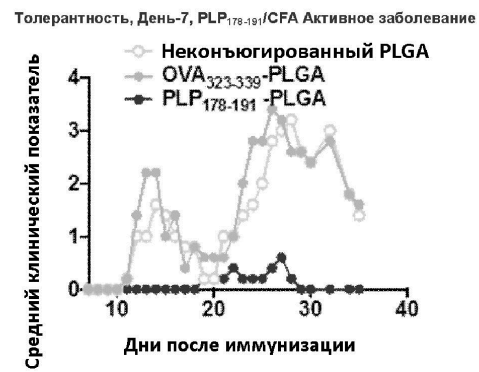
ФИГУРЫ

Фигура 1



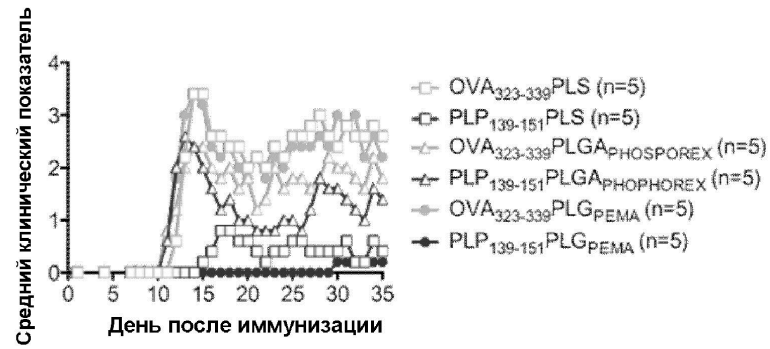
2/41

Фигура 2

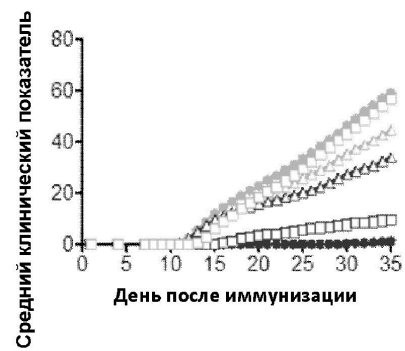


3/41

Фигура 3А

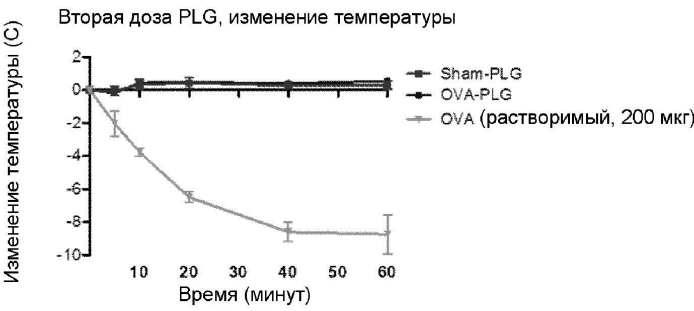


Фигура 3В



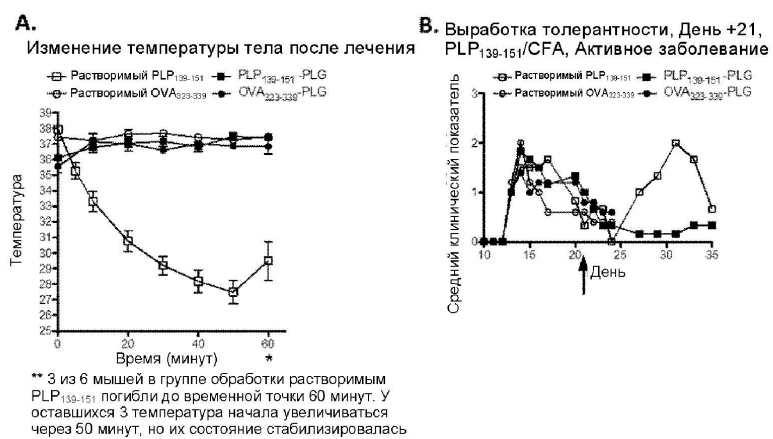
4/41

Фигура 4



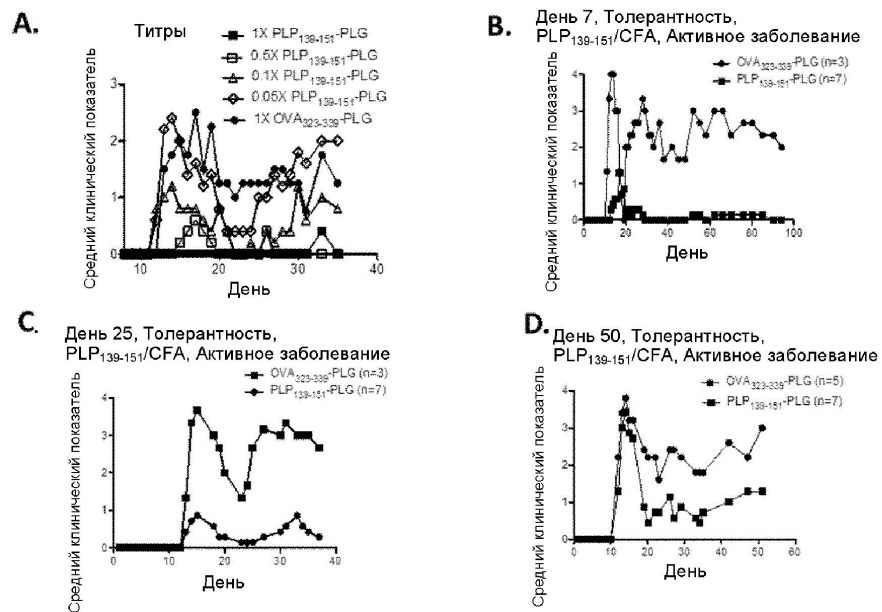
5/41

Фигура 5



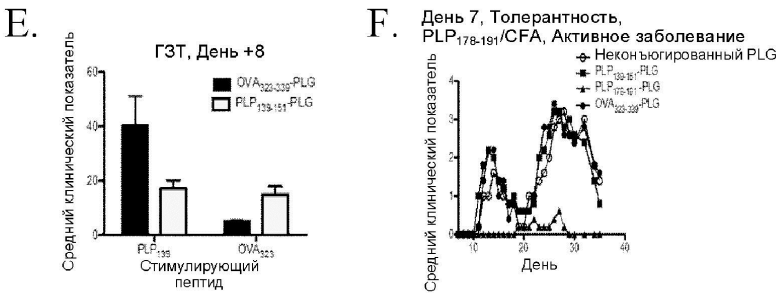
6/41

Фигура 6



7/41

Фигура 6

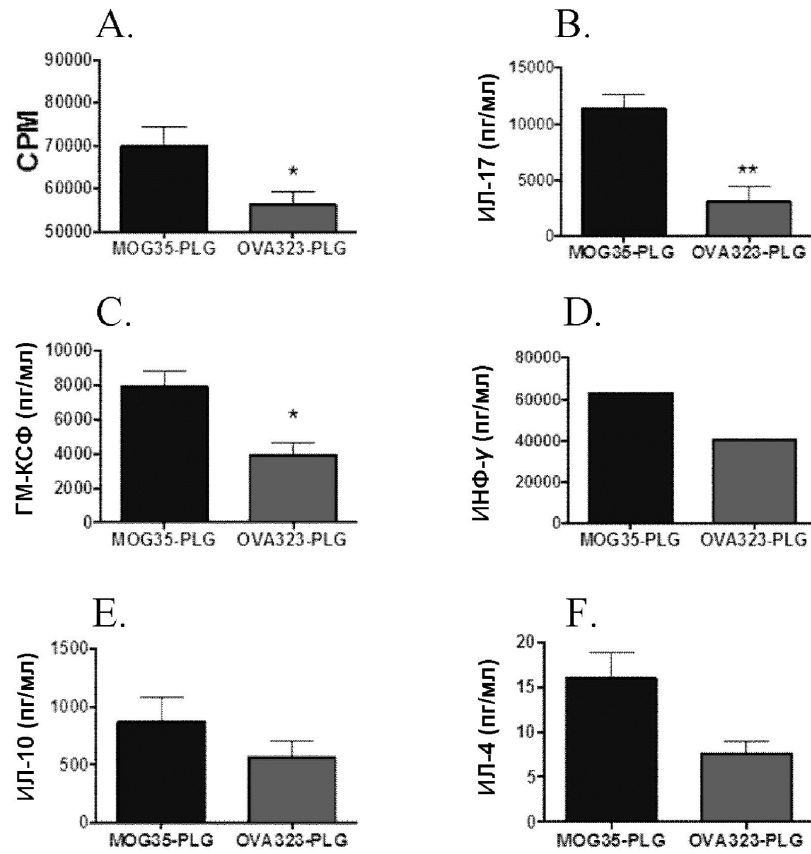


Фигура 7



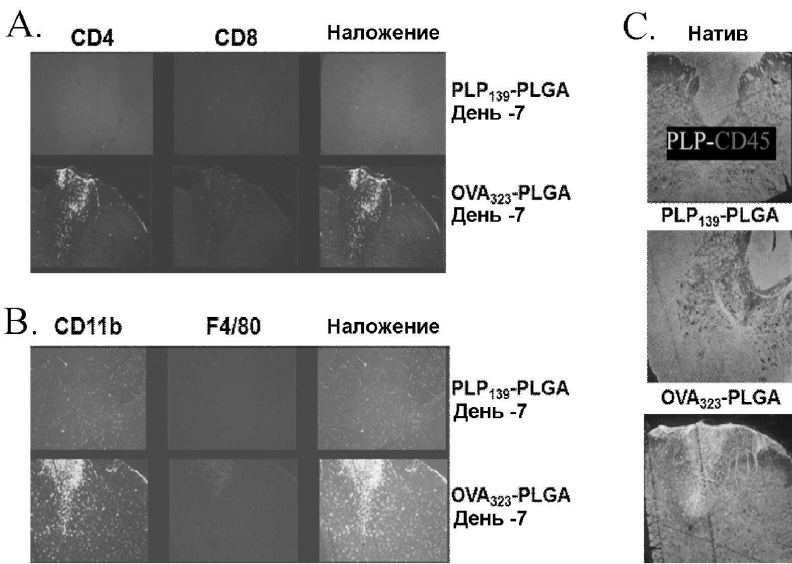
9/41

Фигура 8

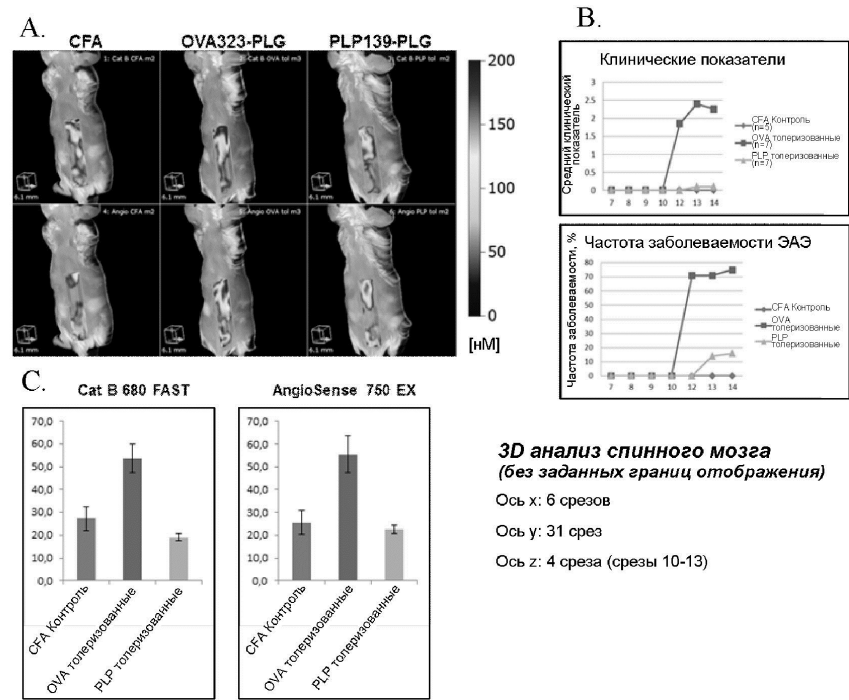


10/41

Фигура 9

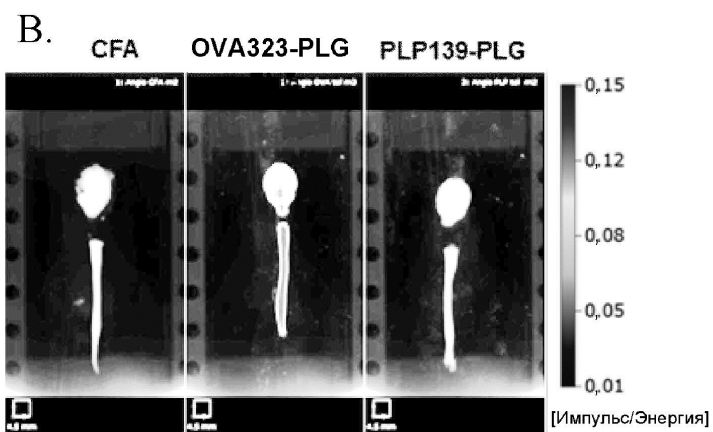
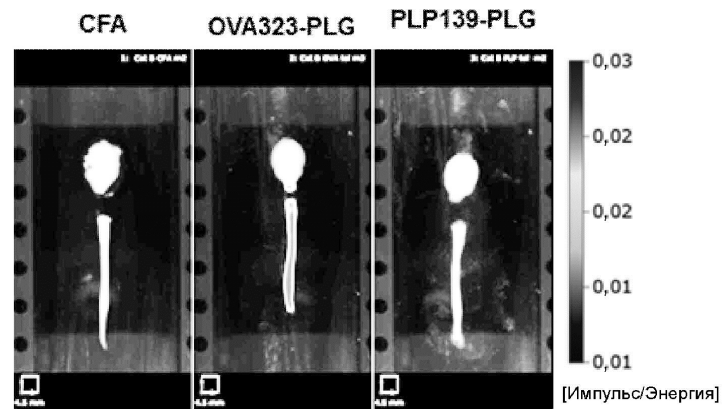


Фигура 10



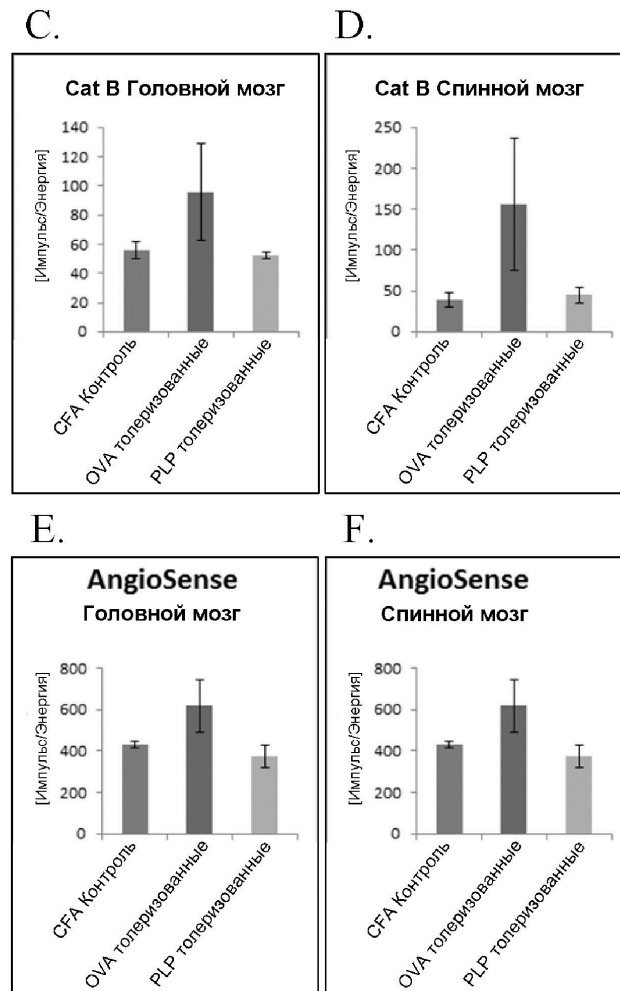
12/41

Фигура 11 А



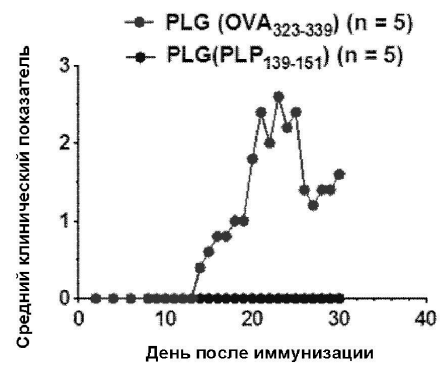
13/41

Фигура 11



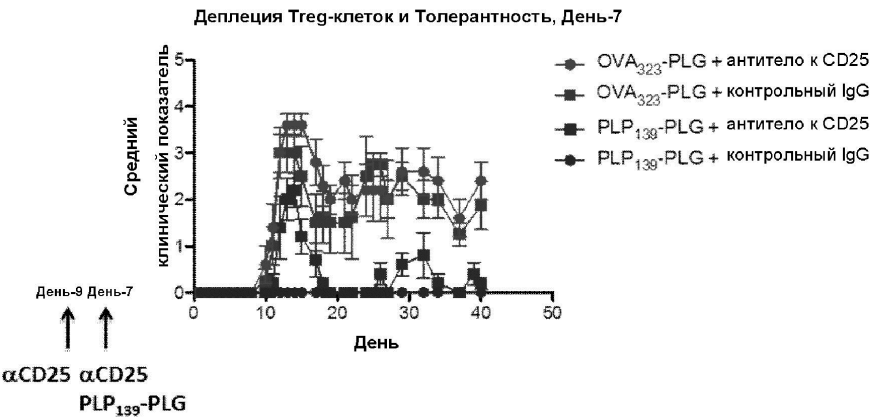
14/41

Фигура 12

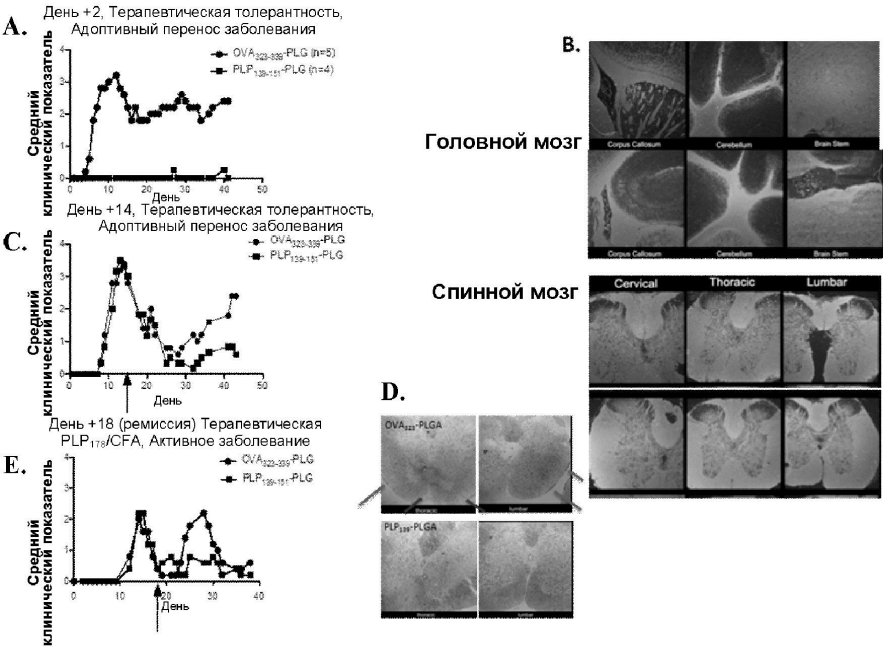


15/41

Фигура 13

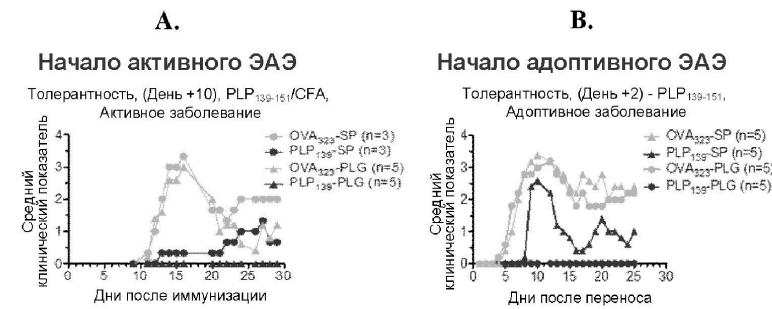


Фигура 14



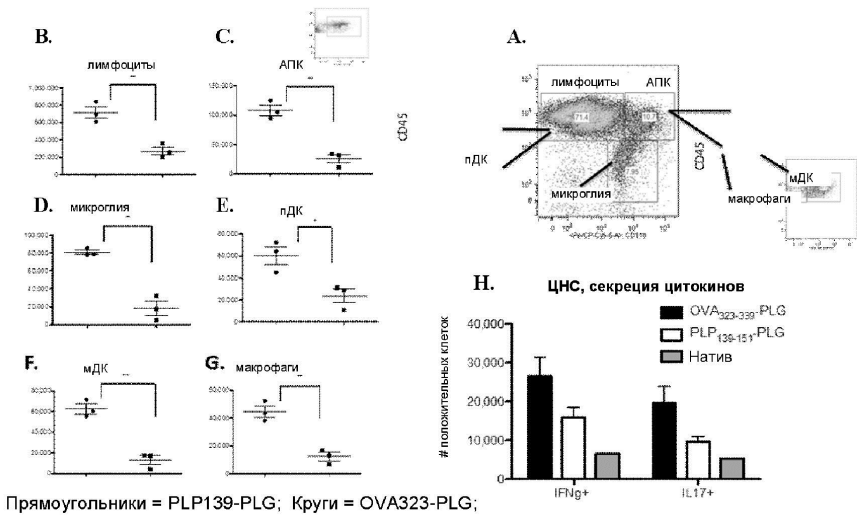
17/41

Фигура 15



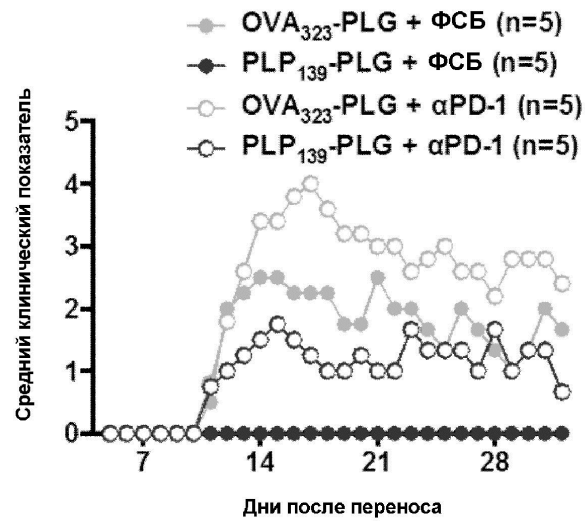
18/41

Фигура 16



19/41

Фигура 17



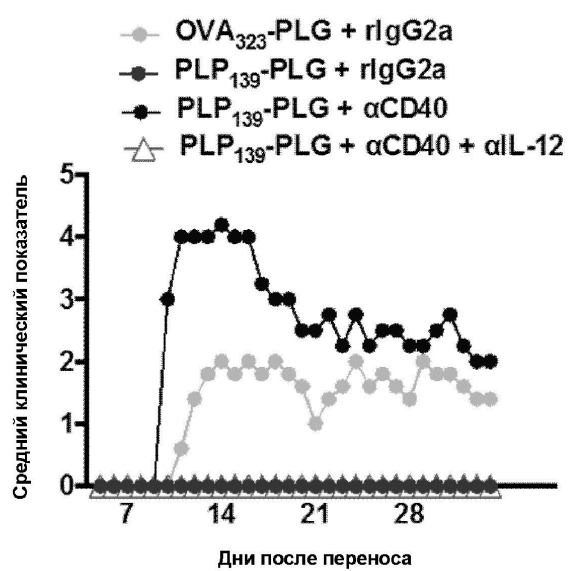
День 0 – 3×10^6 PLP₁₃₉₋₁₅₁ активированных Т-клеточных blasts внутривенно

День +2 – PLP₁₃₉₋₁₅₁ инкапсулированных PLG NPs внутривенно

Дни +2,+4,+6,+8,+10,+12 – 250 мкг антитела к PD-1

20/41

Фигура 18



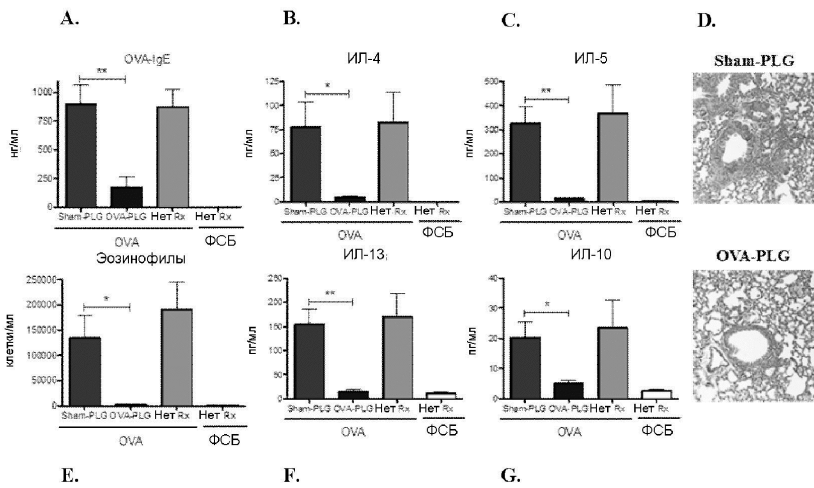
День 0 – 3×10^6 PLP₁₃₉₋₁₅₁ активированных Т-клеточных бластов внутривенно

День +2 – PLP₁₃₉₋₁₅₁ инкапсулированных PLG NPs внутривенно

День +3 – 100 мкг антитела к PD-1

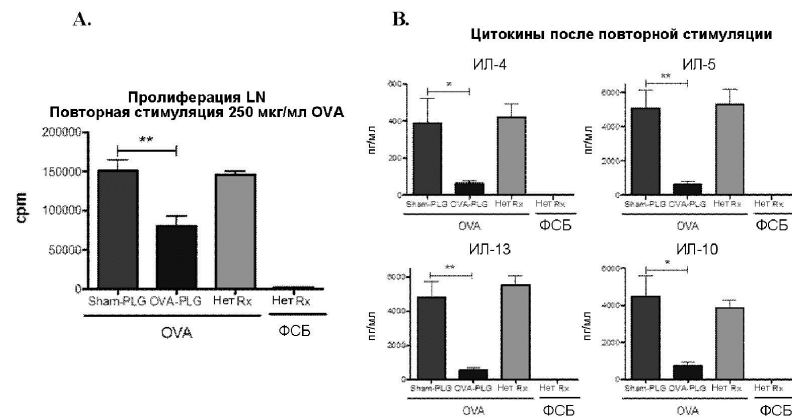
21/41

Фигура 19



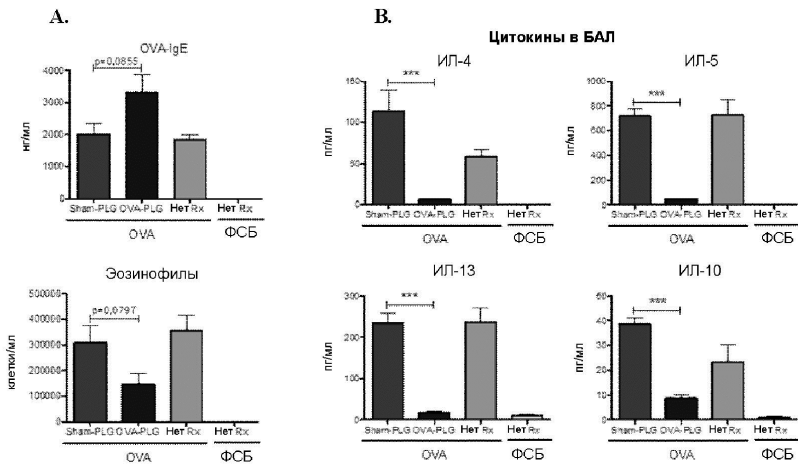
22/41

Фигура 20



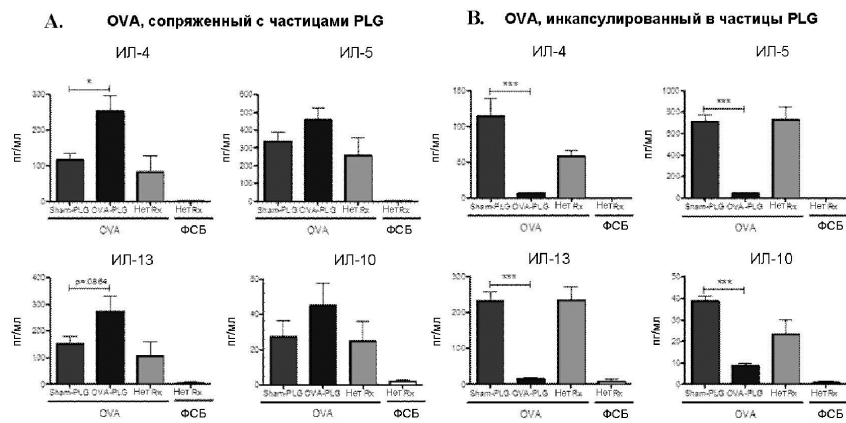
23/41

Фигура 21



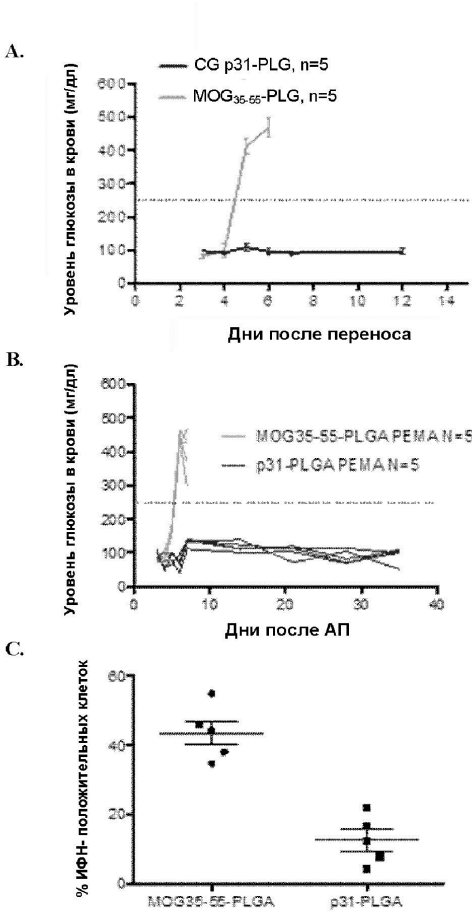
24/41

Фигура 22



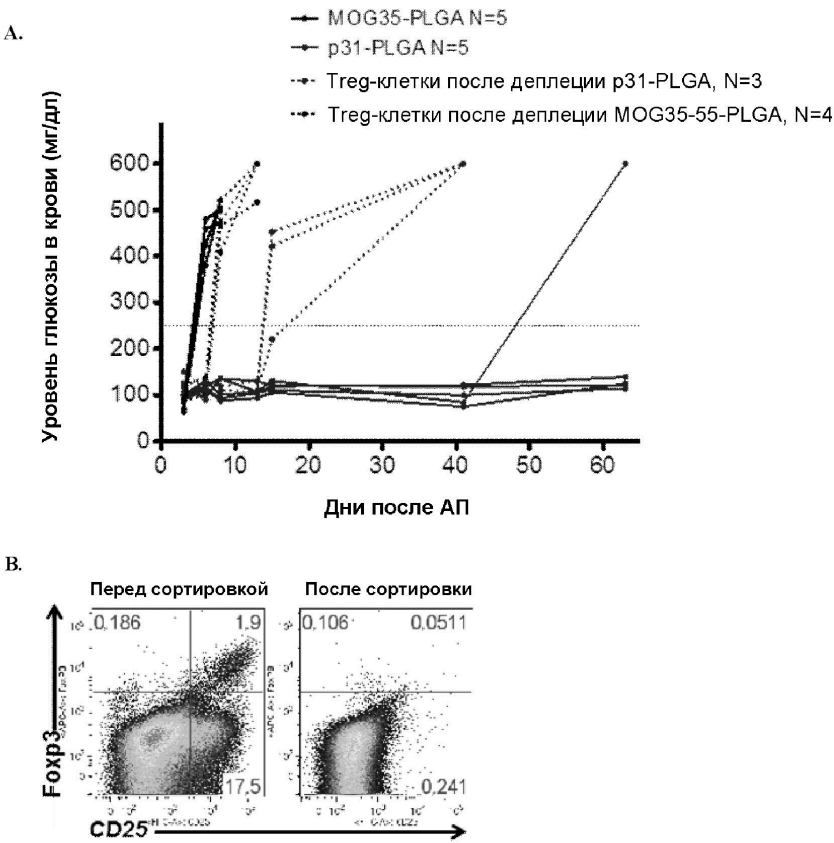
25/41

Фигура 23



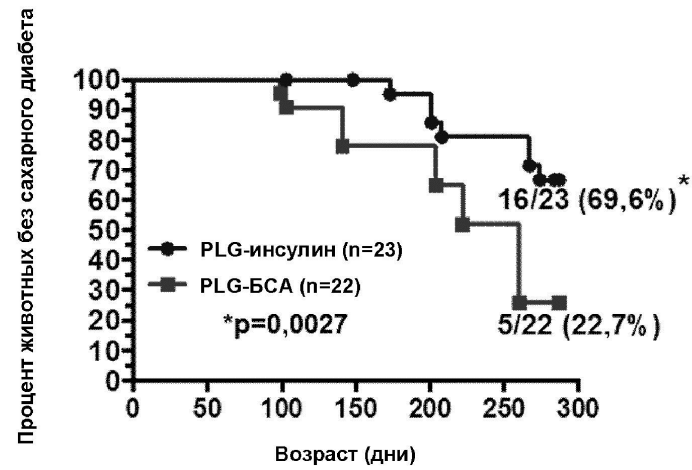
26/41

Фигура 24



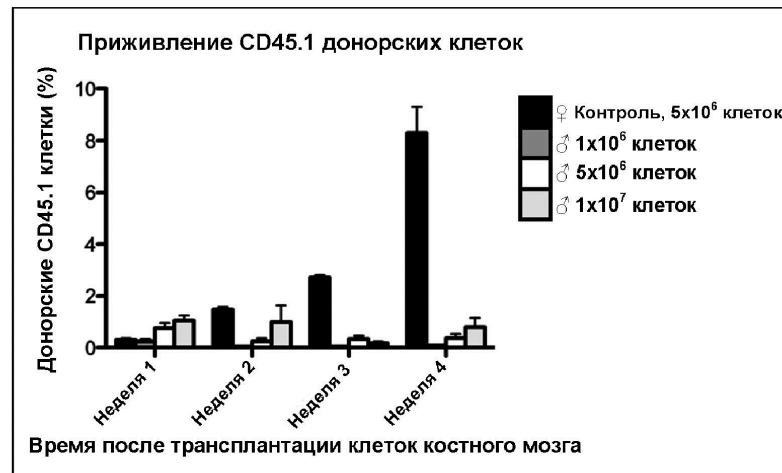
27/41

Фигура 25



28/41

Фигура 26



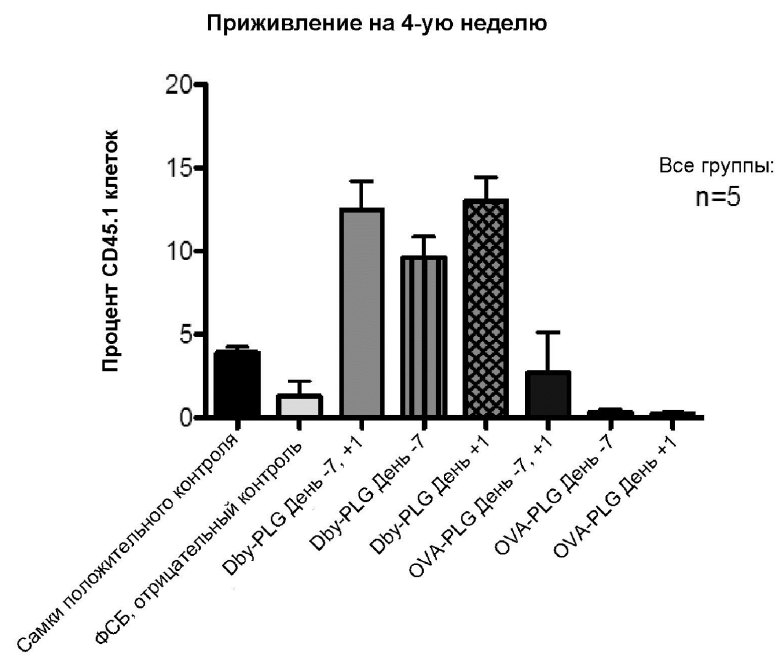
29/41

Фигура 27



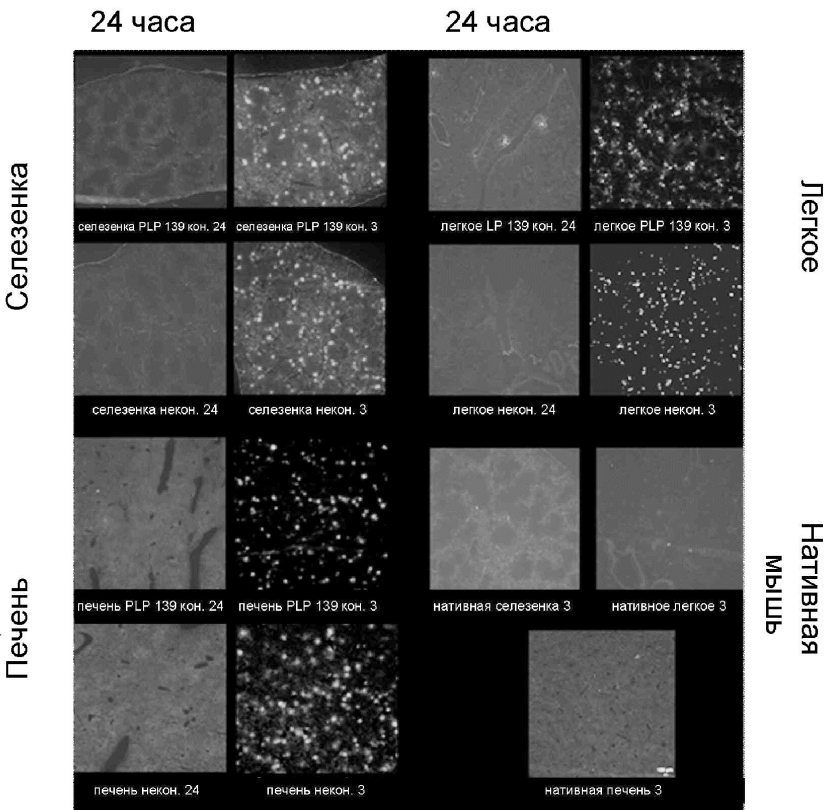
30/41

Фигура 28



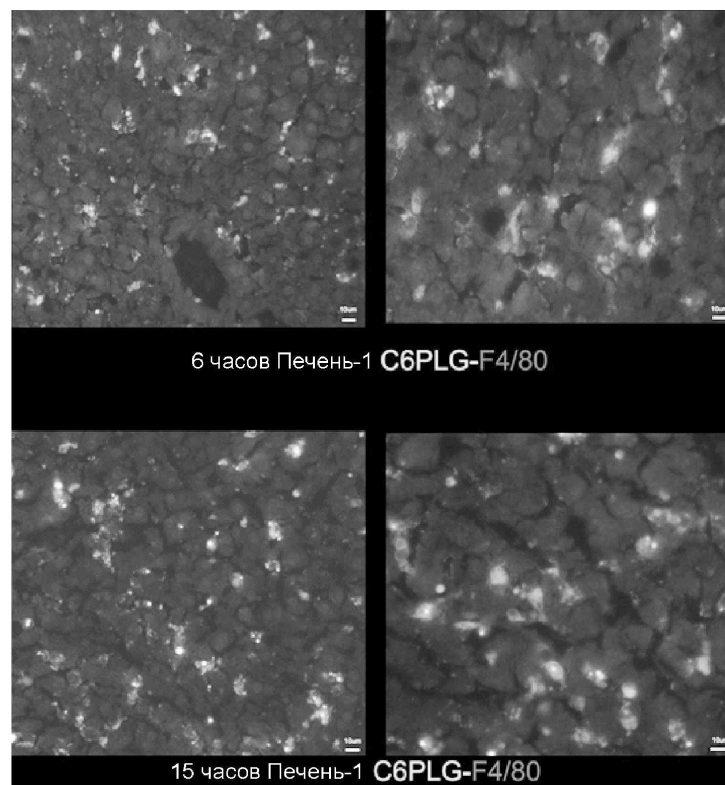
31/41

Фигура 29



32/41

Фигура 30



33/41

Фигура 31



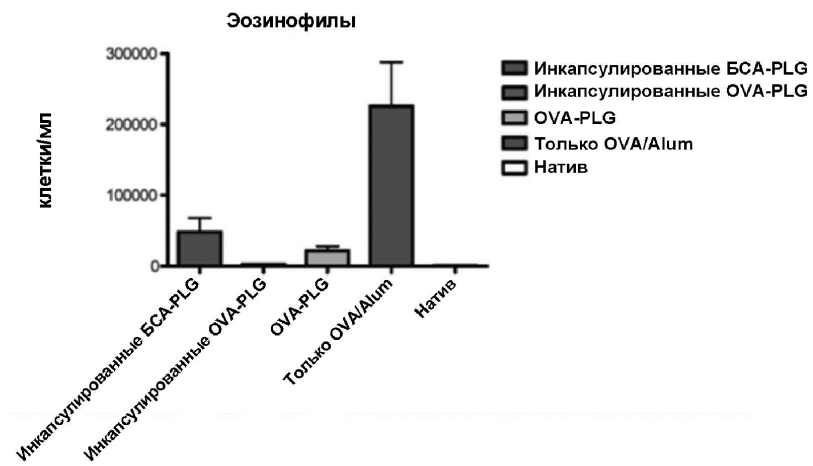
34/41

Фигура 32



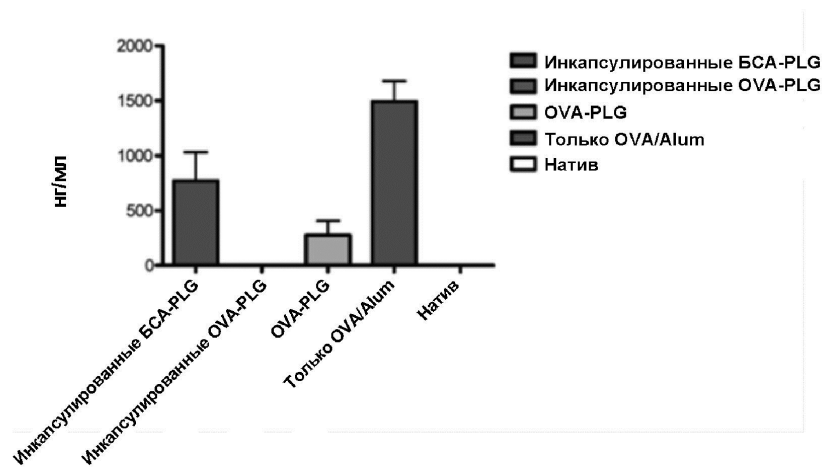
35/41

Фигура 33



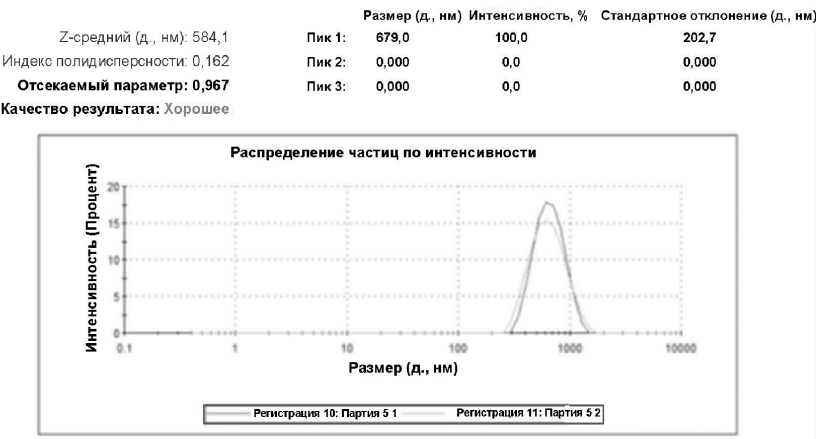
36/41

Фигура 34



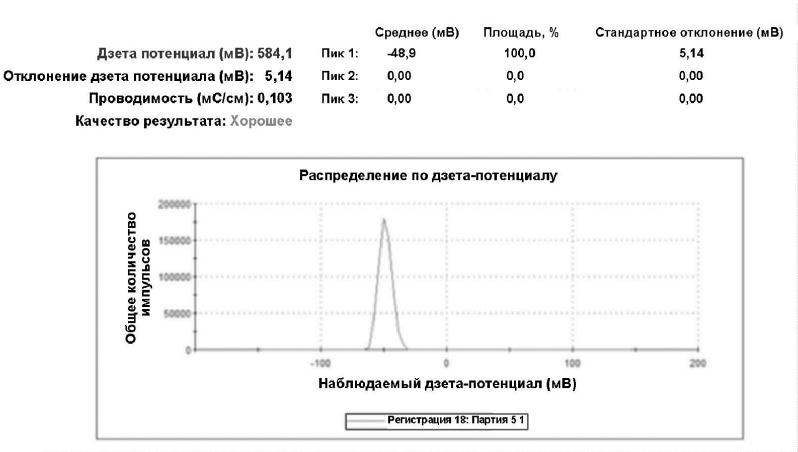
37/41

Фигура 35



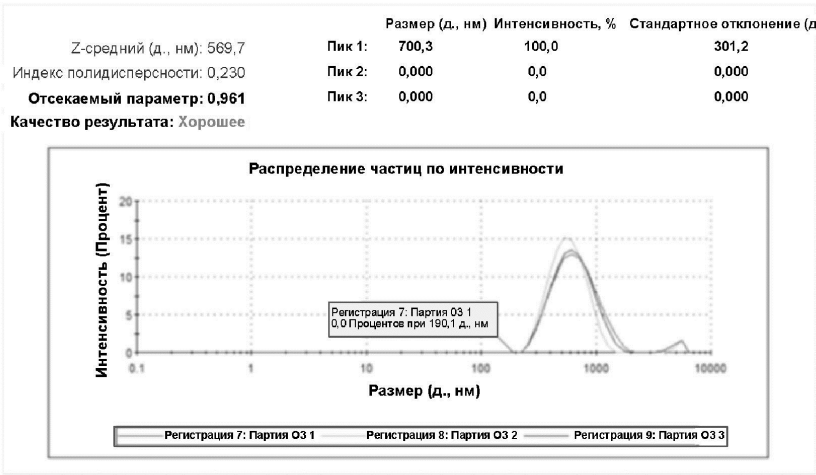
38/41

Фигура 36



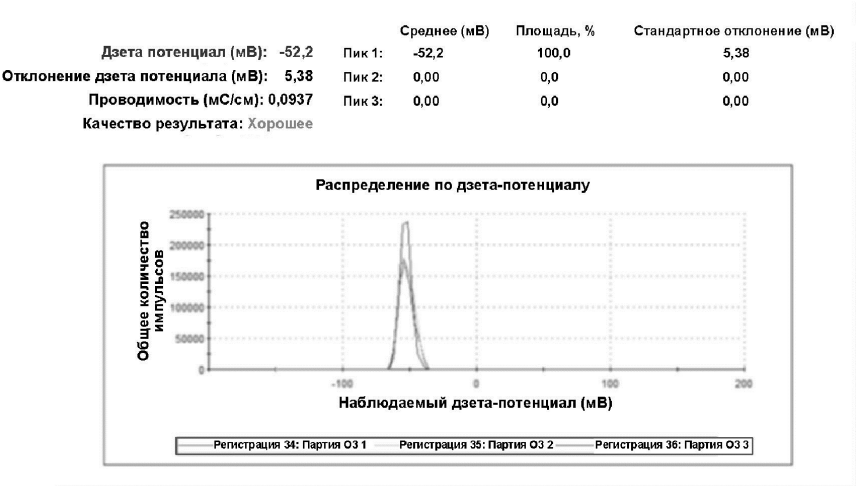
39/41

Фигура 37



40/41

Фигура 38



41/41

Фигура 39

